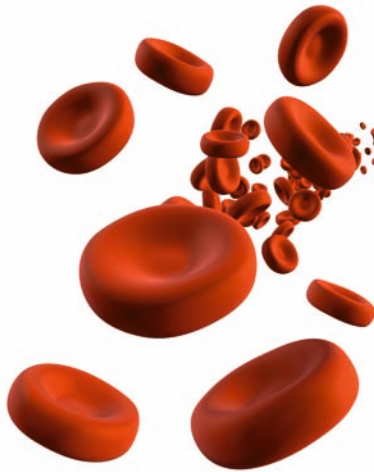


Lasergestützte Zellcharakterisierungen in der
präklinischen Forschung - Gerätevalidierung
und Erstellung von Referenzintervallen
für die Tierarten Hund und Ratte

IRIS KAMPFMANN



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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 2013

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 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen

Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin,
Klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Prof. Dr. Andreas Moritz
und
MS-RN Global Non Clinical Safety
Merck Serono GmbH Darmstadt
Prof. Dr. J.H. Harleman (Macclesfield, UK)

**Lasergestützte Zellcharakterisierungen in der präklinischen
Forschung -
Gerätevalidierung und Erstellung von Referenzintervallen
für die Tierarten Hund und Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Iris Kampfmann
Tierärztin aus Dieburg

Gießen 2013

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

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Moritz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. J.H. Harleman

Prüfer: PD Dr. C. Rummel

Tag der Disputation: 12.06.2013

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Babenhhausen, den 08.01.2013

The image shows a handwritten signature in blue ink on a light yellow background. The signature reads "Iris Klampfen" in a cursive script.

Meiner Familie.

Inhalt

1	EINLEITUNG	4
2	LITERATURÜBERSICHT	6
2.1	Methodenvergleich	6
2.2	Prüfen auf Präzision	7
2.3	Sysmex XT-2000iV	8
2.3.1	Messung der Erythrozyten und Thrombozyten.....	9
2.3.2	Messung der Retikulozyten	11
2.3.3	Hämoglobinmessung	12
2.3.4	Messung der Leukozyten.....	12
2.3.5	Erstellen manueller benutzerdefinierter Analyseprofile	15
2.4	Siemens ADVIA® 120	16
2.4.1	Messung der Erythrozyten und Thrombozyten.....	17
2.4.2	Messung der Retikulozyten	17
2.4.3	Hämoglobinmessung	17
2.4.4	Messung der Leukozyten.....	18
2.5	FACSCanto™	19
2.6	Referenzintervalle	20
2.6.1	Referenzintervalle für hämatologische Parameter der Tierart Ratte.....	22
2.6.2	Referenzintervalle für hämatologische Parameter der Tierart Hund.....	23
2.7	Leukozytenoberflächenantigene des Hundes	24
2.7.1	CD3	25
2.7.2	CD4	25
2.7.3	CD5	26
2.7.4	CD8	26
2.7.5	CD21	27
2.7.6	CD9	27
2.8	Retikulierte Thrombozyten	28

3	MATERIAL UND METHODEN	30
3.1	Untersuchungsgut Hund	30
3.1.1	Hunde	30
3.1.2	Blutentnahme Hund	30
3.2	Untersuchungsgut Ratte	31
3.2.1	Ratten	31
3.2.2	Blutentnahme Ratte	33
3.3	Probenverarbeitung.....	33
3.3.1	Blutzellzählung.....	33
3.3.2	Durchflusszytometrie	35
3.3.3	Manuelle Differenzierung.....	38
3.4	Studienprotokoll.....	38
3.4.1	Präzisionsmessung innerhalb einer Serie mit Rattenblut.....	38
3.4.2	Methodenvergleich des XT-2000iV mit dem ADVIA® 120 und manueller Differenzierung mit Blutproben der Ratte.....	39
3.4.3	Vergleich von Blutproben von Wistar Ratten aus unterschiedlicher Herkunft	39
3.4.4	Referenzintervalle Ratte.....	40
3.4.5	Referenzintervalle Hund.....	40
3.4.6	Methodenvergleich für retikulierte Thrombozyten des Hundes.....	40
3.5	Statistik	41
3.5.1	Präzision	41
3.5.2	Methodenvergleich	41
3.5.3	Vergleich von Blutproben von Wistar Ratten aus unterschiedlicher Herkunft	42
3.5.4	Referenzintervalle	43
4	ERGEBNISSE.....	44
4.1	Präzisionsmessung an ADVIA® 120 und XT-2000iV für Blutproben der Ratte.....	44
4.1.1	Blutzellzählung.....	44
4.1.2	Blutzellendifferenzierung	49
4.1.3	Retikulozytenzählung	53
4.2	Methodenvergleich des XT-2000iV mit dem ADVIA® 120 und manueller Differenzierung mit Blutproben der Ratte.....	54
4.2.1	Blutzellzählung.....	55
4.2.2	Differentialblutbild	60

4.2.3	Retikulozytenzählung	64
4.3	Vergleich von Blutproben von Wistar Ratten aus unterschiedlicher Herkunft	64
4.4	Referenzintervalle für den XT-2000iV für Wistar Ratten des Züchters 1.....	68
4.5	Referenzintervalle für die Tierart Hund	72
4.5.1	Referenzintervalle für den XT-2000iV für die Tierart Hund.....	72
4.5.2	Referenzintervalle für CD-Marker für die Tierart Hund.....	76
4.6	Retikulierte Thrombozyten beim Hund.....	81
4.6.1	Referenzintervalle	82
4.6.2	Methodenvergleich: retikulierte Thrombozyten am XT-2000iV und am FACSCanto™	84
4.6.3	Präzision	86
5	DISKUSSION.....	89
5.1	Präzision	90
5.2	Methodenvergleich des XT-2000iV mit dem ADVIA® 120 und manueller Differenzierung mit Blutproben der Ratte.....	92
5.2.1	Blutzellzählung.....	95
5.2.2	Differentialblutbild	101
5.2.3	Retikulozyten.....	104
5.3	Vergleich von Blutproben von Wistar Ratten aus unterschiedlicher Herkunft	105
5.4	Referenzintervalle für die Tierart Ratte	109
5.4	Referenzintervalle für die Tierart Hund	114
5.5	Retikulierte Thrombozyten beim Hund.....	125
6	ZUSAMMENFASSUNG	128
7	SUMMARY.....	131
8	LITERATUR.....	134
9.	ABKÜRZUNGEN	143

1 Einleitung

Im Rahmen der präklinischen Forschung sind hämatologische Untersuchungen ein wichtiger Bestandteil für die Bestimmung des Toxizitätsprofils und die nachfolgende Nutzen-Risiko-Analyse in der Entwicklung von pharmazeutischen und chemischen Produkten. Zusammen mit anderen Komponenten der toxikologischen Untersuchung (u.a. In-Life-Untersuchungen, klinische Chemie, Pathologie und Histopathologie) liefert die Hämatologie wichtige Hinweise auf mögliche Nebenwirkungen der Kandidaten.

Für diese präklinischen toxikologischen Studien verlangt der Gesetzgeber Untersuchungen, sowohl an einer Nager-, als auch an einer Nicht-Nager-Spezies (ICH 2008). Als Nager-Spezies findet häufig die Ratte Anwendung. Gegenüber der Tierart Maus, die ebenfalls oft im tierexperimentellen Bereich eingesetzt wird, hat diese unter anderem den Vorteil eines größeren Blutvolumens. Damit steht mehr Material für die hämatologischen Untersuchungen zur Verfügung. Tiere des Stammes Wistar werden - neben Sprague-Dawley Ratten – am häufigsten im Labor genutzt (Suckow 2006). Wistar Ratten zeigen positive Eigenschaften in den Punkten Lebenserwartung, Resistenz gegenüber Krankheiten, geringe neonatale Sterblichkeit, hohe Generationssequenzen und Körpergröße .

Hunde werden, alternativ zu Primaten, häufig als Nicht-Nager-Spezies in präklinischen Sicherheitsstudien eingesetzt. Meistens werden Tiere der Rasse Beagle verwendet. Häufig sind dies sogenannte Pocket-Beagle, die kleiner und leichter als der Rassestandard sind.

Automatische Hämatologiesysteme wurden in den vergangenen fünfzig Jahren ständig weiterentwickelt und auch an den veterinärmedizinischen Bedarf angepasst. Sie erlauben einen großen Probendurchsatz und liefern zahlreiche Informationen zum Gesundheitsstatus der untersuchten Tiere. Somit finden sie selbstverständlich auch Anwendung in der präklinischen Forschung. Durch neue Techniken und erweiterte Anwendungsmöglichkeiten der bestehenden Systeme können immer mehr Parameter automatisch gemessen werden.

Von herausragender Bedeutung im Bereich der toxikologischen Sicherheitsstudien ist die Kompatibilität der Systeme mit den Richtlinien der Good Laboratory Practice (GLP) (AVV 1997; AVV 2004). Dies schließt, vor der Validierung des Gerätes, natürlich die zu überprüfende Einsatzfähigkeit für die jeweilige Tierart ein.

Ziel dieser Arbeit ist es, unterschiedliche Messmethoden für Blut der Tierarten Hund und Ratte zu evaluieren. Zum Einsatz kommen die Geräte Siemens ADVIA® 120, Sysmex XT-2000iV und das Durchflusszytometer FACSCanto. Im Mittelpunkt steht die Etablierung von Messsystemen und neuen Messparametern sowie der Vergleich zwischen verschiedenen Tiergruppen. Ein weiterer Schwerpunkt ist die Erstellung von Referenzintervallen für die jeweilige Zieltierart im präklinischen Forschungslabor für mehrere Untersuchungsmethoden.

2 Literaturübersicht

2.1 Methodenvergleich

Bei der Evaluierung von Labormethoden sollte die neue Methode mit einer bereits etablierten, im Idealfall der Referenzmethode, verglichen werden (ICSH 1994; Bland and Altman 1999). Ein wirklicher „Goldstandard“ ist allerdings nicht immer vorhanden, weswegen als Vergleich oft eine häufig verwendete und für die jeweilige Untersuchung etablierte Methode (Vergleichsmethode /-Gerät) dient.

Der Vergleich dient dem Zweck systematische Fehler (konstante und proportionale) zu ermitteln. Konstante Fehler sind solche die nicht konzentrationsabhängig sind, im Gegensatz zu proportionalen Fehlern. Der systematische Fehler bildet zusammen mit dem willkürlichen Fehler (entspricht der Präzision) den Gesamtfehler.

Im Idealfall erstreckt sich das Probenprofil über den gesamten Messbereich, wobei ein Minimum von 40 Proben gemessen werden sollte (Westgard 2003; Jensen and Kjelgaard-Hansen 2006).

Statistische Methoden für die Analyse sind die Berechnung des Spearman Korrelationskoeffizienten r_s (spearman`s rank correlation coefficient), die Analyse nach Bland und Altman und die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Passing und Bablok (Passing and Bablok 1983; Bland and Altman 1999; Hyltoft Petersen, Blaabjerg et al. 2004; Jensen and Kjelgaard-Hansen 2006).

Der Vorteil bei der Berechnung des Spearman Korrelationskoeffizienten liegt darin, dass die zu analysierende Datenmenge nicht normalverteilt sein muss. Die Auswertung erfolgt anhand des Korrelationskoeffizienten r_s , der Werte zwischen -1 und +1 annehmen kann. Der Wert Null bedeutet, dass keine Übereinstimmung zwischen den Daten herrscht. Bei einem Wert von +1 korrelieren beide Methoden optimal, bzw. bei -1 besteht ein negativer linearer Zusammenhang. Der Korrelationskoeffizient alleine sollte allerdings nie über die Annahme oder Ablehnung einer Methode entscheiden. Es kann so zu Fehleinschätzungen kommen, da proportionale oder konstante Fehler nicht erkannt werden (Westgard 2003).

Die Darstellung dieser Fehler bietet die Passing-Bablok-Regression, die ebenfalls eine Beurteilung nicht normalverteilter Daten zulässt (Passing and Bablok 1983). Der y-Achsenabschnitt (intercept) gibt hier Auskunft über den konstanten Fehler, während die Steigung (slope) der Geraden ein Maß für den proportionalen Fehler darstellt.

Die Bland Altman Analyse lässt, anhand des Mittelwertunterschiedes (bias), die Abschätzung systematischer Fehler zu. Es wird davon ausgegangen, dass es keine wirkliche Referenz-Methode gibt. Der Mittelwertunterschied wird auf der y-Achse aufgetragen, der Mittelwert beider Methoden auf der x-Achse. Nimmt der bias einen Wert von „Null“ an, stimmen beide Methoden überein. Je weiter sich der errechnete Wert von „Null“ wegbewegt, desto unterschiedlicher sind die Resultate der beiden Methoden. Die 95-prozentige Übereinstimmungsgrenze gibt den willkürlichen Fehler an (Bland and Altman 1999).

2.2 Prüfen auf Präzision

Die Präzision einer Messmethode trifft eine Aussage über deren willkürlichen Fehler. Hierbei wird eine Probe im Idealfall mindestens 25 Mal hintereinander gemessen. Berechnet werden der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient. Die Standardabweichung gibt die zu erwartende Verteilung der gemessenen Werte an und wird zur Berechnung des Variationskoeffizienten ($SD/Mittelwert * 100\%$) genutzt. Eine Verteilung der Daten in Form einer Gauß'schen Normalverteilung stellt den Idealfall dar. Die Standardabweichung sollte maximal ein Viertel des erlaubten Gesamtfehlers (total error) betragen (Westgard 2003).

2.3 Sysmex XT-2000iV

Der Sysmex XT-2000iV ist ein vollautomatisches Hämatologiesystem des Herstellers Sysmex Corporation, Japan, welches seitens der Messtechnik sowohl die Impedanzmethode als auch die Laser gestützte Fluoreszenz-Durchflusszytometrie nutzt. Ausgestattet ist das Gerät mit einem Halbleiterlaser, der Licht einer Wellenlänge von 633 nm emittiert (Abb. 2.2).



Abbildung 2.1: XT-2000iV (Foto: Sysmex)

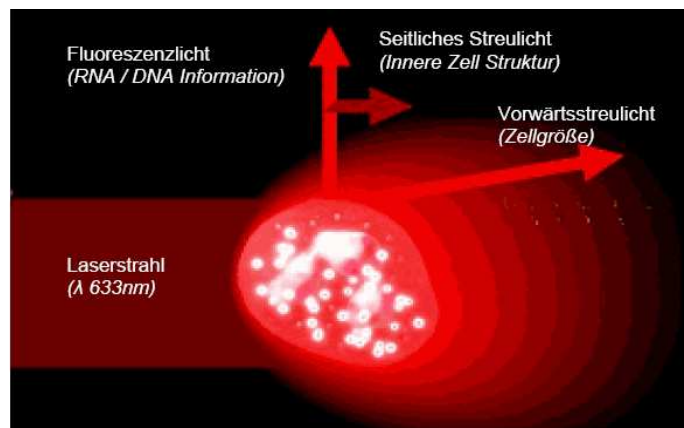


Abbildung 2.2: Prinzip der Laser gestützten Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (Sysmex, Schulungsunterlagen)

2.3.1 Messung der Erythrozyten und Thrombozyten

Die Messung der Erythrozyten und Thrombozyten erfolgt durch Impedanzmessung nach hydrodynamischer Fokussierung. Durch ein Ummanteln der Probe mit Cellpack™-Flüssigkeit werden die Zellen vereinzelt der Messöffnung zugeführt. Hier erzeugen sie eine Widerstandsänderung und somit einen elektrischen Impuls, anhand dessen Stärke auf die Größe der Zelle geschlossen werden kann. Die Ergebnisse werden in ein Histogramm übertragen, in dem die Zellpopulationen durch Diskriminatoren eingegrenzt werden (Sysmex 2/2007; Sysmex 2009).

Die Bestimmung des Hämatokrits erfolgt anhand des Erythrozytenvolumens. Die Volumina der gemessenen Erythrozyten werden addiert und zum Volumen der Messverdünnung in Verhältnis gesetzt.

Die Parameter mittleres Zellvolumen (MCV), mittlerer Hämoglobingehalt der Erythrozyten (MCH) und mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC) werden mittels der gemessenen Parameter Erythrozytenzahl (RBC), Hämoglobin (HGB) und Hämatokrit (HCT) errechnet (Sysmex 2009).

Die Erythrozytenverteilungsbreite wird mittels zweier Methoden angegeben. Ausgehend von einer Höchstwerthöhe von 100% wird die RDW-SD (Red Blood Cell Distribution Width – Standard Deviation) durch die Verteilungsbreite auf dem 20% Frequenzniveau bestimmt. Die Einheiten werden in fl (Femtoliter) angegeben. Zur Berechnung des Parameters RDW-CV (Red Blood Cell Distribution Width – Coefficient of Variation) werden die Punkte L1 und L2 des Diagramms so angenommen, dass die Fläche der Verteilung zwischen diesen Punkten 86,26% beträgt. Der RDW-CV berechnet sich dann aus folgender Formel:

$$\text{RDW-CV (\%)} = (L2-L1)/(L2+L1)*100$$

Im Histogramm der Thrombozyten gibt es neben den flotierenden unteren und oberen Diskriminatoren einen fixen Diskriminator bei 12 fl. Letzterer dient zur Bestimmung der P-LCR (Platelet Large Cell Ratio), die den Anteil großer Thrombozyten an der Gesamtzahl der Thrombozyten angibt. Die Thrombozytenverteilungsbreite (PDW) wird bei einer angenommenen Höchstwerthöhe von 100% auf dem Frequenzniveau der Kurve gemessen.

Als weitere berechnete Parameter werden PCT (Plateletcrit) und MPV (Mean Platelet Volume) angegeben (Sysmex 2009).

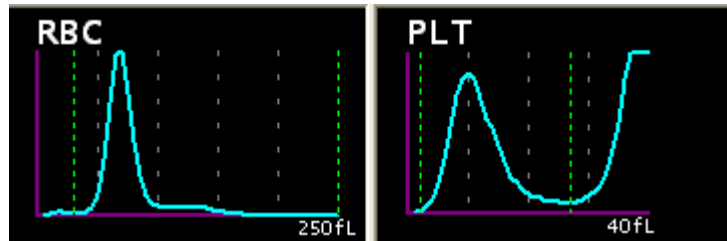


Abbildung 2.3: Erythrozyten- und Thrombozytenhistogramm

Beim Auftreten von Mikroerythrozyten, Riesenthrombozyten oder Fragmentozyten gerät die Impedanzmethode unter Umständen an ihre Grenzen und liefert keine genauen Messergebnisse. Daher bietet der XT-2000iV die Möglichkeit der optischen Thrombozytenbestimmung. Diese basiert auf einem Anfärben der Nukleinsäure-Reste der Thrombozyten mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes der Polymethin-Farbstoffgruppe nach Penetration der Zelle im RET-Kanal des Gerätes. Somit ist eine Differenzierung der RNA-haltigen Thrombozyten von den Erythrozyten möglich (Sysmex 2/2007).

Weiterhin können die Thrombozyten anhand ihres RNA-Gehaltes in verschiedene Reifungsstadien eingeteilt werden. Die Anzahl dieser sogenannten retikulierten Thrombozyten gibt Aufschluss auf die Ausprägung der Megakaryopoese (Pankraz, Bauer et al. 2009). Je nach Reifungsgrad beinhalten die Thrombozyten unterschiedliche Mengen an Nukleinsäure-Resten. „Jüngere“ Thrombozyten (RNA-reich) erscheinen im Scattergramm des XT-2000iV weiter rechts, ausgereifte (geringe Mengen an RNA) weiter links. In Abbildung 2.4 sind die Thrombozyten in grüner Farbe dargestellt, darüber befinden sich die Erythrozyten und weiter rechts von diesen die Retikulozyten.

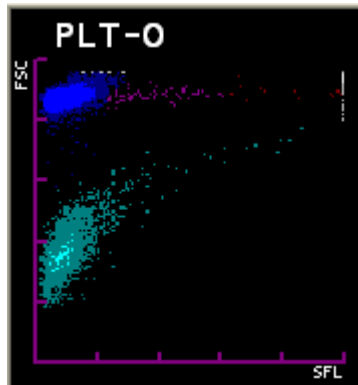


Abbildung 2.4: optischer Thrombozytenkanal

x-Achse: Seitenfluoreszenz (SFL, Fluoreszenzintensität)

y-Achse: Vorwärtsstreulicht (FSC, Größe)

türkis: Thrombozyten; blau: Erythrozyten; lila/rot: Retikulozyten

2.3.2 Messung der Retikulozyten

Wie bereits bei der Beschreibung der optischen Thrombozytenmessung erwähnt, erfolgt die Messung der Retikulozyten im RET-Kanal. RET-SEARCH II, ein Reagenziensystem bestehend aus einem Lysereagenz und einem Fluoreszenzfarbstoff, bewirkt die Perforation der Zellmembran und anschließend das Anfärben der Nukleinsäuren (Sysmex 1/2008). Mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie erfolgt die Messung der Zellen. Hierbei werden die Zellgröße im Vorwärtsstreulicht und die Fluoreszenzintensität mittels der Seitwärtsfluoreszenz gemessen. Je nach Fluoreszenzanfärbung werden die Retikulozyten im Scattergramm angeordnet. Retikulozyten mit hoher Fluoreszenzintensität, also „jüngere“ Zellen, erscheinen hierbei weiter rechts (Sysmex 2/2007; Sysmex 2009). Nach diesem Prinzip werden die Retikulozyten in niedrig-, mittel- und hochfluoreszierende Populationen eingeteilt (LFR, MFR, HFR). Mittel- und hochfluoreszierende ergeben zusammen die Immature Reticulocyte Fraction (IRF).

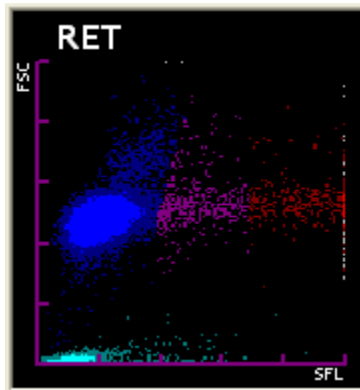


Abbildung 2.5 Retikulozyten-Messung im RET-Kanal
 x-Achse: Seitenfluoreszenz (SFL, Fluoreszenzintensität)
 y-Achse: Vorwärtsstreulicht (FSC, Größe)
 blau: Erythrozyten; lila/rot: Retikulozyten

2.3.3 Hämoglobinmessung

Die Messung des Hämoglobingehaltes der Probe erfolgt cyanidfrei mit dem Reagenz Natrium-Lauryl-Sulfat (SLS). Nach Oxidation von zwei- zu dreiwertigem Eisen, Bindung von SLS und Bildung eines stabilen Methämoglobinkomplexes erfolgt die Bestimmung per photometrischer Messung bei 555 nm (Sysmex 1/2008; Sysmex 2/2007; Sysmex 2009).

2.3.4 Messung der Leukozyten

Die Messung der Leukozyten erfolgt sowohl im DIFF-Kanal als auch im WBC/BASO-Kanal.

Im DIFF-Kanal erfolgt die Leukozytendifferenzierung per Fluoreszenz-Durchflusszytometrie. Mittels des grenzflächenaktiven Reagenz Stromatolyser 4DL werden die Erythrozyten lysiert und die Leukozytenzellmembranen perforiert. Anschließend werden die intrazellulären Nukleinsäuren und Zellorganellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Nach dem Transport der Probe zur Durchflusszelle erfolgt die Erfassung der Zellen im Halbleiterlaser. Das Seitwärts- und Fluoreszenzstreulicht wird von zwei Photodioden und einem Photomultiplier absorbiert, in einen elektrischen Impuls umgewandelt und die Zellen können

anhand ihrer inneren Struktur und Fluoreszenzintensität unterschiedlichen Populationen zugeordnet werden.

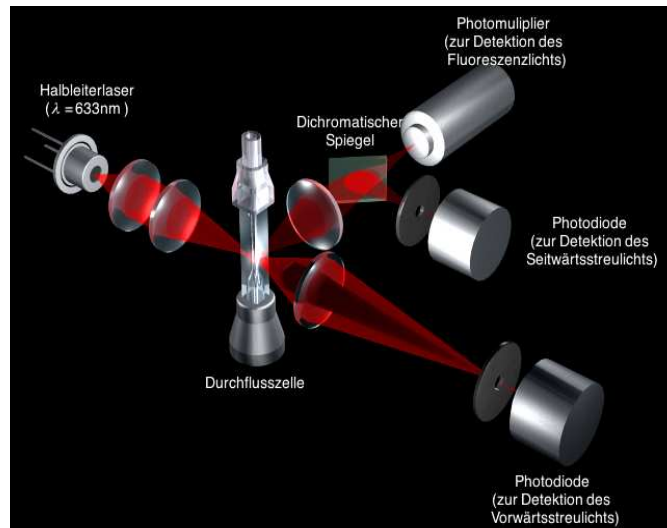


Abbildung 2.6: Durchflusszelle und optisches System (Sysmex Schulungsunterlagen)

Somit erscheinen im Scattergramm die einzelnen Populationen der neutrophilen Granulozyten (inklusive basophile Granulozyten), Lymphozyten, Monozyten und eosinophile Granulozyten. Auch die Gesamtleukozytenzahl wird vom DIFF-Kanal ermittelt (Sysmex 1/2008; Sysmex 2/2007; Sysmex 2009).

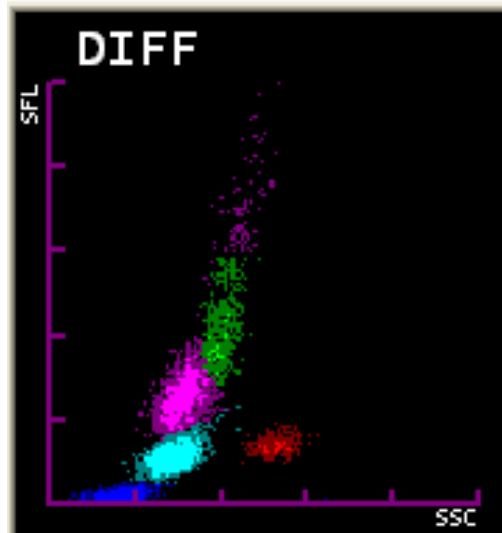


Abbildung 2.7: Scattergramm des Diff-Kanals einer Hundebloodprobe

x-Achse: Seitwärtsstreulicht (SSC, Granularität der Zelle)

y-Achse: Seitenfluoreszenz (SFL, Fluoreszenzintensität)

blau: Debris, türkis: Neutrophile und Basophile,

pink: Lymphozyten, grün: Monozyten, rot: Eosinophile

Im WBC/BASO-Kanal wird ebenfalls per durchflusszytometrischer Messung der Gesamtleukozytenwert (Standardwert) erfasst sowie die Anzahl der Basophilen ermittelt. Durch ein saures Reagenz werden alle Leukozyten bis auf den Kern geschrumpft, mit Ausnahme der Basophilen. Somit erscheinen die Basophilen getrennt von den restlichen Leukozyten im Scattergramm (Sysmex 1/2008; Sysmex 2/2007; Sysmex 2009).

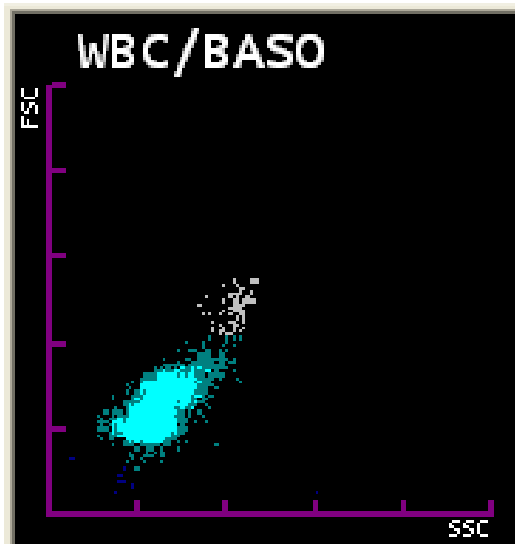


Abbildung 2.8: Scattergramm des WBC/BASO-Kanals einer Hundebloodprobe
 x-Achse: Seitwärtsstreulicht (SSC, Granularität der Zelle)
 y-Achse: Vorwärtsstreulicht (FSC, Größe),
 türkis: Neutrophile Granulozyten, grau: Basophile Granulozyten

Die doppelte WBC-Bestimmung in DIFF- und WBC/BASO-Kanal dient der internen Qualitätskontrolle.

2.3.5 Erstellen manueller benutzerdefinierter Analyseprofile

Als Besonderheit bietet der XT-2000iV die Möglichkeit, benutzerdefinierte Analyseprofile zu erstellen und gemessene Proben mit diesen zu reanalysieren. Diese Funktion kann beim Messen einer nicht in der Gerätesoftware vordefinierten Spezies genutzt werden (Sysmex 1/2007). Auch die Messung und Auswertung anderer Materialien als Blut, beispielsweise Broncho-Alveolar-Lavageflüssigkeit, ist möglich (Sysmex 1/2007; Mathers, Evans et al. 2007). Pankratz et al. nutzten die Möglichkeit des manuellen Gatings für die genauere Untersuchung von retikulierten Thrombozyten bei der Tierart Hund. Mittels setzen von Diskriminatoren um die Gesamtpopulation der Thrombozyten werden diese zunächst definiert und Erythrozyten, Retikulozyten und Debris aus dem Gate ausgeschlossen. In einem weiteren Schritt werden Gates zur Identifizierung der retikulierten Thrombozyten gesetzt (Pankraz, Bauer et al. 2009).

Die Software des XT-2000iV erlaubt es, das neu erstellte Nutzerprofil abzuspeichern und für künftige Proben wiederzuverwenden (Sysmex 1/2007).

2.4 *Siemens ADVIA® 120*

Der ADVIA® 120 ist ein vollautomatisches Blutanalyse-System der Firma Siemens (Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland), das über eine Multi-Spezies Software verfügt. Das Gerät wurde für unterschiedliche Tierarten, unter anderem auch für den Hund, evaluiert und ist in veterinärmedizinischen Laboratorien weit verbreitet (Fickenscher 2001). In der pharmazeutischen Industrie stellt der ADVIA® 120 das zurzeit am meisten verwendete System für hämatologische Untersuchungen im Rahmen toxikologischer Sicherheitsstudien dar.



Abbildung 2.9: ADVIA® 120

2.4.1 Messung der Erythrozyten und Thrombozyten

Die Zellen werden isovolumetrisch aufgekugelt und gelangen dann, durch hydrodynamische Fokussierung vereinzelt, in den Messkanal. Hier werden sie im Doppelwinkel-Laser-Streulicht bei 670 nm gemessen. Das Volumen der Zelle wird per Niedrigwinkelsignal (2° - 3° , Low Angle Scatter), die Dichte per Hochwinkelsignal (5° - 15° , High Angle Scatter) analysiert.

Die Zellen werden nach der Mie Theorie anhand von Größe und Refraktionsindex getrennt und in Zytogrammen aufgetragen. Der Refraktionsindex erlaubt hierbei die Unterscheidung zwischen RBCs, Thrombozyten verschiedener Größe, RBC-Fragmenten und -Ghosts und Debris. Auch die intrazelluläre Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten wird erfasst (BayerHealthcare 2002; BayerHealthcare 2003).

2.4.2 Messung der Retikulozyten

Auch die Retikulozyten werden nach isovolumetrischer Aufkuglung und hydrodynamischer Fokussierung im Doppelwinkel-Laser-Streulicht gemessen. In einem zweiten Schritt wird die in den Retikulozyten enthaltene RNA angefärbt. Somit erfolgt anhand des RNA-Gehaltes eine Subklassifizierung in drei verschiedene Reifungsstadien (BayerHealthcare 2002; BayerHealthcare 2003).

2.4.3 Hämoglobinmessung

Zur Bestimmung des Hämoglobingehaltes der Erythrozyten werden diese zunächst durch eine im HGB Reagenz enthaltene oberflächenaktive Substanz lysiert. Das zweiwertige Eisen des freiwerdenden Hämoglobins wird zu Methämoglobin oxidiert. Durch die Reaktion mit dem im ADVIA® 120-HGB Reagenz enthaltenen Kaliumcyanid entsteht ein Cyanhämoglobin-komplex, der photometrisch bei 546 nm gemessen wird (BayerHealthcare 2003).

2.4.4 Messung der Leukozyten

Auch am ADVIA® 120 erfolgt die Messung der Leukozyten in zwei verschiedenen Systemen.

Im Peroxidasekanal werden die Erythrozyten lysiert und die Leukozyten mit einem peroxidasehaltigen Reagenz angefärbt. Die Messung erfolgt im Halogenlicht, nachdem auch hier die Zellen mittels hydrodynamischer Fokussierung vereinzelt wurden. Es können je nach Peroxidasegehalt und Größe fünf verschiedene Zellpopulationen differenziert werden: neutrophile Granulozyten, eosinophile und basophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Large Unstained Cells (LUC) (BayerHealthcare 2002; BayerHealthcare 2003).

Im Basophilenkanal werden die Leukozyten im Laserlicht gemessen. Die Erythrozyten werden lysiert und das Zytoplasma aller Leukozyten, mit Ausnahme der basophilen Granulozyten, wird entfernt (cytoplasmatic stripping). Die relativ großen, da noch „vollständigen“, Basophilen können von den kleineren, „gestrippten“ Zellkernen unterschieden werden. Weiterhin lassen sich die Kerne der übrigen Leukozyten anhand ihrer Form und Komplexität klassifizieren. Somit sind die Zellen in mononukleäre und polymorphnukleäre einzuteilen und es können Aussagen über ihren Reifungsgrad getroffen werden (BayerHealthcare 2002; BayerHealthcare 2003).

Die Übereinstimmung der Messergebnisse von Peroxidase- und Basophilenkanal (WBCP – WBCB) stellt auch bei diesem Gerät eine interne Qualitätskontrolle dar.

2.5 FACSCanto™

Das BD FACSCanto™ System ist ein Durchflusszytometer der Firma Becton, Dickinson and Company (BD Biosciences, San Jose, California, USA).



Abbildung 2.10: BD FACSCanto™ Durchflusszytometer

Ausgestattet ist das Gerät mit einem blauen Laser (488 nm), einem roten Laser (633 nm) und insgesamt sechs Messkanälen. Somit erlaubt es die Messung von gleichzeitig sechs Fluoreszenzen und des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes. Das Durchflusszytometer besteht aus drei Einheiten: dem Flüssigkeitssystem, dem optischen und dem elektronischen System. Im Flüssigkeitssystem wird die Probe in Richtung Durchflusszelle transportiert. Hier werden die Zellen, wie auch bei den beiden vorher beschriebenen Messsystemen, per hydrodynamischer Fokussierung vereinzelt dem Laser zugeführt. Das Vorwärtsstreulicht erfasst hier die Größe der Zelle, das Seitwärtsstreulicht die Granularität. Nach Ausleuchtung der Zellen im optischen Teil wird das Laserlicht zu einem Emissionsblock und weiter zum Messdetektor geleitet, der sogenannten Photo-Multiplier-Tube (PMT). Die Signale des blauen Lasers gelangen zu einer oktagon-förmigen Sammeloptik, die des roten Lasers

werden zu einer Trigon-Optik geleitet. Die elektronische Einheit konvertiert nun die analogen in digitale Signale, die am Computer in Form von Histogrammen oder Scattergrammen sichtbar werden. Hierbei werden die Höhe (Height) und die Fläche (Area) für jeden Impuls berechnet (BD 2008). In den Scattergrammen werden die gemessenen Zellen als Punktwolken dargestellt. Dabei stellt ein Punkt ein gemessenes Event dar. Durch das Einfügen eines Schwellenwertes wird definiert, welche Ereignisse vom Gerät aufgezeichnet werden, die darunterliegenden (= Debris) werden ignoriert (BD 2008).

Die einzelnen Zellpopulationen können in den Scattergrammen durch Setzen von Gates eingegrenzt und vereinzelt werden. Dies ist notwendig um die Zielpopulation möglichst vollständig von Debris und nicht relevanten Zellen zu trennen (Byrne, Reinhart et al. 2000).

Mit Hilfe der Gerätesoftware des FACSCanto ist es möglich Hierarchien aus den einzelnen Gates zu erstellen, diese statistisch analysieren zu lassen und zueinander in Verhältnis zu setzen (BD 2008).

2.6 Referenzintervalle

Das erste Konzept zur Entwicklung von Referenzintervallen wurde von GRÄSBECK und SARIS (Gräsbeck and Saris 1969) im Jahre 1969 eingeführt und löste das Konzept der „Normalwerte“ ab (Sundermann 1975; Gräsbeck 1983). Zunächst unterschied man gesunde und kranke Individuen je nach Lage des Wertes innerhalb oder außerhalb des Referenzintervalles. Diese strenge Interpretation wird mittlerweile nicht mehr angewandt. Lässt ein Wert innerhalb oder außerhalb des Referenzbereiches doch nicht alleine die Unterscheidung zwischen „gesund“ und „krank“ zu. Nichtsdestotrotz stellen Referenzintervalle eine wichtige Hilfe bei der Beurteilung von Laborergebnissen dar (Gräsbeck 1983; Henny 2004; Horowitz, Altaie et al. 2008). Weiterhin lassen sich durch sie Verschiebungen von Blutparametern in einer Referenzpopulation über einen längeren Zeitraum darstellen (George, Snipes et al. 2010).

Die Technik zur Erstellung von Referenzintervallen wurde zunächst in einer sechsteiligen Publikation beschrieben (Solberg 1983; Dybkaer 1987; PetitClerc 1987; Solberg 1987; Solberg and PetitClerc 1988; Solberg and Stamm 1991). Eine Weiterentwicklung dieser Serie

stellt eine Publikation des Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) aus dem Jahre 2008 dar (Horowitz, Altaie et al. 2008). Für die Veterinärmedizin stehen aktuelle Empfehlungen zur Verfügung (Geffré, Friedrichs et al. 2009; Friedrichs 2010; Friedrichs, Barnhart et al. 2011).

Die Erstellung von Referenzintervallen ist zeit- und kostspielig, weswegen nicht jedes Labor in der Lage ist, eigene Werte zu erstellen. CLSI und die Arbeitsgruppe der American Society of Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) empfehlen beispielsweise zu deren Erstellung mindestens 120 Referenzindividuen heranzuziehen (Solberg 1983; Horowitz, Altaie et al. 2008; Friedrichs, Barnhart et al. 2011). Das ist häufig kaum zu bewerkstelligen. GEFFRÉ et al. empfehlen, so viele Referenzindividuen wie möglich von einer gut definierten Population zu verwenden (Geffré, Friedrichs et al. 2009). Denn auch die Auswahl der berücksichtigten Individuen spielt eine Rolle, kann doch bei vielen Tierarten ein Einfluss von zahlreichen Faktoren auf Referenzintervalle nachgewiesen werden. Hierbei werden interne Faktoren, wozu zum Beispiel Rasse, Alter, Geschlecht und Stamm zählen, von externen Faktoren unterschieden, die beispielsweise den Lebensraum und den Grad der Aktivität beinhalten (Turton, Hawkey et al. 1989; Kaufman, Harris et al. 1994; Robel, Lochmiller et al. 1996; Aleman, Mas et al. 1998; Gikins 1999; Feldmann 2000; Feeman, Couto et al. 2003; Brun-Hansen, Kampen et al. 2006; Shiel, Brennan et al. 2007; Gikins 2008; Sharkey, Gjevre et al. 2009).

Natürlich sollten die Referenzindividuen gesund sein. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert Gesundheit als einen „Zustand des vollständigen körperlichen, geistigen und sozialen Wohlergehens und nicht nur das Fehlen von Krankheit oder Gebrechen“ (Anonymus 1946). Schon für den Menschen ist diese Definition kaum anwendbar. Für das Tier ist es jedoch fast unmöglich, „Gesundheit“ nach diesen Kriterien festzustellen. Daher ist eine genaue Beschreibung und Dokumentation des Gesundheitsstatus und der internen und externen Faktoren, die einen Einfluss auf die Referenzpopulation haben können, unbedingt notwendig (Horowitz, Altaie et al. 2008). WALTON empfiehlt, folgende Punkte zu definieren: Alter, Geschlecht, Rasse, Reproduktionszyklus, vorausgegangene Erkrankungen, klinische Untersuchung, geographische Einflüsse und saisonale Effekte (Walton 2001). Anhand dieser Kriterien können Subpopulationen gebildet und separat beurteilt werden (Walton 2001).

Bei der Erstellung von Referenzintervallen werden meist 95% der Referenzpopulation berücksichtigt. Berechnet werden also, wie durch ISO 15189 und IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) definiert, das 0,025- und 0,975-Perzentil (Solberg 1983; Geffré, Friedrichs et al. 2009; IOFS 2012). Somit fallen 5% der untersuchten Population in den Messbereich außerhalb des errechneten Referenzintervalls, obwohl die Individuen eigentlich als gesund zu bezeichnen sind. Um diese falsch-positiven Fälle zu minimieren wird zum Teil eine Ausweitung auf 99% der Referenzpopulation (0,999 Perzentil) gefordert (Jorgensen, Brandslund et al. 2004).

Liegt keine Normalverteilung der Daten vor oder kann der Datensatz nicht logarithmisch in eine solche transformiert werden, muss eine nichtparametrische Methode zur Berechnung herangezogen werden. Andernfalls kann ein parametrischer Test Anwendung finden (Lumdsen 1978; Linnert 1987; Hyltoft Petersen, Blaabjerg et al. 2004).

Ein weiterer Faktor, der die Erstellung von Referenzintervallen beeinflussen kann, ist die Messtechnik. Das verwendete Messsystem sollte validiert sein (Friedrichs, Barnhart et al. 2011). Somit ergibt sich die Notwendigkeit, im Zuge der Etablierung eines neuen Analysegerätes oder einer neuen Methode im Labor, altbewährte Referenzintervalle zu prüfen und gegebenenfalls anzupassen (Geffré, Friedrichs et al. 2009; Bourgès-Abella, Geffré et al. 2011). Mögliche Veränderungen innerhalb einer Referenzpopulation und Fortschritte in den Untersuchungsmethoden lassen die Verwendung älterer Referenzintervalle allerdings generell kritisch erscheinen (George, Snipes et al. 2010).

Häufig werden in veterinärmedizinischen Publikationen zahlreiche Faktoren, die für eine korrekte Bestimmung von Referenzintervallen relevant sind, missachtet oder nur unvollständig beschrieben (Geffré, Friedrichs et al. 2009). Dies betrifft vielfach genaue Angaben zum Profil und der Größe der untersuchten Population, der Untersuchungstechnik und des statistischen Vorgehens (Friedrichs 2010; Bourgès-Abella, Geffré et al. 2011).

2.6.1 Referenzintervalle für hämatologische Parameter der Tierart Ratte

Zahlreiche Faktoren beeinflussen hämatologische Referenzintervalle bei der Ratte, welche sich in interne und externe unterscheiden lassen. Zu den internen Faktoren, die die Ausprägung einzelner Parameter im Blut beeinflussen, zählen Stamm, Alter und Geschlecht

der Tiere (Jackson, Hutson et al. 1988; Turton, Hawkey et al. 1989; Robel, Lochmiller et al. 1996; Aleman, Mas et al. 1998; Gikins 1999; Feldmann 2000; Gikins 2008). Auch die Haltung gilt es zu beachten, können doch verschiedene Haltungsformen und damit verbundene unterschiedliche Quantitäten an Bewegung und Aktivität hämatologische Werte beeinflussen (Kaufman, Harris et al. 1994; Robel, Lochmiller et al. 1996). Zu guter Letzt wurde der Einfluss der Ernährung auf die Ausprägung von Laborwerten häufig beschrieben (Schwartz, Tornaben et al. 1973; Pickering and Pickering 1984; Ogawa, Matsumoto et al. 1985; Levin, Semler et al. 1993; Hubert, Laroque et al. 2000; Yoshii, Y. et al. 2002/2003; Moriyama, Tsujioka et al. 2008; Asanuma, Miyata et al. 2011).

Hämatologische Referenzintervalle für die Tierart Ratte wurden bereits oft publiziert. Allerdings verwenden diese Studien als Referenzpopulation häufig nicht Tiere des Stammes Wistar (Wolford, Schroer et al. 1986; Aleman, Mas et al. 1998; Gikins 1999; Feldmann 2000; Suckow 2006). Für Wistar Ratten liegen Werte aus dem Jahre 1982 vor, welche mit damals aktuellen technischen Gegebenheiten erstellt wurden und daher kaum mit den modernen Messverfahren vergleichbar sind (Lewi and Marsboom 1982). Eine weitere, aktuellere Publikation hat ihren Fokus ausschließlich auf weibliche ausgewachsene Tieren gelegt (Liberati, Sansone et al. 2004). Außerdem wurden Referenzintervalle von einem Anbieter von Labortieren veröffentlicht (Gikins 2008).

2.6.2 Referenzintervalle für hämatologische Parameter der Tierart Hund

Auch für den Hund wurden bereits häufiger hämatologische Referenzintervalle veröffentlicht. Beagle der Linie Marshall wurden in einer Studie aus dem Jahre 1986 genauer hämatologisch untersucht (Wolford, Schroer et al. 1986). Die Studie arbeitet mit einer hohen Zahl an Referenzindividuen mit manuellen und damals verfügbaren technischen Methoden. Somit sind diese Intervalle auf Werte, die mittels neuerer Messmethoden gewonnen werden, kaum mehr anwendbar. Neuere Publikationen haben ihren Ursprung meist in der Klinik und befassen sich daher mit einem breiten Spektrum an Hunderassen (Moritz, Fickenscher et al. 2004; Bourgès-Abella, Geffré et al. 2011) oder speziellen Fragestellungen zu einzelnen Rassen (Shiel, Brennan et al. 2007; Nielsen, Kjelgaard-Hansen et al. 2010). Eine getrennte Betrachtung männlicher und weiblicher Tiere wird meist nicht vorgenommen.

2.7 *Leukozytenoberflächenantigene des Hundes*

In der Immunologie erfolgt die Unterscheidung von Leukozyten durch Oberflächenantigene, die durch Markierung mit Antikörpern dargestellt werden können. Für die Tierart Hund wurden erstmals auf dem „first canine leucocyte antigen workshop“ (CLAW) im Jahre 1994 monoklonale Antikörper definiert (Cobbald and Metcalfe 1994). Später wurde die Kreuzreaktivität von weiteren humanen Antikörpern für verschiedene Tierarten getestet (Brodersen, Bijlsma et al. 1998; Saalmüller and Aasted 2007). Für den Hund sind nach aktuellem Stand etwas mehr als 30 wichtige Antigene durch verschiedene Antikörper nachweisbar (Weiss and Wardrop 2010).

Die Nomenklatur, Cluster of differentiation (CD), ist an die des humanmedizinischen Bereichs angepasst, die von BERNARD und BOUMSELL im Jahre 1984 eingeführt wurde (Bernard and Boumsell 1984).

In der Humanmedizin gehören die Diagnostik und die Verlaufskontrolle verschiedener Krankheiten mittels Markierung durch CD-Antikörper zur Routine. So ist zum Beispiel die Darstellung des CD4-Spiegels im Blut von HIV-Patienten ein wichtiges diagnostisches Mittel bei der Beurteilung des Krankheitsverlaufes (Daniel 1992). Auch in der Leukämiediagnostik ist die Immunophänotypisierung von entscheidender Bedeutung (Kern 2005).

In der Veterinärmedizin wurde die Anwendung von CD-Marker-basierten durchflusszytometrischen Untersuchungen von Blut- und Knochenmarkproben zahlreich beschrieben. So werden beispielsweise Antikörper aus dem humanen Bereich auf ihre Kreuzreaktivität bei verschiedenen Tierarten überprüft, Gatingtechiken für die Darstellungen von Lymphozyten etabliert und CD-Proteine im Blut, Knochenmark und in der Haut dargestellt (Moore, Rossitto et al. 1992; Byrne, Kim et al. 2000; Weiss 2001; Faldyna, Sinkora et al. 2003; Weiss 2004; Faldyna, Samankova et al. 2007; Schuberth, Kucinskiene et al. 2007; Tsumagari, Otani et al. 2007; Huang, Hung et al. 2008; Loringh van Beeck, Zajonc et al. 2008). Bisher haben diese Untersuchungen häufig wissenschaftliche Bedeutung. Bei der Diagnosefindung in der klinischen Routine findet die Durchflusszytometrie allerdings ebenfalls Anwendung, meist bei Blut- und Knochenmarkuntersuchungen von Hunden mit Leukämien oder Lymphomen (Culmsee 2001; Weiss 2001; Weiss 2002; Comazzi, Gelain et al. 2006; Comazzi, Gelain et al. 2006; Allison, Bruncker et al. 2008; Comazzi and Gelain 2011).

Die Immunphänotypisierung gehört mittlerweile zu einem geforderten und viel verwendeten Verfahren in präklinischen Toxizitätsstudien, auch bei der Spezies Hund. Hier werden vor allem die verschiedenen Lymphozytenpopulationen im peripheren Blut untersucht. Das Angebot an kommerziell erhältlichen Antikörpern ist für den Hund immer noch wesentlich geringer als für humane Zellen oder für Labornager, nimmt aber kontinuierlich zu. In vorliegender Studie werden einige CD-Marker, die in toxikologischen Untersuchungen häufig genutzt werden, genauer untersucht.

2.7.1 CD3

Das Transmembranprotein CD3 wird ausschließlich von caninen ausgereiften T-Lymphozyten exprimiert und ist als Teil des T-Zell-Rezeptors für die Signalübertragung notwendig. Der in dieser Studie verwendete Maus-Antikörper (Klon CA.17.2A12) gehört zur Subklasse IgG1 und wurde schon mehrfach in Studien zur Untersuchung von caninen Lymphozytenpopulationen eingesetzt (Byrne, Kim et al. 2000; Faldyna, Levá et al. 2001; Huang, Hung et al. 2008).

2.7.2 CD4

CD4 stellt ein Oberflächenmolekül einer T-Zell-Subpopulation dar. Periphere T-Zellen unterteilen sich in zwei Subpopulationen. Die T-Helfer-Zellen (Th) exprimieren CD4 und bilden den größeren Anteil. CD4 fungiert hier als Korezeptor zum T-Zell-Rezeptor und ist essentiell für die Interaktion mit Haupthistokompatibilitätskomplexantigen Klasse II-tragenden Zellen (MHC II). Der hier verwendete Ratten-Antikörper (Klon YKIX302.9) gehört zur IgG2a-Subklasse und wurde auf dem CLAW-Workshop etabliert (Cobbold and Metcalfe 1994). Als tierartliche Besonderheit wird CD4 auch auf den neutrophilen Granulozyten des Hundes sehr stark exprimiert (Gebhard and Carter 1992; Moore, Rossitto et al. 1992).

2.7.3 CD5

Bezüglich des CD5-Antikörpers wird der Klon YKIX322.3 verwendet, der zur Subklasse IgG2a gehört. CD5 ist ein Transmembranprotein von T-Zellen und ist als Rezeptor für CD72 Teil der Signaltransduktion (Cobbold and Metcalfe 1994; Weiss and Wardrop 2010). Beim Menschen und einigen Nagerspezies findet man CD5 auch auf einer Subpopulation von B-Zellen. Dies konnte für die Tierart Hund meist nicht nachgewiesen werden (Cobbold and Metcalfe 1994). HUANG et al. finden allerdings auch CD5-positive Zellen, die gleichzeitig CD21-Oberflächenmoleküle tragen (Huang, Hung et al. 2008).

CD5-positive Zellen des Hundes lassen sich häufig in zwei Unterpopulationen teilen. Eine Größere, die CD5 stark exprimiert und eine Kleinere, auf der die Expression schwächer ausfällt (Cobbold and Metcalfe 1994; Bokemeyer 2003; Huang, Hung et al. 2008). BOKEMEYER konnte diese beiden Populationen in seiner Arbeit nicht durch Gating trennen und somit nicht quantifizieren (Bokemeyer 2003).

HUANG et al. hingegen war dies möglich. Sie fanden $14,9 \pm 6,68\%$ Zellen, die niedrig CD5 exprimieren und $59,65 \pm 8,32\%$ stark exprimierende CD5-positive Zellen. In dieser Studie wird eine Verwandtschaft der Zellen, die wenig CD5 exprimieren, mit caninen Natural-Killer-Zellen diskutiert (Huang, Hung et al. 2008).

BOKEMEYER fand in seiner Studie zahlreiche Hunde, bei denen keine CD5-positiven Zellen nachgewiesen werden konnten (Bokemeyer 2003). Die meisten dieser Hunde zeigten verschiedene Krankheitsbilder, jedoch war auch ein klinisch völlig gesunder Hund dabei.

2.7.4 CD8

Der Ratten-Antikörper (Klon YCATE55.9) gehört zur Subklasse IgG1 und wurde durch den CLAW Workshop etabliert (Cobbold and Metcalfe 1994). Er bindet spezifisch an die α -Kette des caninen CD8-Antigens, welches den Korezeptor des T-Zell-Rezeptors darstellt. Dieser wiederum bindet spezifisch an den Haupthistokompatibilitätsantigenkomplex Klasse I der antigenpräsentierenden Zellen. CD8 und CD4 kommen nie gemeinsam auf einer Zelle vor (Gebhard and Carter 1992). Das Verhältnis von CD4- zu CD8-positiven Zellen wird für den Hund mit ca. 2:1 angegeben (Gebhard and Carter 1992). BOKEMEYER findet einen CD4/CD8-

Quotienten für eine Kontrollgruppe von Beagle von 1,03 (arithmetisches Mittel). Für adulte Hunde gemischter Rassen beträgt der Quotient 1,95 und für Welpen 1,51 (Bokemeyer 2003). Eine weitere Studie gibt Werte von 0,98-2,83 an (Byrne, Kim et al. 2000). FALDYNA et al. stellen deutliche Altersunterschiede beim CD4/CD8-Quotienten heraus. Mit steigendem Alter nimmt dieser immer weiter ab. Beagle im Alter von 1-2 Jahren weisen einen Wert von $2,5 \pm 0,6$ auf (Faldyna, Levá et al. 2001).

2.7.5 CD21

Auch der Maus-Antikörper gegen CD21 (CD21-like, Klon CA.2.1D6) wurde erstmals auf dem CLAW Workshop beschrieben (Cobbold and Metcalfe 1994). Da eine genaue Beschreibung des Epitops auf dem Workshop nicht gelang, bezeichnet man es als CD21(like)-Antigen (Cobbold and Metcalfe 1994). Der Antikörper gehört zur Subklasse IgG1 und bindet auf B-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen des Hundes.

2.7.6 CD9

Die Zielspezies, des in dieser Studie verwendeten Antikörpers gegen das Oberflächenantigen CD9 (Klon MM2/57), stellt der Mensch dar. Jedoch konnte gezeigt werden, dass eine Kreuzreaktivität von CD9-Antikörpern gegenüber den Lymphozyten und Thrombozyten des Hundes besteht (Brodersen, Bijlsma et al. 1998; Schuberth, Kucinskiene et al. 2007). Beim Menschen bindet CD9 auf Thrombozyten, Endothelzellen, Monozyten und Vorläufern der B-Zellen (Boucheix, Benoit et al. 1991). Während der B-Lymphopoese spielt CD9 beim Menschen eine Rolle in der Motilität und bei adhäsiven Vorgängen (Masellis-Smith 1990; Masellis-Smith 1994).

2.8 Retikulierte Thrombozyten

Die Bezeichnung „retikulierte Thrombozyten“ stammt aus dem Jahre 1969 und geht auf INGRAM et al. zurück, die RNA-Reste in jungen Thrombozyten des Hundes mikroskopisch nachweisen konnten. In Anlehnung an die Retikulozyten nannten sie diese „retikulierte Thrombozyten“ (Ingram and Coopersmith 1969). KIENAST et al. entdeckten, dass man diese Thrombozyten mit Hilfe von die Zellmembran penetrierenden, RNA-anfärbenden Farbstoffen (Thiazole Orange) durchflusszytometrisch darstellen kann (Kienast and Schmitz 1990). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die retikulierten Thrombozyten im Blut des Hundes weniger als 24 Stunden alt sind (Dale, Friese et al. 1995). Auch weitere veterinärmedizinischen Studien beschäftigten sich mit der durchflusszytometrischen Messung von retikulierten Thrombozyten (Russell, Perkins et al. 1997; Weiss 1998; Hanahachi, Moritomo et al. 2001; Wilkerson, Shuman et al. 2001; Smith and Thomas 2002; Weiss 2004). Die antikörperbasierte Messung der retikulierten Thrombozyten am Durchflusszytometer ist jedoch zeit- und kostenintensiv und weist hohe Variationen auf, sowohl innerhalb, als auch zwischen verschiedenen Laboren {Harrison, 1997}. Auch ist ein hohes Maß an Expertise dafür notwendig.

In vorliegender Studie werden die Thrombozyten durch einen PE-markierten CD61-Antikörper des Klones VI-PL2 dargestellt, der schon in früheren Untersuchungen für Blut des Hundes verwendet wurde (Pankraz, Bauer et al. 2009). CD61 ist die 105 kDa große β 3-Kette eines Transmembran-Glykoproteins, das auf Thrombozyten und Makrophagen vorkommt. Es bildet mit der α -Kette (CD41) des Integrins einen Komplex der unter anderem Fibrinogen bindet (Tizard 2009).

Ein weniger zeitaufwendiges Prozedere zur Darstellung der retikulierten Thrombozyten stellten PANKRAZ et al. vor. Sie kreierten erstmals eine Oberfläche für die Auswertung der gemessenen retikulierten Thrombozyten am Sysmex XT-2000iV für die Tierart Hund (Pankraz, Bauer et al. 2009). An diesem werden die Zellen nach intrazellulärer Färbung der RNA-Reste im optischen Thrombozytenkanal gemessen.

Anhand ihres RNA-Gehaltes können sie nun nach verschiedenen Reifungsstufen eingeteilt werden. Zellen mit hohem RNA-Gehalt (junge Thrombozyten) erscheinen im Scattergramm weiter rechts als RNA-ärmere (ältere Thrombozyten). Diese Methode hat große Vorteile

bezüglich Zeit- und Kostenersparnis und Standardisierung gegenüber der durchflusszytometrischen Untersuchung (Pankraz, Bauer et al. 2009).

3 Material und Methoden

3.1 *Untersuchungsgut Hund*

3.1.1 Hunde

In die Untersuchung werden Blutproben von insgesamt 154 Hunden von MS-RN Global Non Clinical Safety (Institut für Toxikologie) der Merck Serono GmbH, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt, eingeschlossen. Die Hunde gehören zur Rasse Beagle, stammen vom Züchter Marshall (Marshall BioResources, USA) und sind zwischen zehn und vierzehn Monaten alt. 77 Tiere sind männlichen und 77 Tiere sind weiblichen Geschlechts. Sie werden in Gruppen von drei bis fünf Hunden für zwanzig Stunden täglich gehalten. Weiterhin erfolgt eine Einzelhaltung für vier Stunden in 6,54 m² großen Standard-Boxen mit Auslauf bei natürlicher Beleuchtung. Die Fütterung erfolgt einmal täglich mit 300 g eines pelletierten Futters der Firma Provimi Kliba (Provimi Kliba AG, Kaiseraugst, Schweiz). Trinkwasser steht *ad libitum* zur Verfügung. Alle Hunde sind entwurmt sowie gegen Staupe, Leptospirose, Parvovirose, Parainfluenza, Bordetella, Papillomavirus, Adenovirus und Tollwut geimpft. Die Hunde sind klinisch unauffällig und werden im Rahmen einer Kontrolluntersuchung zu Beginn der Studie sowohl klinisch nach Propädeutik als auch hämatologisch untersucht. Die Erkennung erfolgt über Ohrtätowierungen. Die 154 Hunde werden in drei verschiedenen Routinestudien des Institutes für Toxikologie eingesetzt. Die Blutproben für die vorliegenden Untersuchungen werden im Rahmen dieser Studien abgenommen. Alle Studien erfolgen in Einklang mit den Arzneimittelprüfrichtlinien und dem Deutschen Tierschutzgesetz (Artikel 8) und wurden beim Regierungspräsidium Darmstadt angezeigt (RP-Anzeigen: DA 4/Anzeige 330, Methode 3b; DA 4/Anzeige 330, Methode 3a; DA/Anzeige 330, Methode 2).

3.1.2 Blutentnahme Hund

Aufgrund zusätzlicher klinisch-chemischer Untersuchungen fasten die Tiere für 20 Stunden vor der Blutentnahme. Diese erfolgt um sieben Uhr morgens durch geschultes Personal des

Institutes für Toxikologie an der Vena jugularis mit 19G Kanülen (Terumo Deutschland GmbH, Eschborn). Es werden 5 ml fassende K₃-EDTA-antikoagulierende Röhrchen (Firma Sarstedt, Nümbrecht) verwendet. Das Blut gelangt freilaufend in das Röhrchen, nachdem die ersten Milliliter für andere Zwecke in ein weiteres Röhrchen gefüllt wurden. Dies ist notwendig, um eine Aktivierung der Thrombozyten durch Gewebefaktoren zu vermeiden. Insgesamt werden ca. 7 ml Blut je Tier entnommen. Die Proben werden bis zur weiteren Verarbeitung bzw. Messung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.2 *Untersuchungsgut Ratte*

3.1.1 Ratten

Untersucht werden insgesamt 224 Ratten des Stammes Wistar, die von zwei verschiedenen Züchtern bezogen wurden.

Es werden für einen Vergleich von Referenzintervallen Tiere aus den folgenden beiden Bezugsquellen untersucht: 145 Wistar Ratten des Züchters Charles River (= Gruppe 1; Kontrolltiere; Crl:WI (Han); Charles River Laboratories International Inc., Wilmington, Massachusetts, USA) und 63 Wistar Ratten des Züchters Harlan (= Gruppe 2; Kontrolltiere; HSDCpb:WU; Harlan Laboratories, Inc, Indianapolis, IN, USA). In der ersten Gruppe befinden sich 72 männliche und 73 weibliche Tiere; in Gruppe 2 stehen 33 männliche und 30 weibliche Tiere zur Verfügung. Alle Tiere sind klinisch unauffällig. Sie werden vor Studienbeginn klinisch untersucht und das Körpergewicht wird erfasst. Außerdem unterliegt die Rattenkolonie einem healthmonitoring Programm welches regelmäßige pathologische, serologische, mikrobiologische und parastologische Untersuchungen einschließt.

Für den Vergleich der beiden Messgeräte XT-2000iV und ADVIA® 120 werden Proben von 60 unbehandelten Ratten der Gruppe 2 und 75 Proben von unbehandelten Gruppe-1-Tieren verwendet. Außerdem werden für diese Untersuchung Proben von 16 weiteren Tieren der Gruppe 2 verwendet, die mit Zytostatika behandelt wurden. Elf dieser Tiere bekamen zwei Mal im Abstand von 14 Tagen 5-Fluorouracil verabreicht. Die Dosis betrug bei 6 Tieren

jeweils 100 mg/kg und bei 5 Tieren 150 mg/kg und wurde intravenös appliziert. Fünf weitere Tiere wurden zwei Mal in 21-tägigen Abstand mit Carboplatin behandelt (intravenös, 25 mg/kg). Die Ratten der Kontrollgruppe bekamen NaCl 0,9% appliziert.

Die Blutentnahme erfolgt jeweils eine Woche nach der zweiten Behandlung.

Betroffen von der Behandlung sind die Parameter des roten und des weißen Blutbildes und die Thrombozyten. Der Einschluss dieser Proben in die Studie erfolgt jedoch vor allem, um einen breiteren Messbereich der Parameter des roten Blutbildes abzudecken.

Für die Bestimmung der Präzision wird das Blut von jeweils einigen Tieren jedes Züchters aus den unbehandelten Gruppen gepoolt, um die für die Messungen benötigte Menge zu erhalten.

Alle Ratten sind zum Blutentnahmezeitpunkt zwischen 10 und 13 Wochen alt. Davor erreichten sie das Institut für Toxikologie im Alter von ca. 7 Wochen. Sie werden in Gruppenhaltung, zu je drei bis fünf Tieren, in Typ IV Makrolon® Käfigen auf Weichholzgranulat gehalten. Die Beleuchtung erfolgt im 12 Stunden hell / dunkel Rhythmus. Die Haltung erfolgt bei 22 ± 2 °C und 40-70% relativer Luftfeuchte. Die Tiere erhalten ein pelletiertes Futtermittel der Firma Provimi Kliba (Provimi Kliba AG, Kaiseraugst, Schweiz) und Leitungswasser *ad libitum*.

Zum Einsatz kommen 145 Tiere der Gruppe 1 sowie 60 unbehandelte und 16 behandelte Tiere der Gruppe 2 in verschiedenen präklinischen Studien des Institutes für Toxikologie. Dabei wird für Routinearbeiten Blut entnommen. Die nicht benötigten Reste dieser Proben werden für die aktuelle Studie verwendet. Drei weitere männliche Tiere der Gruppe 2 stehen zusätzlich für eine Routinestudie zur Verfügung, werden für diese aber letztendlich nicht verwendet.

Die Ratten, mit Ausnahme der 16 zusätzlichen für den Methodenvergleich, bekommen verschiedene pharmakologisch unwirksame Trägersubstanzen gemäß den jeweiligen Studienprotokollen verabreicht. Bei der überwiegenden Zahl der Tiere aus beiden Gruppen handelte es sich hierbei um 0,25% aqueous Hydroxypropyl Methylcellulose. Die 16 behandelten Tiere werden in einer Routinestudie des Institutes für Toxikologie eingesetzt und bekommen dementsprechend die zu testenden Substanzen verabreicht. Die Studien erfolgen im Einklang mit den Arzneimittelprüfrichtlinien und dem deutschen

Tierschutzgesetz (Artikel 8) und wurden beim Regierungspräsidium Darmstadt angezeigt (RP-Anzeige: DA 4/Anzeige 295; DA 4/Anzeige 197; DA 4/Anzeige 339; DA 4/Genehmigung 204).

3.2.2 Blutentnahme Ratte

Die Ratten fasten 18 Stunden vor der Blutentnahme wegen zusätzlichen klinisch-chemischen Untersuchungen. Die Blutentnahme erfolgt sublingual unter Inhalationsanästhesie mit 3%-Isofluran (CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland) und wird um sieben Uhr morgens von geschultem Personal des Institutes durchgeführt. Nach Punktieren der Vena sublingualis mittels 23G Kanülen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) tropft das Blut frei in 1,3 ml fassende K₃-EDTA-antikoagulierende Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Pro Tier wird ca. 1 ml Blut entnommen. Bis zur Messung werden die Proben bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.3 *Probenverarbeitung*

Die Verarbeitung aller Blutproben erfolgt am Tag der Entnahme. Die Messungen am Siemens ADVIA® 120 und am Sysmex XT-2000iV erfolgen bis spätestens vier Stunden nach der Entnahme, die Messung am FACSCanto™ nach maximal acht Stunden.

3.3.1 Blutzellzählung

Das Hämatologiesystem ADVIA® 120 ist mit der Multispecies™ System Software V 3.1.8 MS ausgestattet. Im Modus CBC, 5-Zell-Diff und Retikulozytenzählung werden für die aktuelle Untersuchung die Parameter WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT, NEUT#, LYMPH#, MONO#, EO#, BASO#, NEUT%, LYMPH%, MONO%, EO%, BASO%, retic# und retic% verwendet. Gemessen werden noch zahlreiche andere Parameter, die für die vorliegende Untersuchung aber nicht herangezogen werden. Bei einem Blutverbrauch von 157 µl benötigt das Gerät ca. 50 Sekunden für die Messung.

Der Sysmex XT-2000iV arbeitet im Modus CBC, 5-Zell-Diff und Retikulozytenzählung mit der Softwareediton 00-10. Die Proben werden im Messmodus „Manual“ unverdünnt gemessen, wofür 85 µl Blut benötigt werden.

Für die Präzisionsmessungen erfolgen außerdem Messungen im Modus „Capillary“. Hierfür wird EDTA-Blut im Verhältnis 1:5 mit Cellpack™ Flüssigkeit (Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Deutschland) vermischt. Für die aktuellen Untersuchungen werden die Parameter WBC, RBC-I, RBC-O, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT-O, PLT-I, MPV, PCT, NEUT#, LYMPH#, MONO#, EO#, BASO#, NEUT%, LYMPH%, MONO%, EO%, BASO%, RET# und RET% verwendet. Weiterhin werden die Parameter PDW, RDW-CV, RDW-SD, PDW, P-LCR, LFR, MFR, HFR und IRF aufgezeichnet, die für diese Studie aber keine Verwendung finden.

Am XT-2000iV wird weiterhin die Population der retikulierten Thrombozyten für die Tierart Hund gemessen. Hierfür wird durch manuelles Gating ein Messprotokoll erstellt, das die Thrombozytenpopulation in verschiedene Reifungsstadien einteilt:

1. Nicht fluoreszierende Thrombozyten
2. Wenig fluoreszierende Thrombozyten
3. Mittel fluoreszierende Thrombozyten
4. Stark fluoreszierende Thrombozyten

Für den Methodenvergleich mit der durchflusszytometrischen Messung am FACSCanto™ Durchflusszytometer werden die Ergebnisse der drei Fluoreszenzstufen (2.-4.) addiert.

Die Analysegeräte wurden vom Hersteller kalibriert. Eine Qualitätskontrolle in drei verschiedenen Levels wird vom Hersteller bezogen und arbeitstäglich durchgeführt. Der XT-2000iV wird weiterhin durch tägliches Hochfahren vor und Herunterfahren nach der Messung (start-up, shut-down) in Stand gehalten.

3.3.2 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgen am FACSCanto™ Durchflusszytometer, das mit der BD FACSDiva™ Software v5.0.3 und der BD FACSCanto™ Software ausgestattet ist. Nach dem Hochfahren (start-up) erfolgt arbeitstäglich eine Geräteüberprüfung mittels vom Gerätehersteller vertriebenen BD FACS™ 7-Color-Setup Beads (BD, Heidelberg, Deutschland).

Für die durchflusszytometrischen Messungen werden die in Tabelle 3.1 aufgeführten Antikörper verwendet. In einem Vorversuch wurden die Antikörper mit Blut des Hundes austitriert, um geeignete Gebrauchsverdünnungen zu ermitteln.

Der Antikörper gegen das Oberflächenantigen CD9 ist von humaner Spezifität. Er bindet aber laut Herstellerangaben kreuzreaktiv an das entsprechende Oberflächenantigen der Spezies Hund.

Weiterhin wird ein Antikörper gegen CD34 eingesetzt. Die Ergebnisse aus diesen Messungen finden in der Auswertung für die vorliegende Studie allerdings keine Verwendung.

Tabelle 3.1: Verwendete monoklonale Antikörper gegen Oberflächenantigene caniner Leukozyten

Spezifität	Klon	Isotyp	Spezies	Fluoreszenz	Gebrauchs-Verdünnung
caninCD3	CA17.2A12	IgG1	Maus	FITC	unverdünnt
caninCD4	YKIX302.9	IgG2a	Ratte	PE	unverdünnt
caninCD5	YKIX322.3	IgG2a	Ratte	PE	1:2
caninCD8	YCATE55.9	IgG1	Ratte	FITC	unverdünnt
caninCD21	CA2.1D6	IgG1	Maus	PE	1:2
humanCD9	MM2/57	IgG2b	Maus	FITC	unverdünnt

Zu jedem Antikörper wird eine dazu passende Isotypkontrolle in gleicher Konzentration eingesetzt.

Die Blutpräparation erfolgt nach folgendem Schema:

1. Vorlegen von 100 µl Vollblut
2. Zugabe von 10 µl der jeweiligen Antikörperlösung und Vermischen durch vorsichtiges Schwenken
3. 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln
4. Zugabe von 2 ml BD FACS™ Lysing Solution (BD, Heidelberg, Deutschland), 1:10 verdünnt
5. 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln
6. 5 Minuten Zentrifugation (250 x g, 8°C) und anschließendes Abkippen des Überstandes
7. Resuspendieren des Zellpellets in 2 ml BD Cell Wash™ (BD, Heidelberg, Deutschland)
8. Erneute Zentrifugation (250 x g, 5 Minuten bei 8°C)
9. Abkippen des Überstandes und Resuspendieren mit 0,5 ml Cell Wash™ oder, bei Lagerung bis zu acht Stunden, Resuspendieren in 0,5 ml BD CellFIX™ (BD, Heidelberg, Deutschland)
10. Sofortige Messung im Anschluss bzw. Lagerung bei 8°C bis zur Messung

Nach Erstellen einer Arbeitsmappe in der Gerätesoftware werden pro Probe 40.000 Ereignisse (Leukozyten) gemessen und aufgezeichnet. In einem ersten Analyseschritt werden vom Durchflusszytometer Punktwolken anhand der morphologischen Parameter Größe und Granularität dargestellt. Anhand derer ist eine Differenzierung der einzelnen Populationen in neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Zellreste (Debris) möglich.

Eine Einstellung der Geräteparameter und Fluoreszenzen erfolgte in Vorversuchen und wurde, als Standardprofil abgespeichert, für alle weiteren Messungen verwendet.

Durch setzen eine Thresholdes wird der Debris weitestgehend von der Aufzeichnung ausgeschlossen.

Im zweiten Analyseschritt erfolgt die Darstellung der mit fluoreszierenden Antikörpern markierten Zellpopulationen. Die gemessene Fluoreszenz ist proportional zur Menge des gebundenen Farbstoffes und damit zur Dichte der Antigenexpression auf der Zelle. Die durch

die Messung der Isotypkontrolle ermittelten Anteile an unspezifischen Bindungen werden vom jeweiligen Endergebnis subtrahiert.

Am FACSCanto™ Durchflusszytometer erfolgt auch eine Messung der retikulierten Thrombozyten. Die Markierung der Zellen erfolgt hier mittels des Antikörpers gegen das Oberflächenmolekül CD61 (BD, Heidelberg, Deutschland). Der für humane Zellen spezifische Antikörper ist kreuzreaktiv zum entsprechenden Molekül auf den Thrombozyten des Hundes. Die geeignete Gebrauchsverdünnung (1:2) des PE-markierten Antikörpers vom Isotyp Maus IgG1κ, Klon VI-PL2, wurde in Vorversuchen ermittelt.

Die Darstellung der RNA-Reste und somit die Separierung der retikulierten Thrombozyten erfolgt mittels des Farbstoffes Thiazole Orange.

Hierfür kommt folgendes Färbeprotokoll zur Anwendung:

1. Vorlage von 50 µl Vollblut in Polystyren-Röhrchen
2. Zugabe von 50 µl PBS mit 1% Paraformaldehyd und 0,5% Glyoxal (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
3. 10 Minuten Fixation bei Raumtemperatur
4. Überführung von je 12 µl des fixierten Vollblutes in zwei Polystyren-Röhrchen
5. Zugabe von 20 µl Antikörperlösung zu beiden Proben (1:2 verdünnt)
6. 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln
7. Zugabe von 600 µl Thiazole Orange (BD Retic-Count™, BD Heidelberg, Deutschland) in das erste Röhrchen bzw. 600 µl PBS-Puffer in das zweite Röhrchen (als Kontrolle)
8. 60 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln
9. Sofortige Messung im Anschluss oder Lagerung bei 8°C bis zur Messung

Durch die Messung am Gerät wird mit den Parametern FSC (entspricht der Zellgröße) und SSC (entspricht der Granularität der Zelle) die Population der Thrombozyten dargestellt. Aus dieser Population heraus erfolgt die Ermittlung der CD61- und Thiazole orange-positiven retikulierten Thrombozyten. Als Kontrollprobe zu jeder Messung dienen mit CD61-Antikörper versetzte Proben, denen PBS zugegeben wird anstatt Thiazole Orange.

3.3.3 Manuelle Differenzierung

Zur manuellen Differenzierung werden Blutausstriche mit dem Gerät HEMAPREP® (J.P. Gilbert Co., Boyertown, PA, USA) angefertigt und luftgetrocknet. Anschließend erfolgt eine May-Grünwald-Giemsa-Färbung mittels des Gerätes AMES HEMA-TEC® Slide Stainer (Ames-Company, England), ausgestattet mit dem Färbeset Auto-Hemacolor® (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland). Am Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) wird eine 200-Zell-Differenzierung der Leukozyten durchgeführt.

3.4 Studienprotokoll

Die im folgenden Teil beschriebenen Versuche werden durchgeführt.

3.4.1 Präzisionsmessung innerhalb einer Serie mit Rattenblut

Die Überprüfung der Präzision innerhalb einer Serie erfolgt mittels mehrfacher Messung von K₃-EDTA-antikoagulierten Proben von Rattenblut an beiden Geräten. Am XT-2000iV werden die Messungen jeweils im Modus „Manual“ (unverdünnt) und „Capillary“ vorgenommen.

Die Messung erfolgt an beiden Geräten mit jeweils zwei verschiedenen Poolblutproben. Die erste Probe weist niedrige Werte für die Parameter WBC, Thrombozyten und die absoluten Werte des Differentialblutbildes auf. Die zweite Probe zeigt höhere Werte für diese Parameter.

Für die „hohe“ Probe wird das Blut von 12 Ratten gepoolt, für die „niedrige“ Probe, das von 10 Tieren.

Die ADVIA-Messung der „hohen“ Probe wird 25 Mal hintereinander durchgeführt. Die entsprechende Messung der „niedrigen“ Probe erfolgt aufgrund des niedrigeren zur Verfügung stehenden Gesamtvolumens 22-fach.

Die Proben werden am XT-2000iV im Modus „Manual“ 25-fach und im Modus „Capillary“ 26-fach gemessen. Für die Messung im Modus „Capillary“ wird das Blut im Verhältnis von 1:5 mit Cellpack Lösung verdünnt.

3.4.2 Methodenvergleich des XT-2000iV mit dem ADVIA® 120 und manueller Differenzierung mit Blutproben der Ratte

Es werden 151 Blutproben von Wistar-Ratten an den Geräten ADVIA® 120 und XT-2000iV gemessen. 75 Proben stammen von unbehandelten Tieren der Gruppe 1, 60 von unbehandelten Tieren der Gruppe 2 und 16 von behandelten Tieren der Gruppe 2. Der ADVIA® 120 wird hierbei als Referenzgerät definiert und die am XT-2000iV gemessenen Proben werden damit verglichen. Außerdem erfolgt eine manuelle Differenzierung von May-Grünwald-Giemsa gefärbten Blutaussstrichen. Die ermittelten Anteile der einzelnen Leukozytenpopulationen werden jeweils mit den entsprechenden Parametern beider Geräte verglichen.

3.4.3 Vergleich von Blutproben von Wistar Ratten aus unterschiedlicher Herkunft

Es werden 145 Proben von Tieren der Gruppe 1 und 63 Proben von Tieren der Gruppe 2 verwendet und am XT-2000iV gemessen.

Weiterhin erfolgt eine manuelle Differenzierung von May-Grünwald-Giemsa-gefärbten Ausstrichen. Für die Population der Gruppe-2-Tiere werden mit 33 männlichen und 30 weiblichen Tieren orientierende Referenzintervalle berechnet und den Referenzintervallen der Tiere der Gruppe 1 gegenübergestellt.

3.4.4 Referenzintervalle Ratte

Referenzintervalle für die Tierart Ratte (Stamm Wistar - Gruppe 1) werden für die Parameter des Analysegerätes Sysmex-XT-2000iV erstellt. Eingeschlossen werden 72 männliche und 73 weibliche Tiere.

3.4.5 Referenzintervalle Hund

Referenzintervalle für die Tierart Hund (Rasse Marshall Beagle) werden für die relevanten Parameter des Gerätes XT-2000iV erstellt. Für die durchflusszytometrischen Messungen am FACSCanto™ werden Referenzintervalle zu den Populationen T-Zellen (CD5+), T-Helferzellen (CD3+CD4+), zytotoxische T-Zellen (CD5+CD8+), B-Zellen (CD21+) und CD9-positive Zellen berechnet. Auch für das Verhältnis von hoch- zu niedrig-fluoreszierenden doppelt CD5- und CD8-positiven Zellen und für das Verhältnis von T-Helfer-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen werden Referenzintervalle erstellt.

Außerdem werden Referenzintervalle für die Population der retikulierten Thrombozyten für die Testmethoden am XT-2000iV und FACSCanto™ errechnet.

Zur Verfügung stehen Blutproben von jeweils 77 männlichen und weiblichen Tieren. Für die Berechnung der CD5-Unterpopulationen wird je eine Probe eines männlichen und weiblichen Tieres ausgeschlossen, da sich die einzelnen Zellpopulationen nicht trennen lassen. Somit stehen hier jeweils 76 Proben zur Verfügung.

3.4.6 Methodenvergleich für retikulierte Thrombozyten des Hundes

Retikulierte Thrombozyten werden für die Tierart Hund am FACSCanto™ Durchflusszytometer und am XT-2000iV gemessen. 154 Proben stehen für den XT-2000iV zur Verfügung, jedoch nur 153 Proben für das Durchflusszytometer, da eine dieser Proben als nicht beurteilbar zu bewerten ist.

Für beide Messmethoden wird außerdem jeweils eine 20-fache Präzisionsmessung mit einer Blutprobe eines Hundes durchgeführt. Am XT-2000iV erfolgt diese in den Messmodi „Manual“ und „Capillary“.

3.5 Statistik

Die gemessenen Daten werden in Excel-Tabellen übertragen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgt mit dem Statistikprogramm Analyse-it® Method Evaluation Edition (for Microsoft Excel™, Analyse-it Software Ltd., Leeds, UK).

3.5.1 Präzision

Aus den ermittelten Daten werden der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient errechnet.

3.5.2 Methodenvergleich

- a) Messung von Rattenblut am ADVIA® 120 und am XT-2000iV inklusive manueller Differenzierung

Die Ergebnisse von Zellzählung und Differentialblutbild des Rattenblutes werden mit Hilfe des Spearman Korrelationskoeffizienten, der Passing-Bablok Regression und mit Bland-Altman Analysen ausgewertet. Die Ergebnisse der Zellzählung (WBC, RBC, HCT, HGB, MCV, MCH, MCHC, PLT) der Geräte XT-2000iV und ADVIA® 120 werden miteinander verglichen; hierbei wird der ADVIA® 120 als Referenzmethode/Referenzgerät definiert. Mit den Ergebnissen der Retikulozytenzählung beider Geräte wird ebenso verfahren. Aus der Passing-Bablok Regression werden „intercept“ und „slope“ mit 95%igem Konfidenzintervall ermittelt und aus der Bland-Altman Analyse der „bias“ mit 95%iger Übereinstimmungs-

grenze. Zusätzlich wird der Spearman Korrelationskoeffizient (spearman's rank correlation coefficient (r_s)) angegeben.

Auch die Ergebnisse des Differentialblutbildes werden mit den oben beschriebenen Methoden ausgewertet. Bezüglich dieser Parameter werden sowohl beide Geräte miteinander, als auch jedes Gerät mit der manuellen Differenzierung verglichen. Die Korrelation wird wie folgt beurteilt (Papasouliotis, Cue et al. 1999):

$r = 0,93 - 0,99$	= exzellent
$r = 0,80 - 0,92$	= gut
$r = 0,59 - 0,79$	= ausreichend
$r < 0,59$	= schlecht

b) Messung der retikulierten Thrombozyten des Hundes an FACSCanto™ und XT-2000iV

Die statistische Auswertung des Vergleiches der beiden Methoden erfolgt auch hier mittels des Spearman Korrelationskoeffizienten, der Passing-Bablok Regression und der Bland-Altman Analyse. Als Referenzmethode wird die durchflusszytometrische Messung am FACSCanto™ definiert. Die Bewertung der Ergebnisse erfolgt wie oben beschrieben.

3.5.3 Vergleich von Blutproben von Wistar Ratten aus unterschiedlicher Herkunft

Die beiden Gruppen werden im Falle einer Normalverteilung der Daten per Student's t-Test verglichen. Sind die Daten mindestens einer Gruppe nicht normal verteilt, erfolgt der Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test. Die Überprüfung der Normalität der Daten erfolgt mittels Anderson-Darling-Test. P-Werte (p) $\leq 0,05$ sind signifikant.

3.5.4 Referenzintervalle

Zunächst wird mittels Anderson-Darling-Test die Normalverteilung der Daten überprüft. Zur Überprüfung der Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren wird bei normalverteilten Daten der Student's t-Test angewendet. Ist mindestens eine der zu vergleichenden Populationen nicht normal verteilt, wird der Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Geschlechtsspezifische, doppelseitige Referenzintervalle für die Tierarten Hund und Ratte werden im Falle einer Normalverteilung der Daten durch Ermittlung des arithmetischen Mittels $\pm 1,96$ -facher Standardabweichung ermittelt.

Es werden 95% der untersuchten Population in die Berechnung eingeschlossen. Angegeben werden die 2,5%- und 97,5%-Referenzlimits. Die 90% Konfidenzintervalle des oberen und unteren Referenzlimits werden ebenfalls berechnet. Sind die Daten nicht normal verteilt, wird eine logarithmische Transformierung durchgeführt. Resultiert dies in einer Normalverteilung der Daten, wird in derselben Weise verfahren, wie oben beschrieben. Ist eine logarithmische Transformierung nicht möglich, werden für die nicht normal verteilten Daten ebenfalls die 2,5%- und 97,5%-Referenzlimits per nicht-parametrischem Test errechnet. Eine Errechnung der 90% Konfidenzintervalle ist dann jedoch nicht möglich.

4 Ergebnisse

4.1 Präzisionsmessung an ADVIA® 120 und XT-2000iV für Blutproben der Ratte

Die Präzisionsmessung wird in dieser Studie innerhalb einer Serie an den Geräten ADVIA® 120 und XT-2000iV mit gepoolten Blutproben der Tierart Ratte durchgeführt.

Am XT-2000iV erfolgen die Messungen sowohl im Messmodus „Manual“ als auch im Modus „Capillary“.

Für die Blutzellzählung und die Blutzelldifferenzierung werden pro Messmethode jeweils zwei Proben verwendet. Eine mit höheren WBC-, Thrombozyten- und absoluten Werten des Differentialblutbildes und eine mit niedrigeren Werten für diese Parameter. Es werden jeweils die Standardabweichung und der Variationskoeffizient für die Hämatologiesysteme berechnet.

4.1.1 Blutzellzählung

Tabelle 4.1: Präzision des **ADVIA® 120** für die Parameter der Blutzellzählung der Tierart Ratte, Stamm Wistar, „high“ – Blutprobe, $n=1$, 25 fach-Messung

Parameter	Einheit	ADVIA® 120	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
WBC	10 ⁹ /l	10,34 +/- 0,159	1,54
RBC	10 ¹² /l	8,11 +/- 0,070	0,86
HGB	mmol	9,29 +/- 0,087	0,94
HCT	l/l	0,44 +/- 0,004	0,91
MCV	fl	53,69 +/- 0,216	0,40
MCH	fmol	1,14 +/- 0,011	0,96
MCHC	mmol/l	21,32 +/- 0,2	0,94
PLT	10 ⁹ /l	1182 +/- 34	2,88

Tabelle 4.2: Präzision des **ADVIA® 120** für die Parameter der Blutzellzählung der Tierart Ratte, Stamm Wistar, „low“ – Blutprobe, $n=1$, 22 fach-Messung

Parameter	Einheit	ADVIA® 120	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
WBC	$10^9/l$	4,19 +/- 0,113	2,70
RBC	$10^{12}/l$	8,16 +/- 0,091	1,12
HGB	mmol/l	9,15 +/- 0,08	0,87
HCT	l/l	0,43 +/- 0,004	0,93
MCV	fl	53,27 +/- 0,271	0,51
MCH	fmol	1,12 +/- 0,009	0,80
MCHC	mmol/l	21,06 +/- 0,154	0,73
PLT	$10^9/l$	822 +/- 35	4,26

Die Tabellen 4.1 und 4.2 zeigen, dass die Parameter der Blutzellzählung am ADVIA® 120 Variationskoeffizienten zwischen 0,4% und 4,26%, und somit gute bis exzellente Ergebnisse aufweisen. Die niedrigeren WBC- und PLT-Werte der „low“-Probe resultieren in höheren Variationskoeffizienten, verglichen mit denen der „high“-Probe. Der Variationskoeffizient der „low“-Probe liegt für die platelets bei 4,26% und ist gut.

Tabelle 4.3: Präzision des **XT-2000iV**, Modus „**Manual**“, für die Parameter der Blutzellzählung der Tierart Ratte, Stamm Wistar, „**high**“ – Blutprobe, $n=1$, 25 fach-Messung

Parameter	Einheit	XT-2000iV	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
WBC	$10^9/l$	10,39 +/- 0,114	1,10
RBC	$10^{12}/l$	8,32 +/- 0,025	0,30
HGB	mmol/l	9,57 +/- 0,037	0,39
HCT	l/l	0,45 +/- 0,001	0,22
MCV	fl	53,52 +/- 0,137	0,26
MCH	fmol	1,15 +/- 0,004	0,35
MCHC	mmol/l	21,5 +/- 0,100	0,47
PLT – O	$10^9/l$	887 +/- 16	1,80
PLT – I	$10^9/l$	873 +/- 15	1,72

Tabelle 4.4: Präzision des **XT-2000iV**, Modus „**Capillary**“, für die Parameter der Blutzellzählung der Tierart Ratte, Stamm Wistar, „**high**“ – Blutprobe, $n=1$, 26 fach-Messung

Parameter	Einheit	XT-2000iV	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
WBC	$10^9/l$	10,03 +/- 0,278	2,77
RBC	$10^{12}/l$	7,10 +/- 0,232	3,27
HGB	mmol/l	9,35 +/- 0,207	2,21
HCT	l/l	0,39 +/- 0,013	3,33
MCV	fl	55,33 +/- 0,133	0,24
MCH	fmol	1,32 +/- 0,060	4,55
MCHC	mmol/l	23,8 +/- 1,1	4,62
PLT – O	$10^9/l$	1146 +/- 27	2,36
PLT – I	$10^9/l$	959 +/- 34	3,55

Tabelle 4.5: Präzision des **XT-2000iV**, Modus „**Manual**“, für die Parameter der Blutzellzählung der Tierart Ratte, Stamm Wistar, „**low**“ – Blutprobe, $n=1$, 25 fach-Messung

Parameter	Einheit	XT-2000iV	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
WBC	$10^9/l$	3,62 +/- 0,092	2,54
RBC	$10^{12}/l$	8,58 +/- 0,047	0,55
HGB	mmol/l	9,58 +/- 0,05	0,52
HCT	l/l	0,45 +/- 0,003	0,67
MCV	fl	52,60 +/- 0,301	0,57
MCH	fmol	1,11 +/- 0,009	0,81
MCHC	mmol/l	21,20 +/- 0,229	1,08
PLT – O	$10^9/l$	687 +/- 12	1,75
PLT – I	$10^9/l$	757 +/- 12	1,59

Tabelle 4.6: Präzision des **XT-2000iV**, Modus „**Capillary**“, für die Parameter der Blutzellzählung der Tierart Ratte, Stamm Wistar, „**low**“ – Blutprobe, $n=1$, 26 fach-Messung

Parameter	Einheit	XT-2000iV	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
WBC	$10^9/l$	3,55 +/- 0,272	7,66
RBC	$10^{12}/l$	7,39 +/- 0,105	1,42
HGB	mmol/l	9,05 +/- 0,183	2,02
HCT	l/l	0,41 +/- 0,006	1,46
MCV	fl	55,33 +/- 0,119	0,22
MCH	fmol	1,23 +/- 0,033	2,68
MCHC	mmol/l	22,16 +/- 0,611	2,76
PLT – O	$10^9/l$	951 +/- 22	2,31
PLT – I	$10^9/l$	801 +/- 24	3,00

Die Parameter der Blutzellzählung der „high“-Probe im Modus „Manual“ des XT-2000iV weisen mit Variationskoeffizienten von 0,22% bis 1,80% exzellente Ergebnisse auf. Im Modus „Capillary“ liegen die Variationskoeffizienten mit 0,24% bis 4,62% bei den meisten Parametern etwas höher. Diese Erhöhung des Variationskoeffizienten betrifft hier vor allem RBC, HGB, MCH und MCHC.

Für die „low“-Probe ergeben sich im Modus „Manual“ Variationskoeffizienten zwischen 0,52% und 2,54%. Diese Werte sind ebenfalls sehr gut bis exzellent. Der Variationskoeffizient für den Parameter WBC ist für die „low“-Probe etwas höher (2,54%) als für die „high“-Probe (1,10%).

Die Ergebnisse der Messung der „low“-Probe im Modus „Capillary“ ergeben Variationskoeffizienten von 1,42% bis 7,66%. Für den Parameter MCV (0,22%) fällt das Ergebnis exzellent aus. Vor allem der Variationskoeffizient für WBC ist hier mit 7,66% deutlich höher als der Wert, der zuvor dargestellten Berechnungen. Der Wert für RBC und somit auch die Ergebnisse für HCT, MCH und MCHC fallen bei dieser Messung besser aus, als bei der Messung dieser Probe im Modus „Manual“.

4.1.2 Blutzellendifferenzierung

Tabelle 4.7: Präzision des **ADVIA® 120** für die Parameter der Blutzellendifferenzierung der Tierart Ratte, Stamm Wistar, „**high**“ – Blutprobe, $n=1$, 25 fach-Messung

Parameter	Einheit	ADVIA® 120	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
Neutrophile	%	15,39 +/- 0,503	3,27
Neutrophile	10 ⁹ /l	1,59 +/- 0,054	3,40
Lymphozyten	%	79,67 +/- 0,790	0,99
Lymphozyten	10 ⁹ /l	8,23 +/- 0,134	1,63
Monozyten	%	2,42 +/- 0,645	26,65
Monozyten	10 ⁹ /l	0,25 +/- 0,070	28,00
Eosinophile	%	1,61 +/- 0,169	10,50
Eosinophile	10 ⁹ /l	0,17 +/- 0,016	9,41

Tabelle 4.8: Präzision des **ADVIA® 120** für die Parameter der Blutzellendifferenzierung der Tierart Ratte, Stamm Wistar, „**low**“ – Blutprobe, $n=1$, 22 fach-Messung

Parameter	Einheit	ADVIA® 120	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
Neutrophile	%	13,33 +/- 0,769	5,77
Neutrophile	10 ⁹ /l	0,56 +/- 0,035	6,25
Lymphozyten	%	81,87 +/- 0,826	1,01
Lymphozyten	10 ⁹ /l	3,43 +/- 0,103	3,00
Monozyten	%	1,81 +/- 0,269	14,86
Monozyten	10 ⁹ /l	0,08 +/- 0,012	15,00
Eosinophile	%	2,45 +/- 0,350	14,29
Eosinophile	10 ⁹ /l	0,10 +/- 0,015	15,00

Die Ergebnisse für die Blutzellendifferenzierung in relativen und absoluten Werten am ADVIA® 120 zeigen für die neutrophilen Granulozyten und die Lymphozyten gute bis exzellente Ergebnisse mit Variationskoeffizienten zwischen 0,99% und 6,25%. Hierbei sind die Werte der „low“-Probe etwas höher. Die Werte für die Eosinophilen sind mit 9,41% und 10,50% für die „high“-Probe und 15,00% und 14,29% für die „low“-Probe noch akzeptabel. Für die Monozyten sind hingegen die Werte der „high“-Probe (26,65%, 28,00%) deutlich schlechter als die der „low“-Probe (14,68%, 15,00%).

Tabelle 4.9: Präzision des **XT-2000iV**, Modus „**Manual**“ für die Parameter der Blutzellendifferenzierung der Tierart Ratte, Stamm Wistar, „**high**“ – Blutprobe, $n=1$, 25 fach-Messung

Parameter	Einheit	XT-2000iV	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
Neutrophile	%	13,52 +/- 0,493	3,65
Neutrophile	10 ⁹ /l	1,41 +/- 0,054	3,83
Lymphozyten	%	77,59 +/- 0,558	0,72
Lymphozyten	10 ⁹ /l	8,06 +/- 0,101	1,25
Monozyten	%	7,60 +/- 0,323	4,25
Monozyten	10 ⁹ /l	0,79 +/- 0,036	4,56
Eosinophile	%	1,22 +/- 0,140	11,48
Eosinophile	10 ⁹ /l	0,13 +/- 0,015	11,54

Tabelle 4.10: Präzision des **XT-2000iV**, Modus „**Capillary**“ für die Parameter der Blutzellendifferenzierung der Tierart Ratte, Stamm Wistar, „**high**“ – Blutprobe, $n=1$, 26 fach-Messung

Parameter	Einheit	XT-2000iV	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
Neutrophile	%	16,36 +/- 1,685	10,30
Neutrophile	10 ⁹ /l	1,64 +/- 0,193	11,77
Lymphozyten	%	75,13 +/- 1,785	2,38
Lymphozyten	10 ⁹ /l	7,53 +/- 0,172	2,28
Monozyten	%	6,80 +/- 1,326	19,50
Monozyten	10 ⁹ /l	0,68 +/- 0,137	20,15
Eosinophile	%	1,57 +/- 0,446	28,41
Eosinophile	10 ⁹ /l	0,16 +/- 0,046	28,75

Tabelle 4.11: Präzision des **XT-2000iV**, Modus „**Manual**“ für die Parameter der Blutzellendifferenzierung der Tierart Ratte, Stamm Wistar, „**low**“ – Blutprobe, $n=1$, 25 fach-Messung

Parameter	Einheit	XT-2000iV	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
Neutrophile	%	11,56 +/- 0,885	7,66
Neutrophile	10 ⁹ /l	0,42 +/- 0,036	8,57
Lymphozyten	%	81,64 +/- 1,539	1,89
Lymphozyten	10 ⁹ /l	2,95 +/- 0,063	2,14
Monozyten	%	4,94 +/- 1,029	20,83
Monozyten	10 ⁹ /l	0,18 +/- 0,038	21,11
Eosinophile	%	1,83 +/- 0,454	24,81
Eosinophile	10 ⁹ /l	0,07 +/- 0,017	24,29

Tabelle 4.12 Präzision des **XT-2000iV**, Modus „**Capillary**“ für die Parameter der Blutzelldifferenzierung der Tierart Ratte, Stamm Wistar, „**low**“ – Blutprobe, $n=1$, 26 fach-Messung

Parameter	Einheit	XT-2000iV	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
Neutrophile	%	16,27 +/- 2,798	17,20
Neutrophile	10 ⁹ /l	0,58 +/- 0,124	21,38
Lymphozyten	%	76,12 +/- 4,336	5,70
Lymphozyten	10 ⁹ /l	2,69 +/- 0,166	6,17
Monozyten	%	4,78 +/- 2,456	51,38
Monozyten	10 ⁹ /l	0,17 +/- 0,090	52,94
Eosinophile	%	2,54 +/- 1,156	45,51
Eosinophile	10 ⁹ /l	0,09 +/- 0,047	52,22

Die Ergebnisse der prozentualen und absoluten Zellzahlen der Messung im Modus „Manual“ am XT-2000iV für die Neutrophilen und Lymphozyten sind in etwa mit denen des ADVIA® 120 vergleichbar. Für die Monozytenzahl der „high“-Probe ergibt die Messung im Modus „Manual“ gute Ergebnisse, für die „low“-Probe sind diese mäßig. Auch für die Eosinophilen ergeben sich mit 11,48% bis 24,81% akzeptable bis mäßige Ergebnisse.

Im Modus „Capillary“ erfolgt eine weitere Erhöhung der Variationskoeffizienten für die Parameter der Blutzelldifferenzierung. Für die Lymphozyten fällt diese am geringsten aus, während die Eosinophilen (45,51% und 52,22%) und die Monozyten (51,38% und 52,94%) der „low“-Probe in diesem Messprofil die schlechtesten Werte aufweisen.

4.1.3 Retikulozytenzählung

Tabelle 4.13: Präzision des **ADVIA® 120** für die Retikulozytenzählung der Tierart Ratte, Stamm Wistar, $n=1$, 25 fach-Messung

Parameter	Einheit	ADVIA® 120	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
Retikulozyten	$10^9/l$	242,4 +/- 8,77	3,62
Retikulozyten	%	2,99 +/- 0,097	3,24

Tabelle 4.14: Präzision des **XT-2000iV**, Modus „**Manual**“, für die Retikulozytenzählung der Tierart Ratte, Stamm Wistar $n=1$, 25 fach-Messung

Parameter	Einheit	XT-2000iV	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
Retikulozyten	$10^9/l$	313,6 +/- 10,43	3,33
Retikulozyten	%	3,65 +/- 0,122	3,34

Tabelle 4.15: Präzision des **XT-2000iV**, Modus „**Capillary**“, für die Retikulozytenzählung der Tierart Ratte, Stamm Wistar, $n=1$, 26 fach-Messung

Parameter	Einheit	XT-2000iV	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
Retikulozyten	$10^9/l$	234,6 +/- 11,88	5,06
Retikulozyten	%	3,18 +/- 0,159	5,00

Die Ergebnisse für die relativen und absoluten Retikulozytenzählungen stimmen in etwa überein und liegen im Modus „Capillary“ des XT-2000iV etwas über denen des Modus

„Manual“ und des ADVIA® 120. Die Ergebnisse für den ADVIA® 120 und den XT-2000iV (Modus „Manual“) sind vergleichbar.

4.2 Methodenvergleich des XT-2000iV mit dem ADVIA® 120 und manueller Differenzierung mit Blutproben der Ratte

Im weiteren Abschnitt „Ergebnisse“ werden die Abbildungen der statistischen Auswertung nur zum Teil gezeigt. Alle weiteren sind auf der beiliegenden CD zu sehen.

Im Methodenvergleich erfolgt mittels Blutproben der Ratte die Überprüfung der Richtigkeit und des systematischen Fehlers einer Methode. Der XT-2000iV wird mit dem ADVIA® 120 verglichen, der in diesem Versuch als Referenzgerät definiert wird. Außerdem werden die Messergebnisse der automatischen Blutzellendifferenzierung mit der manuellen Auswertung verglichen.

Im folgenden Teil werden die Ergebnisse von Spearman Korrelation, Passing Bablok Regression und Bland-Altman Analyse gezeigt. Der Korrelationskoeffizient, der anhand der Spearman Korrelation errechnet wird, dient der Beurteilung eines linearen Zusammenhanges im Vergleich zweier Methoden und der Beurteilung der Datenverteilung (Westgard 2003).

Weiterhin werden die Steigung und der y-Achsenabschnitt mit dem jeweiligen 95% Konfidenzintervall angegeben, welche aus der Passing Bablok Regression errechnet werden. Außerdem erfolgt die Berechnung des „bias“ (= Mittelwertunterschied) mit 95%iger Übereinstimmungsgrenze mit der Bland-Altman Analyse. Mittels dieser Werte können sowohl proportionale als auch konstante Fehler beurteilt werden.

Eine Korrelation von 1 bedeutet eine optimale Übereinstimmung der verglichenen Methoden. Je niedriger dieser Wert ist, umso höher ist also die Streuung der Daten.

Oben genannte Methoden werden zur Beurteilung des systematischen Fehlers verwendet (Westgard 2003). Der Gesamtfehler (total error) setzt sich aus dem systematischen und dem willkürlichen Fehler, der der Präzision des Gerätes entspricht, zusammen.

4.2.1 Blutzellzählung

In der folgenden Tabelle 4.16 werden die Ergebnisse des Methodenvergleichs für die Zellzählung des XT-2000iV mit dem ADVIA® 120 gezeigt.

Tabelle 4.16: Methodenvergleich des XT-2000iV mit dem ADVIA® 120 für die Parameter der Blutzellzählung; r_s = Spearman Korrelationskoeffizient; intercept und slope aus Passing Bablok Regression; bias aus Bland-Altman Analyse; Tierart Ratte, Stamm Wistar, $n = 151$

Parameter	Einheit	r_s	slope (95% CI)	intercept (95% CI)	bias (95% Limits of agreement)
WBC	$10^9/l$	0,99	0,99 (0,97 bis 1,00)	0,09 (0,01 bis 0,18)	-0,002 (-0,783 bis 0,779)
RBC	$10^{12}/l$	0,89	1,02 (0,95 bis 1,07)	0,31 (-0,04 bis 0,92)	0,50 (-0,109 bis 1,116)
HGB	mmol	0,77	1,00 (1,00 bis 1,04)	0,40 (-0,09 bis 0,40)	0,32 (-0,51 bis 1,15)
HCT	l/l	0,75	0,82 (0,71 bis 0,91)	9,52 (5,84 bis 14,21)	2,00 (-1,18 bis 5,18)
MCH	fmol	0,89	0,71 (0,63 bis 0,82)	4,53 (2,70 bis 6,02)	-0,70 (-2,21 bis 0,82)
MCHC	mmol/l	0,25	0,26 (0,19 bis 0,36)	25,44 (21,85 bis 28,11)	-1,10 (-4,71 bis 2,52)
MCV	fl	0,91	1,43 (1,35 bis 1,51)	-22,74 (-26,94 bis -18,55)	-0,18 (-5,49 bis 5,12)
PLT-I	$10^9/l$	0,94	0,90 (0,86 bis 0,93)	-54,40 (-96,85 bis -19,83)	-162,5 (-318,9 bis -6,1)

Die Parameter WBC, RBC, MCH, MCV, und PLT zeigen gute bis exzellente Korrelationskoeffizienten zwischen 0,89 und 0,99. Bei den Parametern HGB und HCT sind die Werte als ausreichend zu bezeichnen. Für den Parameter MCHC ist die Korrelation schlecht.

Die folgende Abbildung 4.1 stellt ein Beispiel für eine optimale Übereinstimmung der beiden Messgeräte dar. Für den Parameter Gesamtleukozytenzahl (WBC) liegt der Korrelationskoeffizient bei 0,99, die Steigung liegt nahe dem Wert 1 und der Schnittpunkt mit der y-Achse liegt fast bei 0.

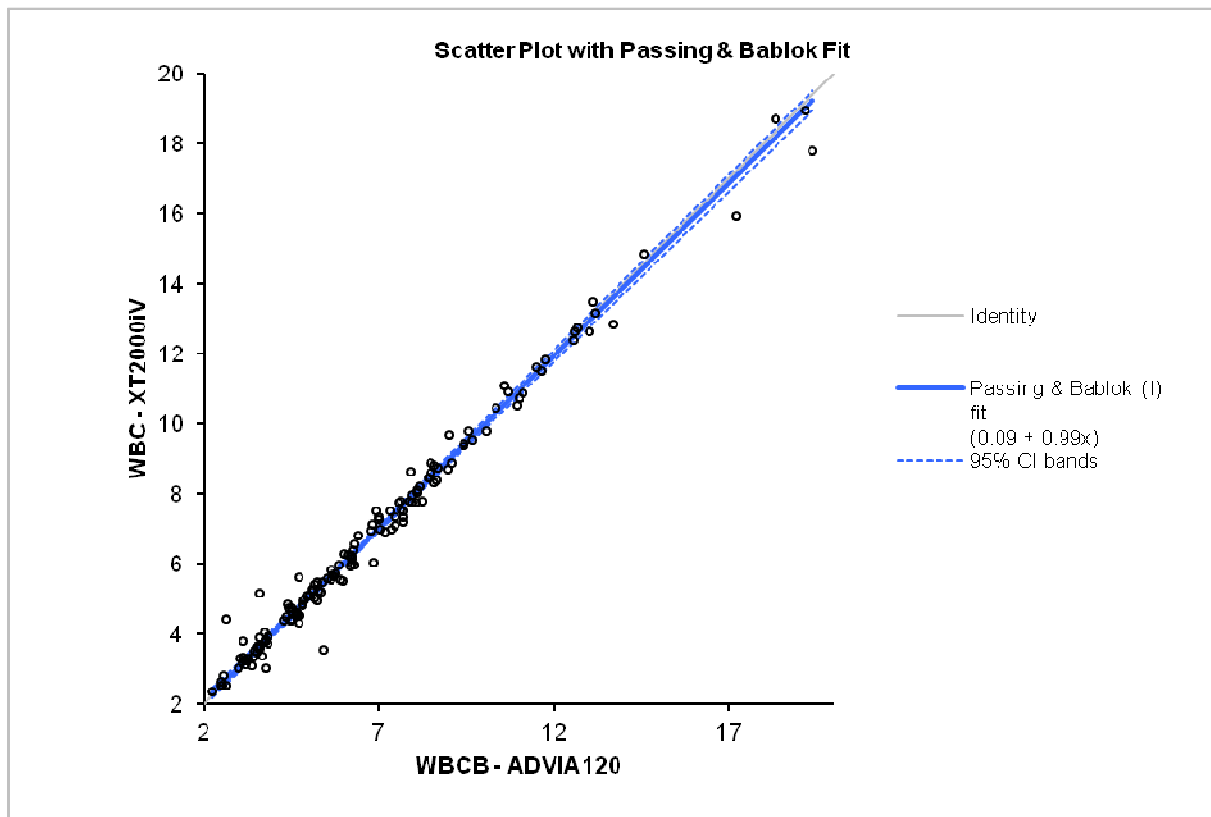


Abbildung 4.1: Passing Bablok Regression für den Parameter WBC, Vergleich XT-2000iV mit ADVIA® 120; Tierart Ratte, Stamm Wistar

In der Abbildung 4.2 ist die Passing Bablok Regression für den Parameter PLT zu sehen. Der Korrelationskoeffizient liegt hier mit 0,94 im sehr guten Bereich. Jedoch sieht man, dass die höheren Messwerte etwas stärker divergieren als die niedrigen. Die Messwerte des ADVIA® 120 liegen über denen des XT-2000iV. Der slope hat nur einen Wert von 0,9 und der intercept liegt bei -54,5. Somit liegt jeweils ein geringgradiger proportionaler und konstanter Fehler vor. Das wird bei alleiniger Betrachtung des Korrelationskoeffizienten nicht deutlich. Weiterhin wird ersichtlich, dass die Werte des ADVIA® 120 etwas höher liegen als die des XT-2000iV.

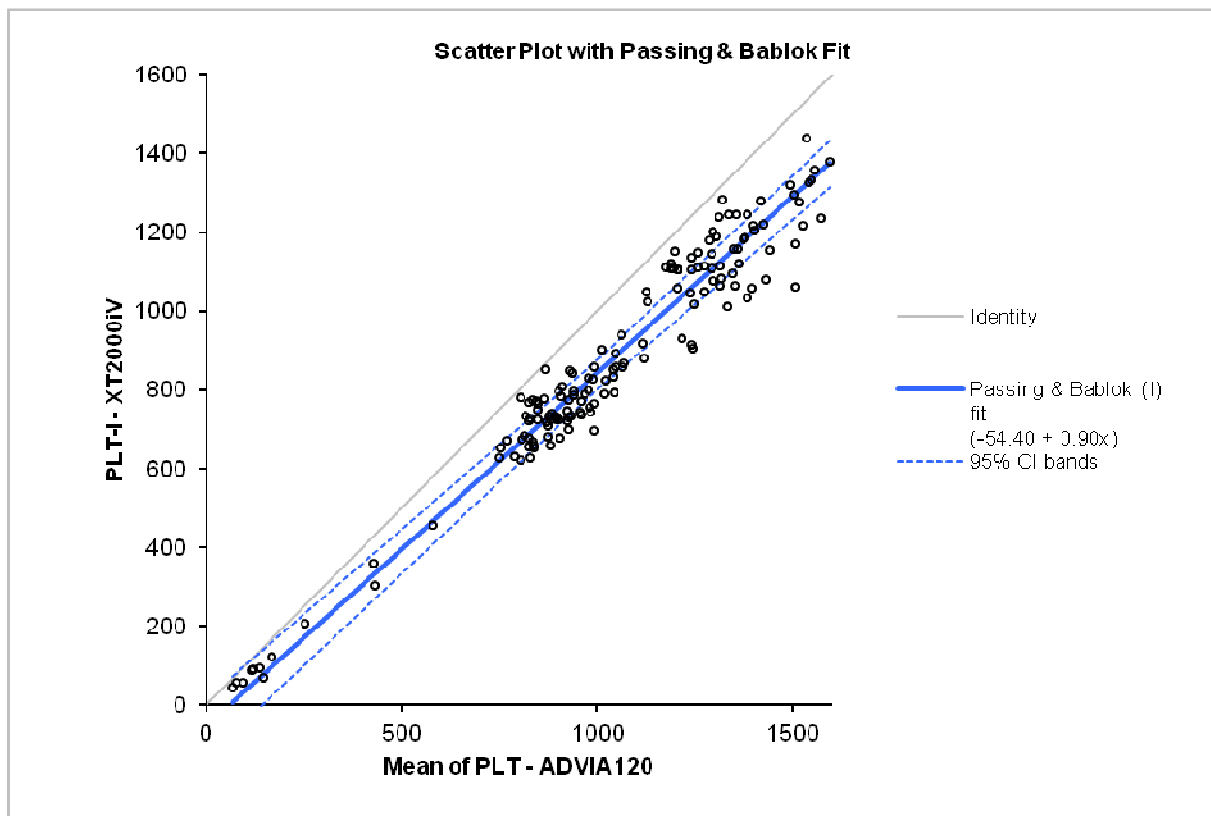


Abbildung 4.2: Passing Bablok Regression für den Parameter platelets, Vergleich XT-2000iV mit ADVIA® 120; Tierart Ratte, Stamm Wistar

Ein proportionaler Fehler ist auch für die Parameter HCT, MCH, MCHC und MCV zu erkennen. Der bias für die platelets liegt im negativen Bereich.

Folgende Abbildung 4.3 zeigt die Passing Bablok Regression für den Parameter MCV. Hier wird ersichtlich, dass im niedrigen Messbereich die Werte des ADVIA® 120 etwas über denen des XT-2000iV liegen. Bei höheren Werten verschiebt sich dieses Verhältnis; hier misst der XT-2000iV höhere Werte.

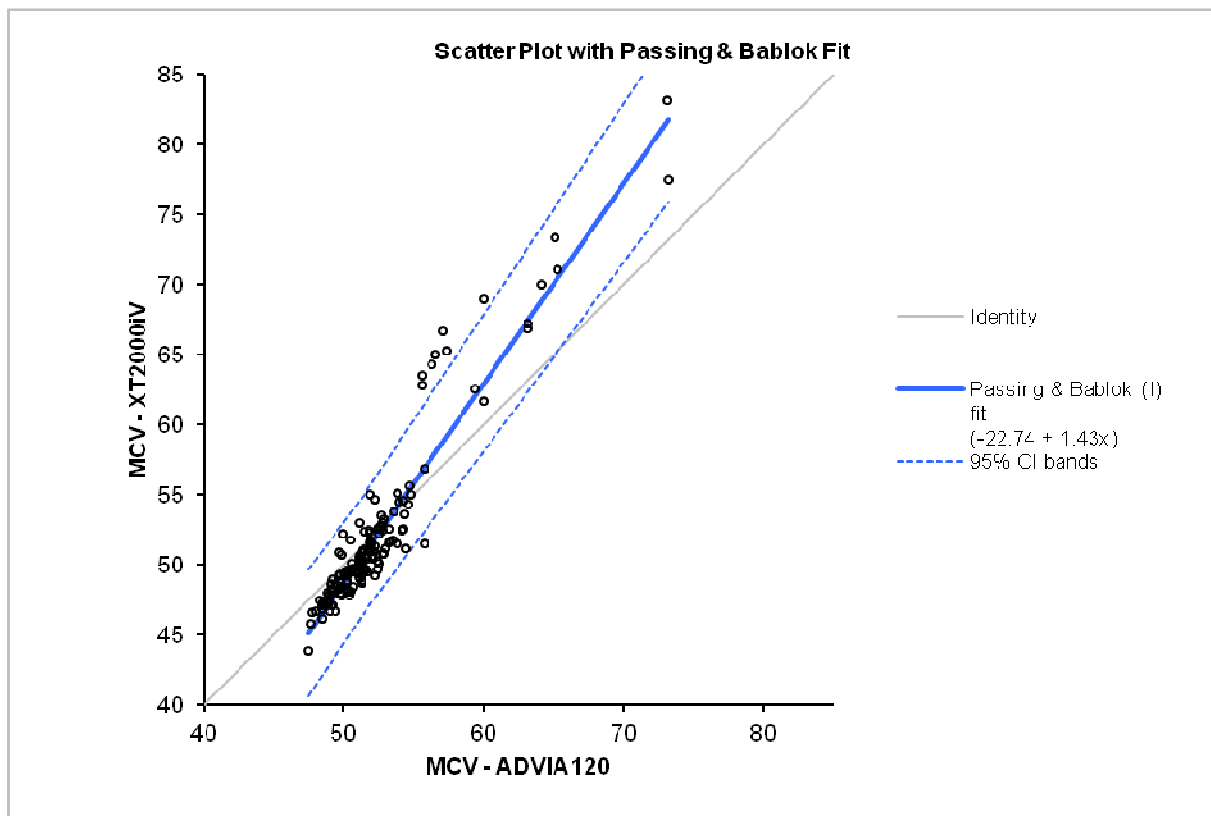


Abbildung 4.3: Passing Bablok Regression für den Parameter MCV, Vergleich XT-2000iV mit ADVIA® 120; Tierart Ratte, Stamm Wistar

In der folgenden Abbildung 4.4 ist die Passing Bablok Regression für den Parameter RBC zu sehen. Dieser weist einen guten Wert für die Steigung auf (1,02) und hat einen Schnittpunkt mit der y-Achse bei 0,31. Die blaue Gerade ist etwas parallel verschoben im Vergleich zur grauen Winkelhalbierenden. Es ist somit erkennbar, dass fast alle mit dem XT-2000iV gemessenen Werte etwas höher liegen als die des ADVIA 120. Für diesen Parameter liegt also ein geringer konstanter Fehler vor.

Gleichzeitig wird in dieser Abbildung die geringe Verteilungsbreite der gemessenen Werte deutlich. Die meisten befinden sich im Messbereich von 7 bis 10 ($10^{12}/L$).

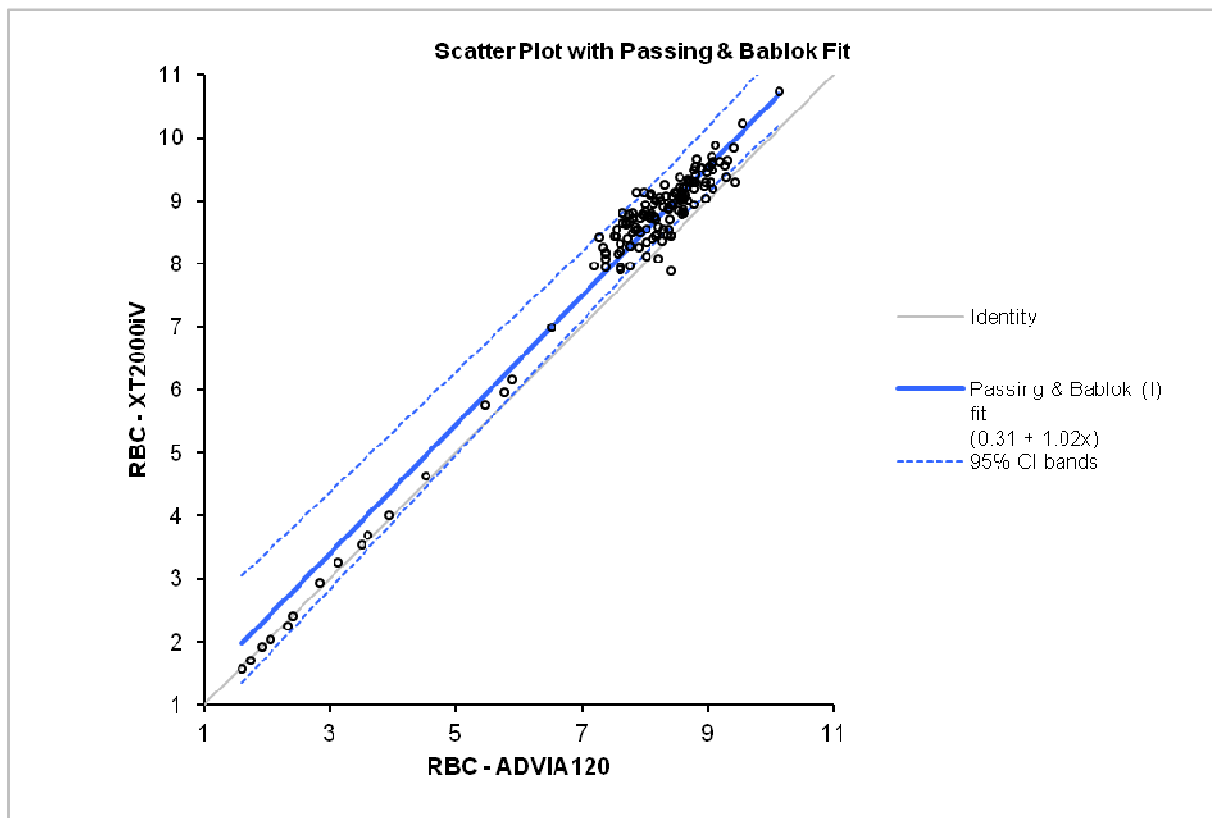


Abbildung 4.4: Passing Bablok Regression für den Parameter RBC, Vergleich XT-2000iV mit ADVIA® 120; Tierart Ratte, Stamm Wistar

4.2.2 Differentialblutbild

Im Methodenvergleich für das Differentialblutbild werden die Ergebnisse des XT-2000iV und des ADVIA® 120 jeweils mit der manuellen Leukozytendifferenzierung verglichen. Für diese werden May-Grünwald-Giemsa gefärbte Blutausstriche verwendet. Es werden jeweils 200 Leukozyten differenziert. Außerdem erfolgt ein Vergleich beider Geräte miteinander.

Tabelle 4.17: Methodenvergleich des XT-2000iV mit der manuellen Leukozytendifferenzierung für die Parameter der Blutzelldifferenzierung; r_s = Spearman Korrelationskoeffizient; intercept und slope aus Passing Bablok Regression; bias aus Bland-Altman Analyse; Tierart Ratte, Stamm Wistar, $n = 151$

Parameter	Einheit	r_s	slope (95% CI)	intercept (95% CI)	bias (95% Limits of agreement)
Neutrophile	%	0,82	0,89 (0,80 bis 1,00)	0,20 (-0,80 bis 1,40)	-0,96 (-7,17 bis 5,25)
Lymphozyten	%	0,75	0,97 (0,86 bis 1,10)	2,86 (-8,55 bis 11,80)	0,01 (-8,06 bis 8,08)
Monozyten	%	0,16	0,90 (0,69 bis 1,20)	1,55 (0,40 bis 2,20)	1,25 (-3,29 bis 5,78)
Eosinophile Granulozyten	%	0,54	0,53 (0,40 bis 0,63)	0,54 (0,36 bis 0,80)	-0,24 (-2,61 bis 2,12)

Tabelle 4.18: Methodenvergleich des ADVIA® 120 mit der manuellen Leukozyten-differenzierung für die Parameter der Blutzelldifferenzierung; r_s = Spearman Korrelationskoeffizient; intercept und slope aus Passing Bablok Regression; bias aus Bland-Altman Analyse; Tierart Ratte, Stamm Wistar, $n = 151$

Parameter	Einheit	r_s	slope (95% CI)	intercept (95% CI)	bias (95% Limits of agreement)
Neutrophile	%	0,82	0,86 (0,78 bis 0,95)	2,63 (1,43 bis 3,53)	0,76 (-5,03 bis 6,55)
Lymphozyten	%	0,74	0,80 (0,71 bis 0,91)	15,40 (6,68 bis 22,79)	-0,84 (-8,60 bis 6,92)
Monozyten	%	0,28	0,24 (0,18 bis 0,32)	1,36 (1,12 bis 1,58)	-1,32 (-4,73 bis 2,08)
Eosinophile Granulozyten	%	0,44	0,40 (0,30 bis 0,50)	1,00 (0,90 bis 1,10)	0,05 (-2,46 bis 2,57)

Der Vergleich der Geräte mit der manuellen Differenzierung ergibt für die Parameter neutrophile Granulozyten und Lymphozyten zufriedenstellende bis gute Korrelationskoeffizienten. Für die eosinophilen Granulozyten und die Monozyten sind die Werte dagegen schlecht. Vor allem für die Eosinophilen fällt für beide Geräte ein großer proportionaler Fehler auf.

Tabelle 4.19: Methodenvergleich des ADVIA® 120 mit dem XT-2000iV für die Parameter der Blutzellendifferenzierung; r_s = Spearman Korrelationskoeffizient; intercept und slope aus Passing Bablok Regression; bias aus Bland-Altman Analyse; Tierart Ratte, Stamm Wistar, $n = 151$

Parameter	Einheit	r_s	slope (95% CI)	intercept (95% CI)	bias (95% Limits of agreement)
Neutrophile Granulozyten	$10^9/l$	0,64	0,93 (0,87 bis 0,99)	-0,05 (-0,09 bis -0,01)	-0,03 (-0,70 bis 0,636)
Neutrophile Granulozyten	%	0,94	1,04 (1,0 bis 1,09)	-2,16 (-2,95 bis -1,80)	-1,72 (-5,05 bis 1,61)
Lymphozyten	$10^9/l$	0,99	1,01 (0,99 bis 1,02)	0,02 (-0,04 bis 0,10)	0,06 (-0,656 bis 0,775)
Lymphozyten	%	0,84	1,20 (1,10 bis 1,29)	-15,74 (-23,54 bis -7,69)	0,85 (-4,88 bis 6,58)
Monozyten	$10^9/l$	0,79	2,40 (2,15 bis 2,69)	-0,04 (-0,08 bis 0,00)	0,17 (-0,147 bis 0,495)
Monozyten	%	0,41	3,40 (2,63 bis 4,50)	-2,80 (-5,15 bis -1,06)	2,57 (-0,53 bis 5,67)
Eosinophile Granulozyten	$10^9/l$	0,85	1,17 (1,00 bis 1,30)	-0,03 (-0,04 bis -0,01)	-0,02 (-0,08 bis 0,05)
Eosinophile Granulozyten	%	0,72	1,24 (1,07 bis 1,40)	-0,59 (-0,84 bis -0,30)	-0,30 (-1,39 bis 0,80)
Basophile Granulozyten	$10^9/l$	0,46	0,0	0,0	-0,04 (-0,11 bis 0,03)
Basophile Granulozyten	%	0,23	0,0	0,0	-0,61 (-1,31 bis 0,10)

Der Vergleich der beiden Geräte miteinander zeigt gute bis exzellente Korrelationen für die Messungen der Prozentwerte der neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten sowie für die Absolutwerte der Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten. Die Korrelationskoeffizienten der neutrophilen Granulozyten und Monozyten (absolut) sowie der eosino-

philen Granulozyten (relativ) sind als ausreichend zu bezeichnen, während der Wert für die Monozyten (relativ) schlecht ist. Wie in der Abbildung 4.5 zu erkennen ist, besteht für die Monozyten weiterhin ein großer proportionaler Fehler. Die meisten Messergebnisse für die einzelnen Proben fallen beim XT-2000iV deutlich höher aus als beim ADVIA® 120.

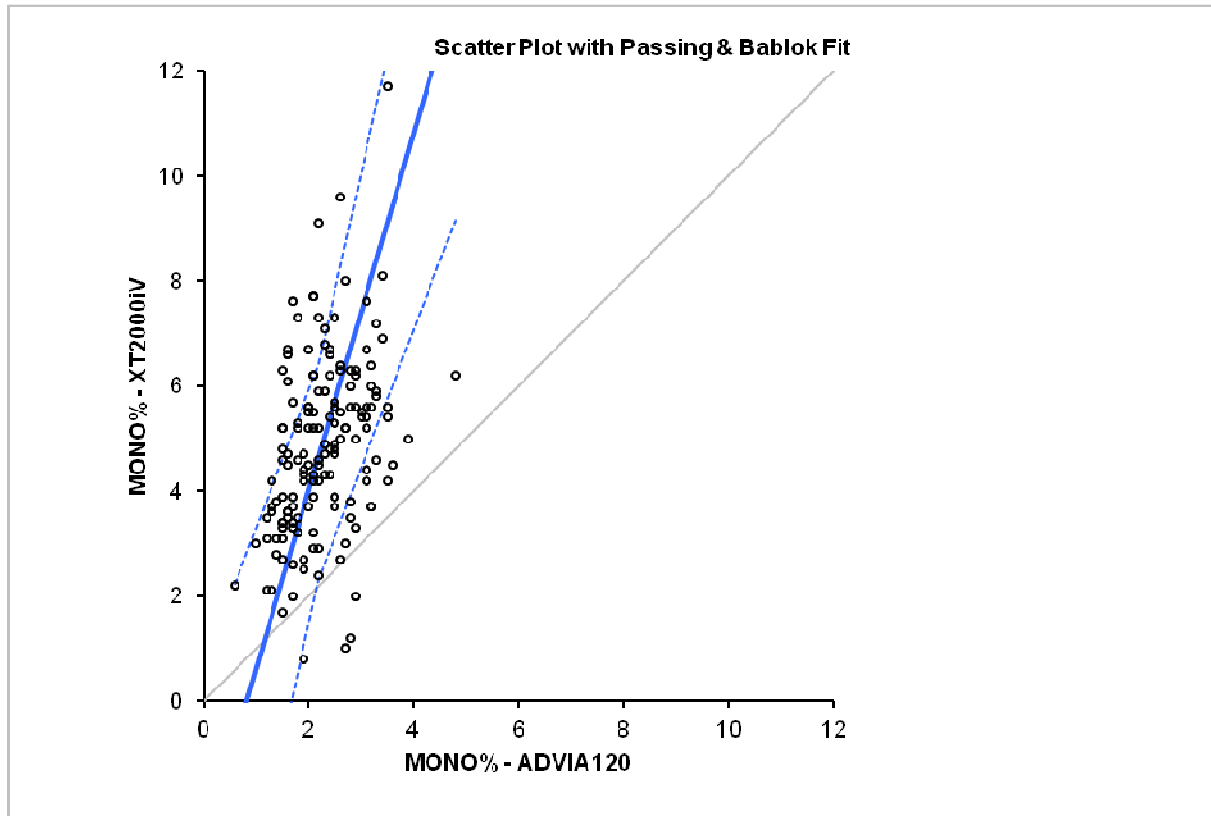


Abbildung 4.5: Passing Bablok Regression für den Parameter Monozyten (%), Vergleich XT-2000iV mit ADVIA® 120; Tierart Ratte, Stamm Wistar

4.2.3 Retikulozytenzählung

Tabelle 4.20: Methodenvergleich des ADVIA® 120 mit dem XT-2000iV für die Parameter der Retikulozytenzählung; r_s = Spearman Korrelationskoeffizient; intercept und slope aus Passing Bablok Regression; bias aus Bland-Altman Analyse, $n = 151$

Parameter	Einheit	r_s	slope (95% CI)	intercept (95% CI)	bias (95% Limits of agreement)
Retikulozyten	$10^9/l$	0,83	1,77 (1,63 bis 1,95)	-0,02 (-0,05 bis 0,0)	0,1 (0,01 bis 0,18)
Retikulozyten	%	0,92	1,43 (1,32 bis 1,54)	0,19 (-0,05 bis 0,37)	1,01 (0,17 bis 1,85)

Im Vergleich der Retikulozytenzählung der beiden Geräte wird ein proportionaler Fehler sichtbar. Die Steigung ist > 1 (Slope = 1,77 bzw. 1,43). Dies bedeutet, dass die Ergebnisse des XT-2000iV über denen des ADVIA® 120 liegen. Die Korrelationskoeffizienten sind gut.

4.3 Vergleich von Blutproben von Wistar Ratten aus unterschiedlicher Herkunft

Hämatologische Werte zweier Gruppen von Ratten des Stammes Wistar, bezogen von verschiedenen Züchtern, werden miteinander verglichen. Die Messungen erfolgen am XT-2000iV.

Tabelle 4.21: Unterschiede in hämatologischen Werten zwischen männlichen Wistar-Ratten des Züchters 1 ($n = 72$) und 2 ($n = 33$); 95% Referenzintervalle für beide Gruppen; Normalität der Daten

Parameter	Referenzintervall männliche Ratten Gruppe 1**	Referenzintervall männliche Ratten Gruppe 2**	P-Wert††	Verteilung der Daten, Gruppe 1	Verteilung der Daten, Gruppe 2
WBC ($10^9/l$)	3,58-9,45	6,6-14,36	<0,0001	L. normal	Normal
RBC ($10^{12}/l$)	8,10-9,59	8,30-10,06	0,0001	Normal	Normal
HGB (mmol/l)	8,99-10,30	RI nicht zu berechnen	0,30	Normal	N. normal
HCT (l/l)	0,41-0,48	RI nicht zu berechnen	0,33	N. normal	N. normal
MCV (fl)	46,22-54,95	45,78-51,98	0,0001	Normal	Normal
MCH (fmol)	0,86-1,17	RI nicht zu berechnen	<0,0001	N. normal	N. normal
MCHC (mmol/l)	20,95-22,33	20,84-22,34	0,19	Normal	Normal
PLT ($10^9/l$)	571-972	848-1239	<00001	Normal	Normal
MPV (fl)	6,90-8,02	6,6-7,59	<0,0001	N. normal	Normal
PCT (l/l)	0,0044-0,0069	0,0064-0,0097	<0,0001	Normal	Normal
NEUT ($10^9/l$)	0,44-1,58	0,32-2,13	0,48	L. normal	L. normal
LYMPH ($10^9/l$)	2,72-7,65	5,4-12,52	<0,0001	L. normal	Normal
MONO ($10^9/l$)	0,07-0,54	0,23-0,8	<0,0001	Normal	Normal
EO ($10^9/l$)	0,02-0,19	0,07-0,24	<0,0001	N. normal	Normal
RETIC ($10^9/l$)	184,0-461.4	196,0-344.4	<0,0001	N. normal	Normal
RETIC (%)	2,25-5,27	2,09-3,75	<0,0001	N. normal	Normal

** Referenzintervalle, berechnet als 2,5% – 97,5% Perzentil; †† P-Werte aus T-Test bei normal verteilten Daten; aus Mann-Whitney-U-Test bei nicht normal verteilten Daten

N. normal = nicht normal

L. normal = logarithmisch transformiert

Beim Vergleich der männlichen Tiere der Gruppen eins und zwei fallen signifikante Unterschiede für die Parameter WBC, RBC, MCH, MCV platelets, MPV, PCT, Lymphozyten, Monozyten, Eosinophile und Retikulozyten (relativ und absolut) auf. Die Parameter HGB, HCT, MCHC und Neutrophile unterscheiden sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen. Die Datensätze für die Parameter HGB, HCT und MCH sind für die Gruppe zwei nicht-normal verteilt und lassen sich nicht logarithmisch transformieren. Aufgrund der geringen Anzahl an Tieren ($n = 33$) ist eine Berechnung von Referenzintervallen daher nicht möglich.

Dennoch können die Datensätze beider Gruppen mittels des nichtparametrischen Mann-Whitney-Tests auf ihre (Un-)Gleichheit geprüft werden.

Tabelle 4.22: Unterschiede in hämatologischen Werten zwischen weiblichen Wistar-Ratten des Züchters 1 ($n = 73$) und 2 ($n = 30$); 95% Referenzintervalle für beide Gruppen; Normalität der Daten

Test	Referenzintervall weibliche Ratten Gruppe 1**	Referenzintervall weibliche Ratten Gruppe 2**	P-Wert††	Verteilung der Daten, Gruppe 1	Verteilung der Daten, Gruppe 2
WBC ($10^9/l$)	2,13-6,99	4,20-9,38	<0,0001	L. normal	Normal
RBC ($10^{12}/l$)	7,61-9,05	8,45-10,07	<0,0001	Normal	Normal
HGB (mmol/l)	8,34-10,14	9,14-10,25	<0,0001	N. normal	Normal
HCT (l/l)	0,37-0,47	0,41-0,49	0,0002	N. normal	Normal
MCV (fl)	47,91-56,87	45,50-51,70	<0,0001	Normal	Normal
MCH (fmol)	1,04-1,21	0,97-1,13	<0,0001	Normal	Normal
MCHC (mmol/l)	20,82-22,18	20,67-22,46	0,56	Normal	Normal
PLT ($10^9/l$)	581-890	804-1282	<0,0001	Normal	Normal
MPV (fl)	6,97-8,16	6,68-7,67	<0,0001	N. normal	Normal
PCT (l/l)	0,0045-0,0067	0,0069-0,0096	<0,0001	Normal	Normal
NEUT ($10^9/l$)	0,22-1,19	0,27-1,09	0,71	L. normal	L. normal
LYMPH ($10^9/l$)	1,69-5,67	3,38-8,18	<0,0001	L. normal	Normal
MONO ($10^9/l$)	0,06-0,40	0,14-0,47	<0,0001	L. normal	Normal
EO ($10^9/l$)	0,02-0,17	0,06-0,22	<0,0001	N. normal	L. normal
RETIC ($10^9/l$)	203,45-426,77	152,5-305,2	<0,0001	Normal	L. normal
RETIC (%)	2,66-5,23	1,45-3,37	<0,0001	L. normal	Normal

** Referenzintervalle, berechnet als 2,5% – 97,5% Perzentil; †† P-Werte aus T-Test bei normal verteilten Daten; aus Mann-Whitney-U-Test bei nicht normal verteilten Daten

N. normal = nicht normal; L. normal = logarithmisch transformiert

Die weiblichen Ratten der beiden Gruppen unterscheiden sich signifikant in den Parametern WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, platelets, MPV, PCT, Lymphozyten, Monozyten, Eosinophile und Retikulozyten (relativ und absolut). Die Parameter MCHC und Neutrophile zeigen keinen signifikanten Unterschied.

4.4 Referenzintervalle für den XT-2000iV für Wistar Ratten des Züchters 1

Die folgenden beiden Tabellen 4.23 und 4.24 sind nach Geschlecht getrennt und geben Referenzintervalle für Ratten des Stammes Wistar (Gruppe 1) an. Berechnet werden das untere 2,5%- und das obere 97,5%-Referenzlimit sowie das obere und untere 90%-Konfidenzintervall. 5% der Referenzpopulation werden also nicht in die Berechnung mit einbezogen. Außerdem wird die Verteilung der Daten angegeben.

Für nicht normal verteilte Daten kann kein Konfidenzintervall berechnet werden.

Tabelle 4.23: Referenzintervalle für die Parameter des XT-2000iV und 90%-Konfidenzintervalle (CI) des oberen und unteren Referenzlimits für die Tierart Ratte, Stamm Wistar (Züchter 1), männlich, $n = 72$

Parameter	Einheit	Unteres Referenzlimit (2,5%)	Oberes Referenzlimit (97,5%)	Unteres 90% CI Intervall	Oberes 90% CI Intervall	Verteilung der Daten
WBC	$10^9/l$	3,58	9,45	3,30-3,89	8,70-10,26	L. normal
RBC-I	$10^{12}/l$	8,10	9,59	7,98-8,23	9,46-9,71	Normal
RBC-O	$10^{12}/l$	7,70	9,07	7,59-7,82	8,95-9,19	Normal
HGB	mmol/l	8,99	10,30	8,88-9,10	10,19-10,41	Normal
HCT	l/l	0,41	0,48			N. normal
MCV	fl	46,22	54,95	45,49-46,96	54,22-55,69	Normal
MCH	fmol	0,86	1,17			N. normal
MCHC	mmol/l	20,95	22,33	20,83-21,06	22,21-22,45	Normal

Fortsetzung der Tabelle 4.23 auf Seite 69

Fortsetzung der Tabelle 4.23 von Seite 68: Referenzintervalle für die Parameter des XT-2000iV und 90%- Konfidenzintervalle (CI) des oberen und unteren Referenzlimits für die Tierart Ratte, Stamm Wistar (Züchter 1), männlich, $n = 72$

PLT-O	10 ⁹ /l	571	972	537-605	938-1006	Normal
PLT-I	10 ⁹ /l	600	942	572-629	913-971	Normal
MPV	fl	6,90	8,02			N. normal
PCT	l/l	0,0044	0,0069	0,0041- 0,0046	0,0067- 0,0072	Normal
NEUT#	10 ⁹ /l	0,44	1,58	0,39-0,49	1,41-1,76	L. normal
LYMPH#	10 ⁹ /l	2,72	7,65	2,50-2,98	7,02-8,35	L. normal
MONO#	10 ⁹ /l	0,07	0,54	0,04-0,11	0,50-0,58	Normal
EO#	10 ⁹ /l	0,02	0,19			N. normal
BASO#	10 ⁹ /l	0,0	0,01			N. normal
NEUT%	%	8,88	23,07	8,19-9,63	21,28-25,01	L. normal
LYMPH%	%	68,24	86,08			N. normal
MONO%	%	1,92	8,42	1,37-2,47	7,87-8,97	Normal
EO%	%	0,57	2,87	0,49-0,65	2,50-3,29	L. normal
BASO%	%	0,0	0,2			N. normal
RET#	10 ⁹ /l	184,0	461,4			N. normal
RET%	%	2,25	5,27			N. normal

N. normal = nicht normal

L. normal = logarithmisch transformiert

Tabelle 4.24: Referenzintervalle für die Parameter des XT-2000iV und 90%-Konfidenzintervalle (CI) des oberen und unteren Referenzlimits für die Tierart Ratte, Stamm Wistar (Züchter 1), weiblich, $n = 73$

Parameter	Einheit	Unteres Referenz-limit (2,5%)	Oberes Referenz-limit (97,5%)	Unteres 90% CI Intervall	Oberes 90% CI Intervall	Verteilung der Daten
WBC	$10^9/l$	2,13	6,99	1,92-2,35	6,33-7,72	L. normal
RBC-I	$10^{12}/l$	7,61	9,05	7,49-7,73	8,93-9,17	Normal
RBC-O	$10^{12}/l$	7,13	8,54	7,01-7,25	8,42-8,66	Normal
HGB	mmol/l	8,34	10,14			N. normal
HCT	l/l	0,37	0,47			N. normal
MCV	fl	47,91	56,87	47,16-48,66	56,12-57,63	Normal
MCH	fmol	1,04	1,21	1,03-1,06	1,19-1,22	Normal
MCHC	mmol/l	20,82	22,18	20,71-20,93	22,07-22,30	Normal
PLT-O	$10^9/l$	581	890	555-607	864-916	Normal
PLT-I	$10^9/l$	604	892	580-628	869-917	Normal
MPV	fl	6,97	8,16			N. normal
PCT	l/l	0,0045	0,0067	0,0043-0,0047	0,0064-0,0068	Normal
NEUT#	$10^9/l$	0,22	1,19	0,19-0,25	1,03-1,37	L. normal
LYMPH#	$10^9/l$	1,69	5,67	1,52-1,87	5,12-6,28	L. normal
MONO#	$10^9/l$	0,06	0,40	0,05-0,07	0,34-0,47	L. normal
EO#	$10^9/l$	0,02	0,17			N. normal
BASO#	$10^9/l$	0,0	0,01			N. normal
NEUT%	%	7,15	24,21	6,45-7,92	21,85-26,82	L. normal
LYMPH%	%	68,35	87,95			N. normal
MONO%	%	1,38	7,05	0,90-1,85	6,57-7,53	Normal

Fortsetzung der Tabelle 4.24 auf Seite 71

Fortsetzung der Tabelle 4.24 von Seite 70: Referenzintervalle für die Parameter des XT-2000iV und 90%- Konfidenzintervalle (CI) des oberen und unteren Referenzlimits für die Tierart Ratte, Stamm Wistar (Züchter 1), weiblich, n = 73

EO%	%	0,39	2,78	0,19-0,59	2,58-2,98	Normal
BASO%	%	0,0	0,32			N. normal
RET#	10 ⁹ /l	203,45	426,77	184,7- 222,19	408,02- 445,51	Normal
RET%	%	2,66	5,23	2,51-2,81	4,94-5,53	L. normal

N. normal = nicht normal

L. normal = logarithmisch transformiert

Tabelle 4.25: Einfluss des Geschlechts auf hämatologische Parameter (XT-2000iV) bei der Tierart Ratte, Stamm Wistar (Züchter 1), *P*-Werte

Parameter	<i>P</i> -Wert	Parameter	<i>P</i> -Wert	Parameter	<i>P</i> -Wert
WBC	<0,0001	PLT-O	0,0191	BASO#	0,22
RBC-I	<0,0001	PLT-I	0,0112	NEUT%	0,15
RBC-O	<0,0001	MPV	0,0087	LYMPH%	0,0116
HGB	<0,0001	PCT	0,48	MONO%	0,0003
HCT	0,0012	NEUT#	<0,0001	EO%	0,0367
MCV	<0,0001	LYMPH#	<0,0001	BASO%	0,26
MCH	<0,0001	MONO#	<0,0001	RET#	0,78
MCHC	0,0219	EO#	0,0004	RET%	0,0386

Aus der Tabelle 4.25 geht hervor, dass sich die Parameter WBC, RBC-I, RBC-O, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT-O, PLT-I, MPV, Neutrophile (#), Lymphozyten (#, %), Monozyten (#, %), Eosinophile (#, %) und Retikulozyten (%) signifikant zwischen den männlichen und weiblichen Tieren unterscheiden. Die Parameter PCT, Basophile (# und %), Neutrophile (%) und Retikulozyten (#) zeigen keine signifikanten Unterschiede.

4.5 Referenzintervalle für die Tierart Hund

4.5.1 Referenzintervalle für den XT-2000iV für die Tierart Hund

Im Folgenden werden Referenzintervalle für den Hund, Rasse Marshall Beagle, angegeben. Auch hier erfolgt die Berechnung getrennt nach Geschlecht. Gezeigt werden das untere 2,5%- und das obere 97,5%-Referenzlimit sowie gegebenenfalls das untere und obere 90%-Konfidenzintervall und die Verteilung der Daten. Somit finden auch hier 5% der Referenzpopulation keine Beachtung.

Tabelle 4.26: Referenzintervalle für die Parameter des XT-2000iV und 90%-Konfidenzintervalle (CI) des oberen und unteren Referenzlimits für die Tierart Hund, Marshall Beagle, männlich, $n = 77$

Parameter	Einheit	Unteres Referenzlimit (2,5%)	Oberes Referenzlimit (97,5%)	Unteres CI (90%)	Oberes CI (90%)	Verteilung der Daten
WBC	$10^9/l$	6,21	15,54	5,76-6,70	14,42-16,75	L. normal
RBC-I	$10^{12}/l$	5,89	8,67	5,71-6,08	8,40-8,95	L. normal
RBC-O	$10^{12}/l$	5,40	8,17	5,16-5,62	7,95-8,40	Normal
HGB	mmol/l	8,31	12,09	8,06-8,57	11,72-12,46	L. normal
HCT	l/l	0,41	0,60			N. normal
MCV	fl	61,09	71,00	60,28-61,90	70,19-71,81	Normal
MCH	fmol	1,31	1,50	1,29-1,33	1,48-1,51	Normal
MCHC	mmol/l	20,25	22,16	20,10-20,41	22,01-22,32	Normal
PLT-O	$10^9/l$	163	366	153-174	343-390	L. normal
PLT-I	$10^9/l$	170	395	159-182	369-423	L. normal
MPV	fl	8,67	12,32	8,37-8,97	12,02-12,62	Normal
PCT	l/l	0,0018	0,0041			N. normal
NEUT#	$10^9/l$	3,15	10,90	2,85-3,49	9,85-12,07	L. normal

Fortsetzung der Tabelle 4.26 auf Seite 73

Fortsetzung der Tabelle 4.26 von Seite 72 : Referenzintervalle für die Parameter des XT-2000iV und 90%-Konfidenzintervalle (CI) des oberen und unteren Referenzlimits für die Tierart Hund, Marshall Beagle, männlich, $n = 77$

LYMPH#	10 ⁹ /l	1,51	3,83	1,32-1,70	3,64-4,02	Normal
MONO#	10 ⁹ /l	0,27	1,48	0,24-0,31	1,29-1,70	L. normal
EO#	10 ⁹ /l	0,12	1,52	0,10-0,15	1,24-1,86	L. normal
BASO#	10 ⁹ µl	0,01	0,09			N. normal
NEUT%	%	41,12	75,68			N. normal
LYMPH%	%	15,10	39,42	13,11-17,09	37,44-41,41	Normal
MONO%	%	3,15	13,21	2,80-3,54	11,75-14,85	L. normal
EO%	%	1,30	15,03	1,07-1,59	12,31-18,36	L. normal
BASO%	%	0,10	1,01			N. normal
RET#	10 ⁹ /l	23,57	157,78	20,18-27,54	135,08- 184,30	L. normal
RET%	%	0,37	1,95	0,33-0,43	1,70-2,23	L. normal

N. normal = nicht normal

L. normal = logarithmisch transformiert

Tabelle 4.27: Referenzintervalle für die Parameter des XT-2000iV und 90%-Konfidenzintervalle (CI) des oberen und unteren Referenzlimits für die Tierart Hund, Marshall Beagle, weiblich, $n = 77$

Parameter	Einheit	Unteres Referenzlimit (2,5%)	Oberes Referenzlimit (97,5%)	Unteres CI Intervall (90%)	Oberes CI Intervall (90%)	Verteilung der Daten
WBC	10 ⁹ /l	6,76	15,01	6,33-7,21	14,06-16,02	L. normal
RBC-I	10 ¹² /l	6,01	8,49	5,84-6,18	8,25-8,73	L. normal
RBC-O	10 ¹² /l	5,72	7,89	5,57-5,87	7,68-8,10	L. normal
HGB	mmol/l	8,68	12,00			N. normal

Fortsetzung der Tabelle 4.27 auf Seite 74

Fortsetzung der Tabelle 4.27 von Seite 73: Referenzintervalle für die Parameter des XT-2000iV und 90%-Konfidenzintervalle (CI) des oberen und unteren Referenzlimits für die Tierart Hund, Marshall Beagle, weiblich, $n = 77$

HCT	l/l	0,40	0,54	0,39-0,41	0,53-0,56	Normal
MCV	fl	59,28	74,08			N. normal
MCH	fmol	1,30	1,50	1,28-1,31	1,49-1,52	Normal
MCHC	mmol/l	20,21	22,19	20,04-20,37	22,03-22,36	Normal
PLT-O	$10^9/l$	174	373	158-190	356-389	Normal
PLT-I	$10^9/l$	186	392	169-203	375-409	Normal
MPV	fl	8,50	12,04	8,21-8,79	11,75-12,33	Normal
PCT	l/l	0,0021	0,0041	0,0020- 0,0022	0,0039- 0,0043	L. normal
NEUT#	$10^9/l$	3,59	10,04	3,30-3,91	9,23-10,92	L. normal
LYMPH#	$10^9/l$	1,75	4,22	1,55-1,95	4,02-4,42	Normal
MONO#	$10^9/l$	0,26	1,36	0,23-0,30	1,19-1,56	L. normal
EO#	$10^9/l$	0,10	1,07	0,08-0,12	0,88-1,30	L. normal
BASO#	$10^9/l$	0,01	0,13			N. normal
NEUT%	%	47,96	71,90	46,00-49,91	69,95-73,86	Normal
LYMPH%	%	18,12	40,98	16,26-19,99	39,11-42,84	Normal
MONO%	%	2,87	12,20	2,55-3,23	10,84-13,73	L. normal
EO%	%	1,12	9,43	0,94-1,33	7,92-11,23	L. normal
BASO%	%	0,10	1,61			N. normal
RET#	$10^9/l$	27,78	144,87	24,27-31,79	126,58- 165,80	L. normal
RET%	%	0,40	1,96	0,35-0,46	1,73-2,24	L. normal

N. normal = nicht normal

L. normal = logarithmisch transformiert

Tabelle 4.28: Einfluss des Geschlechts auf hämatologische Parameter (XT-2000iV) bei der Tierart Hund, Marshall Beagle; *P*-Werte

Parameter	<i>P</i> -Wert	Parameter	<i>P</i> -Wert	Parameter	<i>P</i> -Wert
WBC	0,66	PLT-O	<0,0001	BASO#	0,01
RBC-I	0,90	PLT-I	0,0089	NEUT%	0,54
RBC-O	0,68	MPV	0,13	LYMPH%	0,0196
HGB	0,94	PCT	0,0109	MONO%	0,16
HCT	0,87	NEUT#	0,93	EO%	0,0005
MCV	0,62	LYMPH#	0,0017	BASO%	0,06
MCH	0,74	MONO#	0,33	RET#	0,89
MCHC	0,92	EO#	0,0036	RET%	0,62

Beim Hund fällt der Unterschied für die Parameter des XT-2000iV zwischen den männlichen und weiblichen Tieren gering aus. Lediglich die Parameter PLT-O, PLT-I, PCT, Lymphozyten (#,%) und Eosinophile (#, %) zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Alle anderen Parameter unterscheiden sich nicht zwischen den männlichen und weiblichen Tieren.

4.5.2 Referenzintervalle für CD-Marker für die Tierart Hund

Referenzintervalle für die Messung der Lymphozytenpopulationen am Durchflusszytometer FACSCanto™ werden für die Tierart Hund errechnet. Die Darstellung und Vereinzelung der Populationen wird in den Abbildungen 4.6 bis 4.8 gezeigt und erklärt (die Ergebnisse für CD34 werden nicht dargestellt).

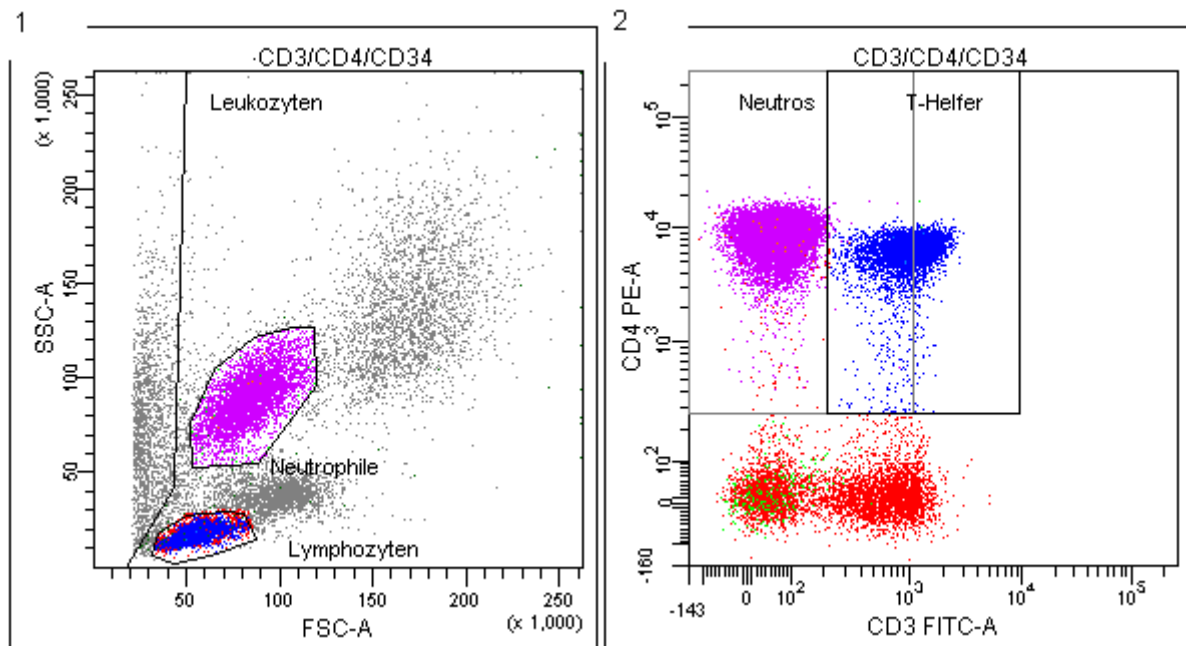


Abbildung 4.6: Durchflusszytometrische Messung, Antikörper gegen CD3- und CD4-Oberflächenmoleküle; Tierart Hund, Marshall Beagle

x-Achse: Vorwärtsstreulicht (FSC, Größe der Zelle)

y-Achse: Seitwärtsstreulicht (SSC, Granularität der Zelle)

Im linken oberen Bild sind die Parameter Vorwärtsscatter (FSC) auf der x-Achse und Seitsscatter (SSC) auf der y-Achse aufgetragen. Links des großen, senkrechten Gates befindet sich Debris, der durch diese Gating-Technik weitestgehend ausgeschlossen wird. Rechts dieses Gates befinden sich die Leukozyten. Aus dem weiteren Gating ergeben sich die Zellpopulationen neutrophile Granulozyten (lila) und Lymphozyten (rot-blau) mit der Population der Monozyten dazwischen (nicht markiert). Rechts von den neutrophilen

Granulozyten befinden sich die eosinophilen Granulozyten mit relativ hohen FFC- und SSC- Werten, die hier nicht markiert sind.

Im rechten oberen Bild ist die Markierung der Probe mit den Antikörpern gegen CD3- und CD4-Oberflächenmoleküle zu sehen (x-Achse: CD3, y-Achse: CD4). Die lila Population stellt als einfach CD4-positiv markierte Zellen die Neutrophilen dar, während sich im rechten oberen Quadranten die doppelt CD4- und CD3-positiven T-Helfer-Zellen befinden.

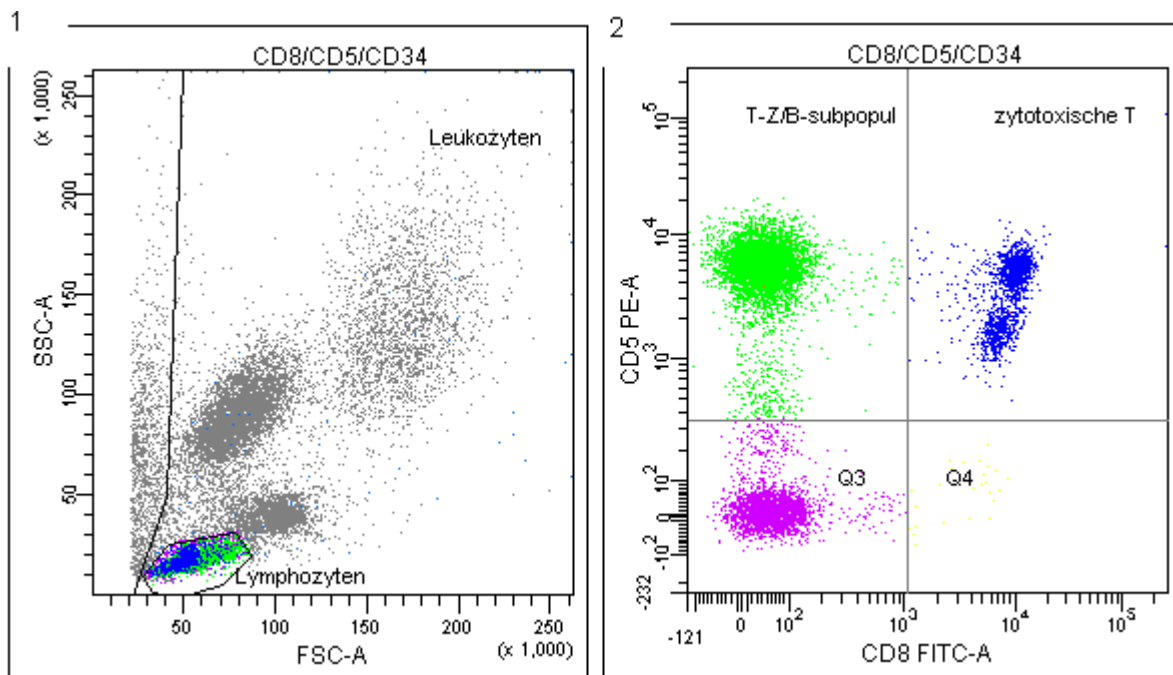


Abbildung 4.7: Durchflusszytometrische Messung, Antikörper gegen CD5- und CD8-Oberflächenmoleküle; Tierart Hund, Marshall Beagle

x-Achse: Vorwärtsstreulicht (FSC, Größe der Zelle)

y-Achse: Seitwärtsstreulicht (SSC, Granularität der Zelle)

In obiger Abbildung 4.7 liegt der Schwerpunkt auf der Darstellung der Lymphozytenpopulation, die im linken Bild farbig markiert ist. Aus dieser werden im rechten Bild, durch Antikörpermarkierung mit CD5 (y-Achse) und CD8 (x-Achse), die einfach CD5-positiven T-Zellen (grün) und die doppelt CD5- und CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen (blau) separiert. Es wird eine Zweiteilung der CD5-CD8-positiven Zellpopulation deutlich.

In folgendem Beispiel erfolgt eine Markierung der Zellen im Lymphozytengate mit den Antikörpern gegen CD21 (y-Achse) und CD9 (x-Achse). Einfach CD21-positiv stellen sich die B-Zellen dar (lila).

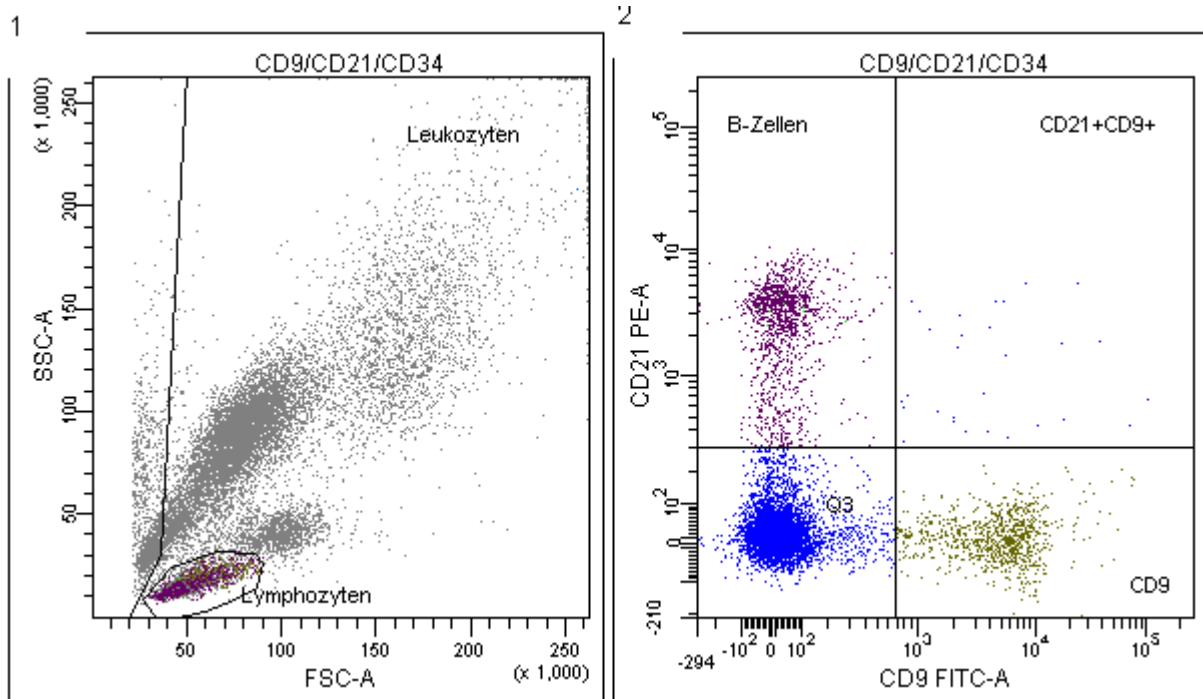


Abbildung 4.8: Durchflusszytometrische Messung, Antikörper gegen CD21- und CD9-Oberflächenmoleküle; Tierart Hund, Marshall Beagle

x-Achse: Vorwärtsstreulicht (FSC, Größe der Zelle)

y-Achse: Seitwärtsstreulicht (SSC, Granularität der Zelle)

Die folgenden beiden Tabellen 4.29 und 4.30 zeigen das obere und untere Referenzlimit und Konfidenzintervall für die CD-Marker der Beagle-Population, gemessen am FACSCanto™ Durchflusszytometer. 95% der Tiere werden in die Berechnung eingeschlossen. Weiterhin wird die Verteilung der Daten angegeben.

Tabelle 4.29: Referenzintervalle für die Parameter der CD-Marker (%), gemessen am FACSCanto™ Durchflusszytometer und 90% Konfidenzintervalle (CI) des oberen und unteren Referenzlimits für die Tierart Hund, Marshall Beagle, männlich, $n = 77$

Parameter	Unteres 2,5% Referenzlimit	Oberes 97,5% Referenzlimit	Unteres 90% CI Intervall	Oberes 90% CI Intervall	Verteilung der Daten
CD3+CD4+	30,36	55,13	28,05-32,68	52,82-57,44	Normal
CD5+	40,91	65,54	38,61-43,21	63,24-67,84	Normal
CD5+CD8+	12,47	27,31	11,09-13,86	25,92-28,69	Normal
CD21+	8,03	32,61	5,74-10,33	30,32-34,90	Normal
CD9+	9,20	25,45			N. normal
CD4:CD8	1,27	3,58	1,17-1,38	3,30-3,90	L. normal

N. normal = nicht normal

L. normal = logarithmisch transformiert

Tabelle 4.30: Referenzintervalle für die Parameter der CD-Marker, gemessen am FACSCanto™ Durchflusszytometer und 90% Konfidenzintervalle (CI) des oberen und unteren Referenzlimits für die Tierart Hund, Marshall Beagle, weiblich, $n = 77$

Parameter	Unteres 2,5% Referenzlimit	Oberes 97,5% Referenzlimit	Unteres 90% CI Intervall	Oberes 90% CI Intervall	Verteilung der Daten
CD3+CD4+	34,65	54,29	32,81-36,48	52,46-56,13	Normal
CD5+	43,37	64,86	41,36-45,37	62,85-66,86	Normal
CD5+CD8+	11,43	29,27	9,76-13,10	27,60-30,93	Normal
CD21+	9,70	31,45			N. Normal
CD9+	6,29	26,10	4,44-8,14	24,25-27,95	Normal
CD4:CD8	1,15	3,43	0,96-1,34	3,25-3,62	Normal

Tabelle 4.31: Einfluss des Geschlechts auf die CD-Marker bei der Tierart Hund, Marshall Beagle, *P*-Werte

Parameter	<i>P</i> -Wert
CD3+CD4+	0,0209
CD5+	0,33
CD5+CD8+	0,41
CD21+	0,57
CD9+	0,54
CD4:CD4	0,39

Einzig die Population der doppelt CD3- und CD4-positiven Zellen zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren.

In der Abbildung 4.7 fällt eine Zweiteilung der Zellpopulation der zytotoxischen T-Zellen auf, die mit den Antikörpern gegen CD5 und CD8 markiert sind. Diese beiden Teile werden für jeweils 76 männliche und weibliche Tiere durch Gating einzeln dargestellt. Die Anteile der oberen CD5-high- und der unteren CD5-low-Population werden ermittelt und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Aus diesem Quotienten werden beidseitige Referenzintervalle berechnet. Für jeweils einen männlichen und einen weiblichen Hund sind die Daten nicht auswertbar, da sich deren Populationen nicht trennen lassen.

Für die männlichen Beagle sind die Daten nicht normal verteilt. Es ergibt sich ein 95%-Referenzintervall von 0,8-5,11.

Die Daten der weiblichen Hunde sind nach logarithmischer Transformierung normal verteilt. Es ergibt sich ein unteres 2,5%-Referenzlimit von 0,65 und ein oberes 97,5%-Referenzlimit von 4,64. Das untere 90%-Konfidenzintervall liegt bei 0,55-0,76, das obere bei 3,95-5,46.

Von jeweils 76 Tieren weisen beim männlichen Geschlecht nur fünf Hunde und bei den weiblichen Tieren zehn Hunde Werte von kleiner als 1 auf. Der Range reicht von 0,65 bis 10,1 bei den männlichen Hunden und von 0,61 bis 7,7 bei den weiblichen Hunden (arithmetisches Mittel für weibliche Hunde: 2,29). Die meisten Hunde haben demnach mehr hoch fluoreszierende Zellen.

Zwischen den Geschlechtern besteht kein signifikanter Unterschied ($p = 0,5$).

4.6 Retikulierte Thrombozyten beim Hund

Folgende Abbildung 4.9 zeigt ein Beispiel einer Messung der retikulierten Thrombozyten am XT-2000iV mit den manuell kreierte Gates.

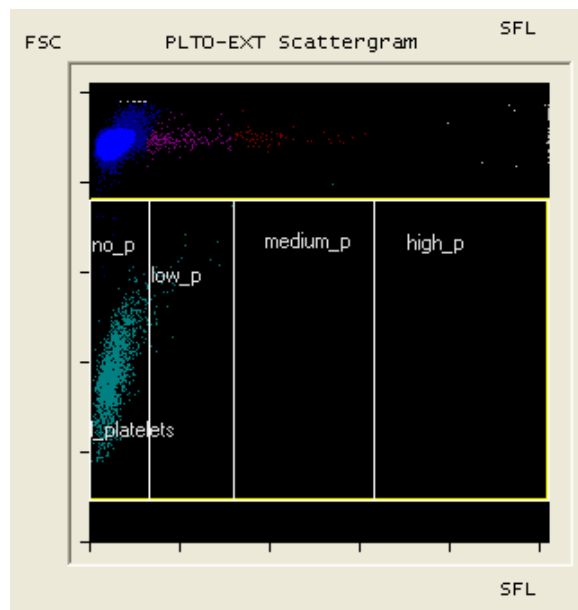


Abbildung 4.9: Messung der retikulierten Thrombozyten am Sysmex XT-2000iV

Tierart Hund, Marshall Beagle

x-Achse: Seitenfluoreszenz (SFL, Fluoreszenzintensität)

y-Achse: Vorwärtsstreulicht (FSC, Größe)

Es erfolgt eine Vierteilung der Thrombozytenpopulation in nicht fluoreszierende Thrombozyten am linken Bildrand in grün und drei verschiedene Fluoreszenzstufen. Da dieser Hund keine Auffälligkeiten bezüglich der Thrombozyten aufweist, sind in den drei rechten Gates kaum Zellen zu finden.

Die folgende Abbildung 4.10 zeigt eine entsprechende Messung am FACSCanto™ Durchflusszytometer.

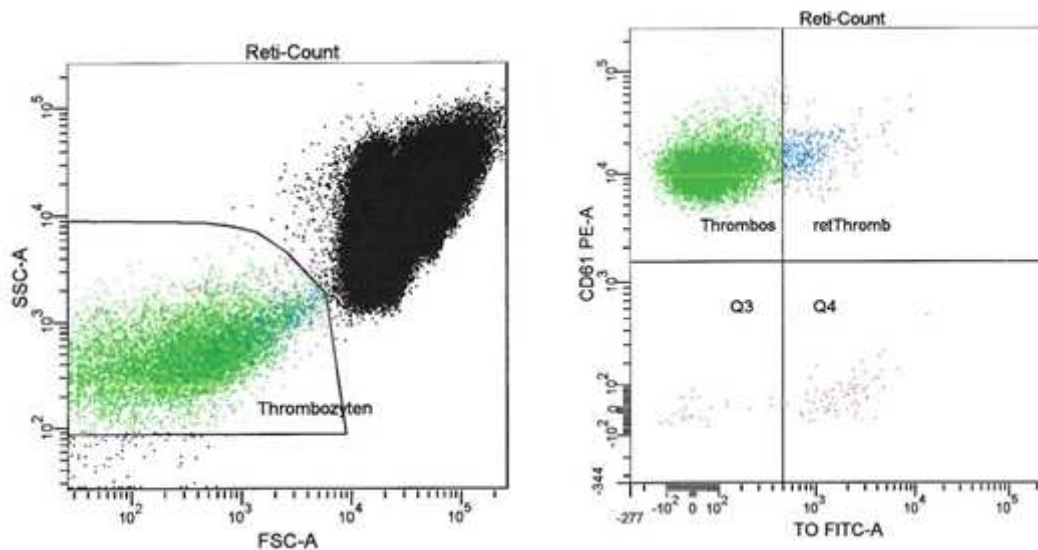


Abbildung 4.10: Messung der retikulierten Thrombozyten am FACSCanto™ Durchflusszytometer; Tierart Hund, Marshall Beagle

grün: Thrombozyten, blau: retikulierte Thrombozyten, schwarz: Erythrozyten

In der linken Grafik erfolgt die Darstellung der Thrombozyten (grün) im FSC-SSC-Scattergramm. Die schwarze Zellpopulation besteht aus Erythrozyten. Die Thrombozyten werden durch Gating vereinzelt und in der rechten Grafik dargestellt.

Im linken oberen Quadranten sind die CD61-positiven Thrombozyten zu erkennen. Im rechten Quadranten spalten sich von dieser Population einige CD61- und Thiazole-Orange-positive retikulierte Thrombozyten ab (blau dargestellt).

4.6.1 Referenzintervalle

In der folgenden Tabelle 4.32 werden 95%-Referenzintervalle für die Population der retikulierten Thrombozyten im Blut des Hundes (Rasse Marshall Beagle) für das Messsystem XT-2000iV angegeben.

Tabelle 4.32: Referenzintervalle für retikulierte Thrombozyten, gemessen am XT-2000iV, Modus „Manual“, Tierart Hund, Marshall Beagle, n = 154

Parameter	Einheit	Unteres Referenzlimit (2,5%)	Oberes Referenzlimit (97,5%)	Unteres CI Intervall (90%)	Oberes CI Intervall (90%)	Verteilung der Daten
low r-Thromb	10 ⁹ /l	0,0041	0,0145	0,0038-0,0044	0,0135-0,0156	L. normal
low r-Thromb	%	1,70	7,96	1,55-1,86	7,28-8,71	L. normal
medium r-Thromb	10 ⁹ /l	0,0	0,0011	0,0-0,0	0,0010-0,0014	N. normal
medium r-Thromb	%	0,0	0,69	0,0-0,0	0,54-1,03	N. normal
high r-Thromb	10 ⁹ /l	0,0	0,0001	0,0-0,0	0,0001-0,0003	N. normal
high r-Thromb	%	0,0	0,10	0,0-0,0	0,08-0,21	N. normal
all r-Thromb	10 ⁹ /l	0,0043	0,0153	0,0040-0,0046	0,0142-0,0164	L. normal
all r-Thromb	%	1,78	8,51	1,62-1,94	7,77-9,32	L. normal

N. normal = nicht normal

L. normal = logarithmisch transformiert

Die Hunde der Rasse Beagle weisen für die Gesamtzahl der retikulierten Thrombozyten (%) ein 95%-Referenzintervall von 1,78% bis 8,51% für die Messung am XT-2000iV auf. Der Großteil dieser Population stellt Thrombozyten mit geringer Fluoreszenz und somit mit sehr geringen RNA-Resten (low) dar. Jüngere Thrombozyten mit höherer Fluoreszenz sind bei gesunden Hunden kaum darzustellen.

Folgende Tabelle 4.33 zeigt das 95%-Referenzintervall für die vergleichbare Messung am FACSCanto™. Es ergibt sich an diesem System nur eine Population mit RNA-haltigen Zellen, daher erfolgt keine Unterteilung analog zum XT-2000iV.

Tabelle 4.33: Referenzintervalle für retikulierte Thrombozyten, gemessen am FACSCanto™, Tierart Hund, Marshall Beagle, n = 153

Parameter	Einheit	Unteres Referenzlimit (2,5%)	Oberes Referenzlimit (97,5%)	Unteres CI Intervall (90%)	Oberes CI Intervall (90%)	Verteilung der Daten
Ret. Thrombozyten	%	2,86	8,22	2,69-3,04	7,74-8,74	L. normal

L. normal = logarithmisch transformiert

Für die Messung am FACSCanto™ ergibt sich ein 95%-Referenzintervall von 2,86% bis 8,22%. Somit sind die Werte in etwa vergleichbar mit den am XT-2000iV erhobenen Werten.

Auf eine getrennte Berechnung des Referenzintervalls für männliche und weibliche Tiere wird hier verzichtet. Für die Messung am FACSCanto™ ergibt sich für die männlichen und weiblichen Tiere kein signifikanter Unterschied ($p = 0,07$) für die Gesamtzahl der retikulierten Thrombozyten in % am XT-2000iV fällt dieser signifikant aus ($p = 0,0299$).

4.6.2 Methodenvergleich: retikulierte Thrombozyten am XT-2000iV und am FACSCanto™

Die Richtigkeit und die Beurteilung des systematischen Fehlers der Messmethode am XT-2000iV erfolgt anhand des Methodenvergleichs. Die durchflusszytometrische Messung am FACSCanto™ wird als Referenzmethode definiert. Die Überprüfung erfolgt anhand der gemessenen Blutproben des Hundes. Am XT-2000iV wird die Population der retikulierten Thrombozyten durch ein manuell erstelltes Gate in drei verschiedene Reifungsstadien unterteilt. Da bei der durchflusszytometrischen Messung nur eine Population von

retikulierten Thrombozyten gemessen wird, werden die drei Unterpopulationen des XT-2000iV für den Methodenvergleich addiert.

Auch hier werden die Ergebnisse von Spearman Korrelation, Passing Bablok Regression und Bland-Altman Analyse gezeigt.

Tabelle 4.34: Methodenvergleich des XT-2000iV mit der Durchflusszytometrie (FACSCanto™) für die retikulierten Thrombozyten; r_s = Spearman Korrelationskoeffizient; intercept und slope aus Passing Bablok Regression; bias aus Bland-Altman Analyse, Tierart Hund, Marshall Beagle, $n = 153$

Parameter	Einheit	r_s	slope (95% CI)	intercept (95% CI)	bias (95% Limits of agreement)
Retikulierte Thrombozyten	%	0,42	0,77 (0,63 bis 0,90)	1,62 (1,12 bis 2,20)	0,82 (-2,31 bis 3,94)

Der Vergleich der beiden Methoden ergibt für die gemessenen Proben eine schlechte Korrelation mit einem Wert von 0,42. Der bias liegt mit 0,816 leicht im positiven Bereich.

In folgender Grafik ist zu sehen, dass ein Großteil der gemessenen Werte des FACSCanto™, über denen des XT-2000iV liegen. Ein Teil wird aber auch vom XT-2000iV höher gemessen.

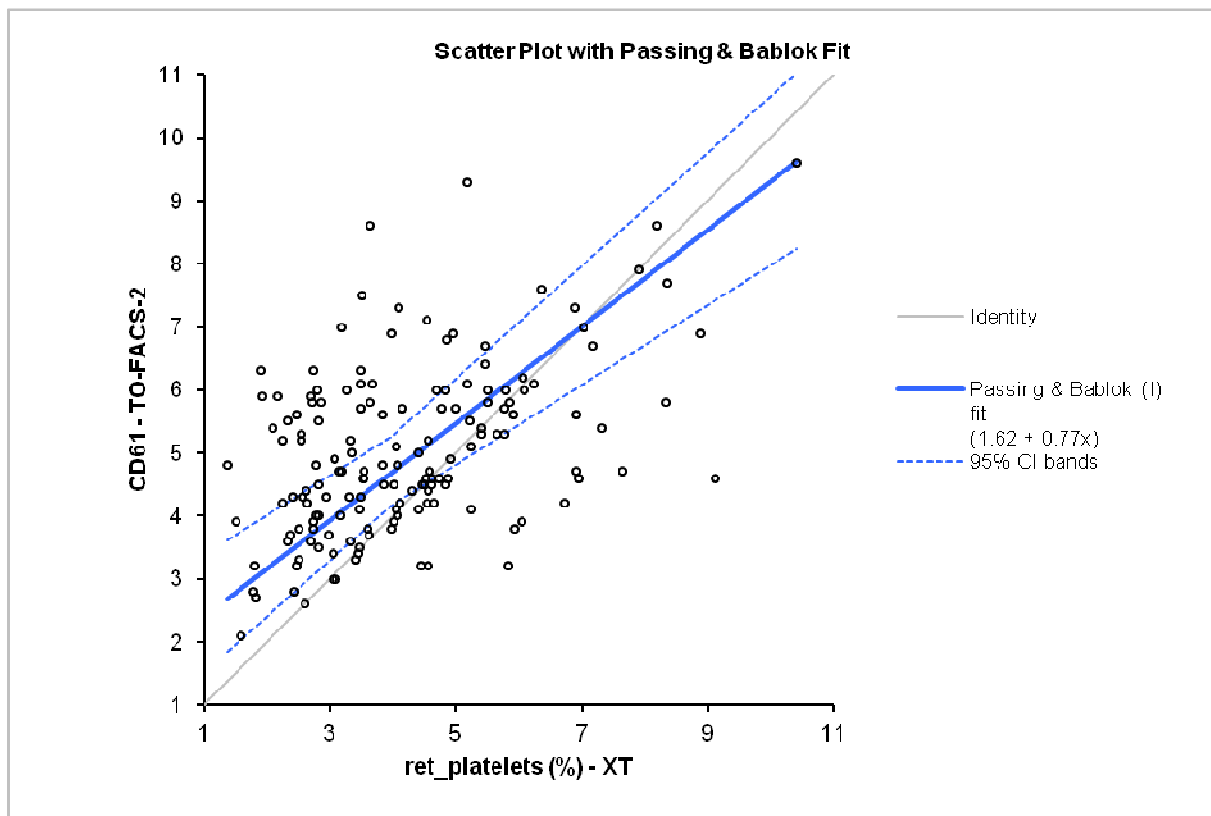


Abbildung 4.11: Passing Bablok Regression für die retikulierten Thrombozyten, Vergleich XT-2000iV mit FACSCanto™; Tierart Hund, Marshall Beagle

4.6.3 Präzision

Die Präzisionsmessung erfolgt hier für die Parameter der Messung der retikulierten Thrombozyten am XT-2000iV und am FACSCanto™. Berechnet werden die Standardabweichung und der Variationskoeffizient. Für den XT-2000iV erfolgt die Berechnung für die Modi „Manual“ und „Capillary“.

Tabelle 4.35: Präzision des **XT-2000iV** für die Parameter des Thrombozyten-Gates, Modus: „**Manual**“, Tierart Hund, Marshall Beagle, $n = 1$, 20-fache Messung

Parameter	Einheit	XT-2000iV	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
low r-Thromb	%	5,89 +/- 0,9237	15,68
low r-Thromb	10 ⁹ /l	0,01 +/- 0,0015	15,00
medium r-Thromb	%	0,33 +/- 0,1545	46,82
medium r-Thromb	10 ⁹ /l	0,0005 +/- 0,00026	52,00
high r-Thromb	%	0,0 +/- 0,0	-
high r-Thromb	10 ⁹ /l	0,0 +/- 0,0	-
all r-Thromb	%	6,22 +/- 1,0	16,08
all r-Thromb	10 ⁹ /l	0,0106 +/- 0,0016	15,09

Tabelle 4.36: Präzision des **XT-2000iV** für die Parameter des Thrombozyten-Gates, Modus: „**Capillary**“, Tierart Hund, Marshall Beagle, $n = 1$, 20-fache Messung

Parameter	Einheit	XT-2000iV	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
low r-Thromb	%	6,3 +/- 1,0384	16,48
low r-Thromb	10 ⁹ /l	0,01 +/- 0,0025	25,00
medium r-Thromb	%	0,43 +/- 0,3074	71,49
medium r-Thromb	10 ⁹ /l	0,00095 +/- 0,00074	77,89
high r-Thromb	%	0,0 +/- 0,0	-
high r-Thromb	10 ⁹ /l	0,0 +/- 0,0	-
all r-Thromb	%	6,66 +/- 1,02	15,32
all r-Thromb	10 ⁹ /l	0,0158 +/- 0,0027	17,09

Tabelle 4.37: Präzision des **FACSCanto™** für die retikulierten Thrombozyten, Tierart Hund, Marshall Beagle, $n = 1$, 20-fache Messung

Parameter	Einheit	FACSCanto™	
		Mittelwert +/- Standardabweichung SD	Variationskoeffizient CV (%)
retikulierte Thrombozyten	%	4,6 +/- 0,344	7,48

Das Ergebnis der Präzisionsmessung am FACSCanto™ weist mit einem Variationskoeffizienten von 7,48% einen guten Wert auf. Der Variationskoeffizient des vergleichbaren Wertes des XT-2000iV (all r-Thromb %) liegt mit 15,32%, bzw. 16,08% in einem akzeptablen Bereich. Die Ergebnisse der retikulierten Thrombozyten getrennt nach Reifungsstatus werden umso schlechter, je geringer der errechnete Mittelwert der Zellpopulation ist. Hierbei weist die Messung im Modus „Capillary“ schlechtere Werte auf als die im Modus „Manual“.

5 Diskussion

Für die Tierart Ratte sollen in vorliegender Studie verschiedene Parameter zur Evaluierung des Hämatologiesystems Sysmex XT-2000iV genauer untersucht werden.

Dieses Gerät wurde bereits für den Menschen und für verschiedene Tierarten (Hund, Katze und Pferd) evaluiert (Fernandes and Hamaguchi 2003; Langford, Luchtman-Jones et al. 2003; Lilliehook and Tvedten 2009; Lilliehook and Tvedten 2009; Dunker 2010; Nakagawa 2010).

MATHERS et al. publizierten eine Untersuchung für die Tierart Ratte. Jene Studie gibt unter anderem den Variationskoeffizienten für die einzelnen Parameter an. Auf bias, slope und intercept bei der vergleichenden Betrachtung des Gerätes mit der Referenzmethode wird aber nicht eingegangen (Mathers, Evans et al. 2008).

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der vergleichenden Betrachtung unterschiedlicher Tierpopulationen, die im Forschungsbereich besonders häufig eingesetzt werden.

Etablierte hämatologische Referenzintervalle für die relevanten Tiergruppen bilden die Basis der täglichen Routinearbeiten und für die Beurteilung der erhobenen Daten im präklinischen Forschungslabor, auch und besonders im Hinblick auf eine GLP-konforme Validität der in den Studien erhobenen Daten.

Mit der Untersuchung der CD-Marker bei den Marshall-Beagle, besonders CD5, finden Laborparameter Beachtung, die für diese Tiergruppe bisher seltener untersucht wurden.

Die Darstellung der retikulierten Thrombozyten des Hundes am XT-2000iV wurde bisher nur einmal beschrieben. Diese Methode wird für die Population der Beagle auf Anwendbarkeit überprüft und es werden Referenzintervalle dafür erstellt.

5.1 Präzision

Die Präzision beschreibt die Messgenauigkeit, d. h. den willkürlichen Fehler eines Gerätes und dient dazu, die Reproduzierbarkeit der gemessenen Werte zu ermitteln.

Ein errechneter Variationskoeffizient (CV) von $\leq 3\%$ wird für automatische Hämatologiesysteme erwartet bzw. im Allgemeinen als exzellent bewertet (Dörner 1993).

Für den Rattenstamm mit relativ hohen Werten in der Blutzellzählung finden sich exzellente Variationskoeffizienten, sowohl für den ADVIA® 120, als auch für den XT-2000iV (Modus „Manual“). Bei Betrachtung der CV für den Rattenstamm mit relativ niedrigen WBC- und Diff-Werten im Blut zeigt sich eine geringgradige Verschlechterung der Werte für die Blutzellzählung, jedoch sind diese noch als exzellent zu bewerten. Deutlicher fällt die Verschlechterung für die Parameter der Blutzelldifferenzierung aus. Hierzu muss angemerkt werden, dass das zahlenmäßige Vorkommen der einzelnen Zellpopulationen im Blut Einfluss auf die statistische Genauigkeit nimmt und dass relativ geringe Konzentrationen eines gemessenen Parameters höhere Variationskoeffizienten bedingen (Rümke 1959; Reed, Lynn et al. 2002).

Für den Modus „Capillary“ des XT-2000iV werden für beide Proben exzellente bis sehr gute Werte für die Blutzellzählung ermittelt.

Auffällig ist jedoch der Unterschied zwischen den Messmodi „Manual“ und „Capillary“ für die Parameter des roten Blutbildes bei der Messung der „high“-Probe. Im Modus „Manual“ werden exzellente Werte erreicht (RBC: 0,3%, HGB: 0,39%, HCT: 0,22%, MCV: 0,26%, MCH: 0,35%, MCHC: 0,47%).

Für den Modus „Capillary“ fallen die Werte, mit Ausnahme dessen für MCV, zwar sehr gut aus, jedoch schlechter als im unverdünnten Messprinzip (RBC: 3,27%, HGB: 2,21%, HCT: 3,33%, MCV: 0,24%, MCH: 4,55%, MCHC: 4,62%). Bei einer hohen Variation von RBC setzt sich diese automatisch bei den weiteren, mit dessen Hilfe berechneten Parametern fort.

Mit der Verdünnung lässt sich der relativ schlechte Wert für RBC allerdings nicht erklären.

Im Vergleich aller errechneten CV für den Parameter RBC aus der eigenen Studie und derer aus der Literatur liegt der Wert von CV = 3,27% für den Messmodus „Capillary“ außerhalb der vierfachen Standardabweichung. Somit kann dieser als Ausreißer gewertet werden.

Für die Blutzelldifferenzierung werden die CV-Werte, vor allem für Zellpopulationen mit einem relativ geringen Anteil im Blut im Modus „Capillary“ deutlich schlechter. In diesen verdünnten Proben wird praktisch nur ein Fünftel der normalen Blutmenge gemessen und die Zellanteile danach multipliziert. Bei Zellpopulationen mit geringen Anteilen im Blut sind somit erhöhte CV-Werte zu erwarten.

MATHERS et al. finden für die Präzision des XT-2000iV bei der Messung von Blut der Tierart Ratte folgende Variationskoeffizienten: CV = 2,3% (WBC), 0,73% (RBC), 0,91% (HCT), 0,48% (HGB), 1,41% (MCV), 3,02% (PLT#), 6,59% (NEUT#), 2,14% (LYMPH#), 7,62% (MONO#), 19,56% (EO#) und 4,18% (RETIC%) (Mathers, Evans et al. 2008).

TOYOTA et al. ermittelt gute Werte für die Tierart Ratte am Sysmex XT-2000i, ausgestattet mit einer Software für Humanblut, nennt aber keine genauen Zahlen (Toyota, Ooe et al. 2004).

Die eigenen Werte für die Blutzellzählung am ADVIA®120 und am XT-2000iV (Modus Manual) sind in etwa vergleichbar oder sogar besser als diese von MATHERS et al. errechneten (Mathers, Evans et al. 2008).

Die Werte für die Blutzelldifferenzierung dieser Messungen sind ebenfalls überwiegend niedriger als die der vorangegangenen Studie (Mathers, Evans et al. 2008). Eine Ausnahme stellt hier die Messung der Monozyten („high“-Probe) am ADVIA® 120 dar, die für die relativen und absoluten Zahlen vergleichsweise hohe CV-Werte (26,65%, 28,0%) ergeben. Für die „low“-Probe fallen die Werte deutlich besser aus (14,86% und 15%).

Der Datensatz ($n = 25$) für die Monzyten (%) der „low“-Probe weist einen Wert außerhalb der zweifachen Standardabweichung auf, dieser für die „high“-Probe zeigt drei Extremwerte außerhalb 2SD. Diese extremen Werte bedingen letztendlich das schlechte Ergebnis von CV = 26,65%.

Dies lässt sich auf die absolut gemessenen Monozyten übertragen (1 bzw. 2 Werte außerhalb 2SD).

MORITZ zeigt für die Messung der Monozyten (%) am ADVIA® 120 sehr gute CV für die Tierarten Hund (5,7%) und Katze (7,7%). Für die Tierarten Pferd, Schwein, Rind, Schaf und Ziege liegen die Werte deutlich höher (12,9% - 31,7%) und somit im Bereich der hier errechneten CV (Moritz 2000).

Der eigene CV für die Retikulozyten ist mit dem von MATHERS et al. vergleichbar (Mathers, Evans et al. 2008).

Die Präzision des Messmodus „Capillary“ des Analysesystems XT-2000iV wurde unseres Wissens bisher nicht untersucht. Diese Funktion des Gerätes erlaubt die Messung kleiner Blutvolumina und ist daher für die hämatologische Untersuchung von Labornagern von großer Bedeutung, da hier häufig nur wenig Material zur Untersuchung zur Verfügung steht.

5.2 Methodenvergleich des XT-2000iV mit dem ADVIA® 120 und manueller Differenzierung mit Blutproben der Ratte

Der Vergleich zwischen zwei Methoden stellt das Maß der Übereinstimmung des gemessenen Wertes mit dem wahren Wert dar (ICSH 1994). Mit ihm wird der systematische Fehler eines Gerätes ermittelt. Dabei sind die Parameter Hämoglobinkonzentration, PCV, die Bestimmung der roten und weißen Blutzellen, der Thrombozyten und Retikulozyten sowie des Differentialblutbildes als einzige durch echte Referenzmethoden - wie gefordert - zu vergleichen (ICSH 1994). Stehen diese Methoden nicht zur Verfügung, kann die Vergleichbarkeit auch geschätzt werden. Hierbei wird die zu evaluierende mit einer routinemäßig verwendeten und anerkannten Methode verglichen (ICSH 1994).

Das Hämatologiegerät ADVIA® 120 wurde teilweise für die Anwendung bei der Tierart Ratte evaluiert (Ameri, Schnaars et al. 2011). Weiterhin gehört es zu den am meisten verwendeten hämatologischen Systemen in der präklinischen Forschung. Daher wird es für diese Studie als Referenzmethode definiert.

Zum Vergleich zweier Methoden wird häufig der Korrelationskoeffizient r berechnet. Werte zwischen 0,93 und 0,99 gelten hier als exzellent.

Gute Korrelationskoeffizienten alleine sind allerdings nicht gleichbedeutend mit einer guten Übereinstimmung der Vergleichsmethoden. Durch die alleinige Betrachtung von r ist nur eine Aussage über den linearen Zusammenhang möglich, nicht jedoch über eventuelle proportionale und konstante Fehler. Daher sollten Vergleichs-Grafiken, wie in der aktuellen

Studie Passing Bablok und Bland-Altman, hinzugezogen werden (Jensen and Kjelgaard-Hansen 2006).

Ein weiterer limitierender Faktor für die Verwendung des Korrelationskoeffizienten ist die hierfür geforderte Normalverteilung der zu untersuchenden Daten.

Da im Falle von hämatologischen Proben häufig keine Normalität des Datensatzes vorliegt, ist es günstiger, zusätzlich auf andere statistische Verfahren zurückzugreifen. Beispielsweise stellt die Passing Bablok Regression eine Alternative dar, da sie auch extreme Werte duldet. Mittels dieser können auch die Werte intercept und slope berechnet werden, anhand derer eine Abschätzung des konstanten und proportionalen Fehlers der neuen Methode möglich ist (Passing and Bablok 1983; Hyltoft Petersen, Blaabjerg et al. 2004; Jensen and Kjelgaard-Hansen 2006).

Auch die Anwendung des Spearman's Korrelationskoeffizienten erlaubt eine Berechnung von nichtnormal verteilten Datensätzen und wird in der vorliegenden Studie verwendet.

Schließlich sollte aus der Bland-Altman Analyse der bias herangezogen werden, um die Übereinstimmung beider Methoden abzuschätzen (Bland and Altman 1999; Hyltoft Petersen, Blaabjerg et al. 2004; Jensen and Kjelgaard-Hansen 2006).

Folgende Abbildung 5.1 zeigt am Beispiel des Parameters WBC eine sehr gute Übereinstimmung der beiden Methoden in der Bland-Altman Analyse. Der bias hat hier einen sehr kleinen Wert von $-0,0002 \times 10^9/L$.

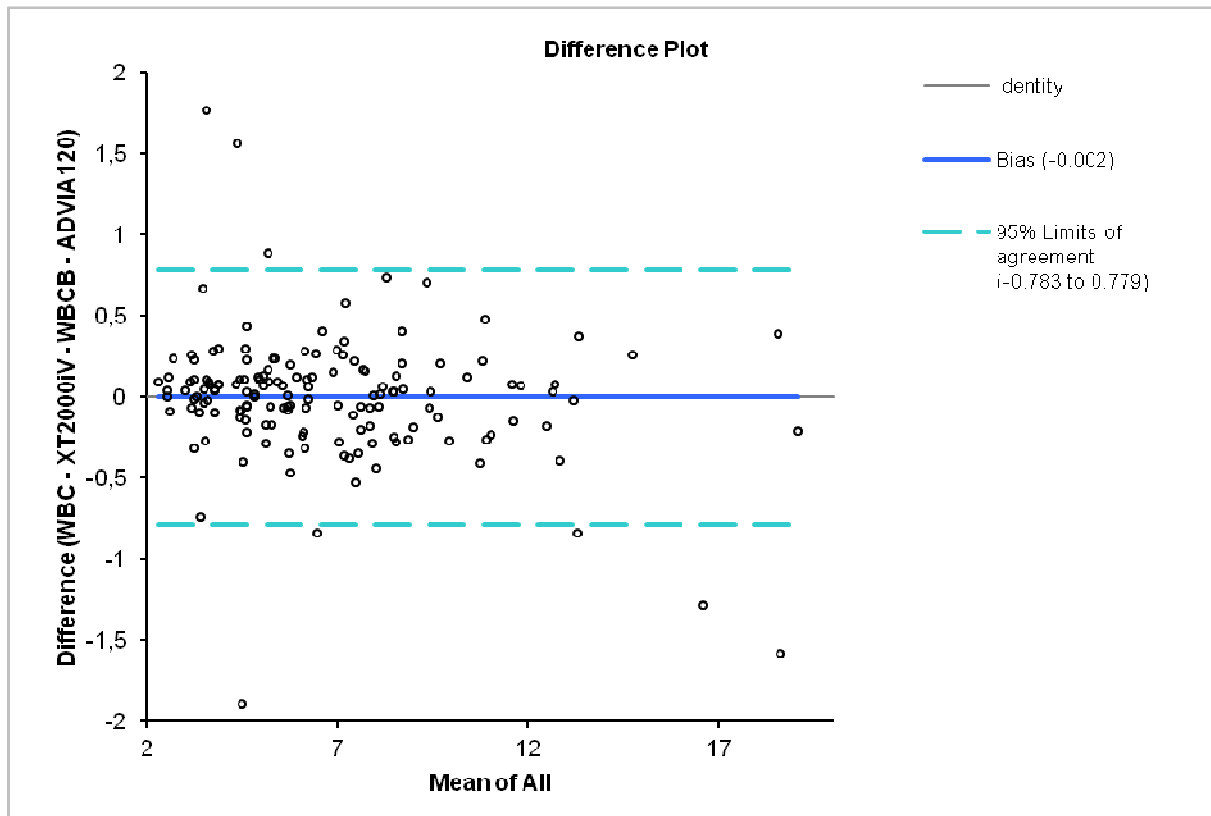


Abbildung 5.1: Bland-Altman Analyse für den Parameter WBC, Vergleich des XT-2000iV mit dem ADVIA® 120; Tierart Ratte, Stamm Wistar

In der nachfolgenden Abbildung 5.2 wird eine Differenz der beiden Messmethoden mit einem negativen bias von $-162,5 \times 10^9/L$ für den Parameter Thrombozyten deutlich. Der ADVIA® 120 misst diesen überwiegend höher, wobei die Werte umso stärker differieren, je höher der gemessene Wert ist.

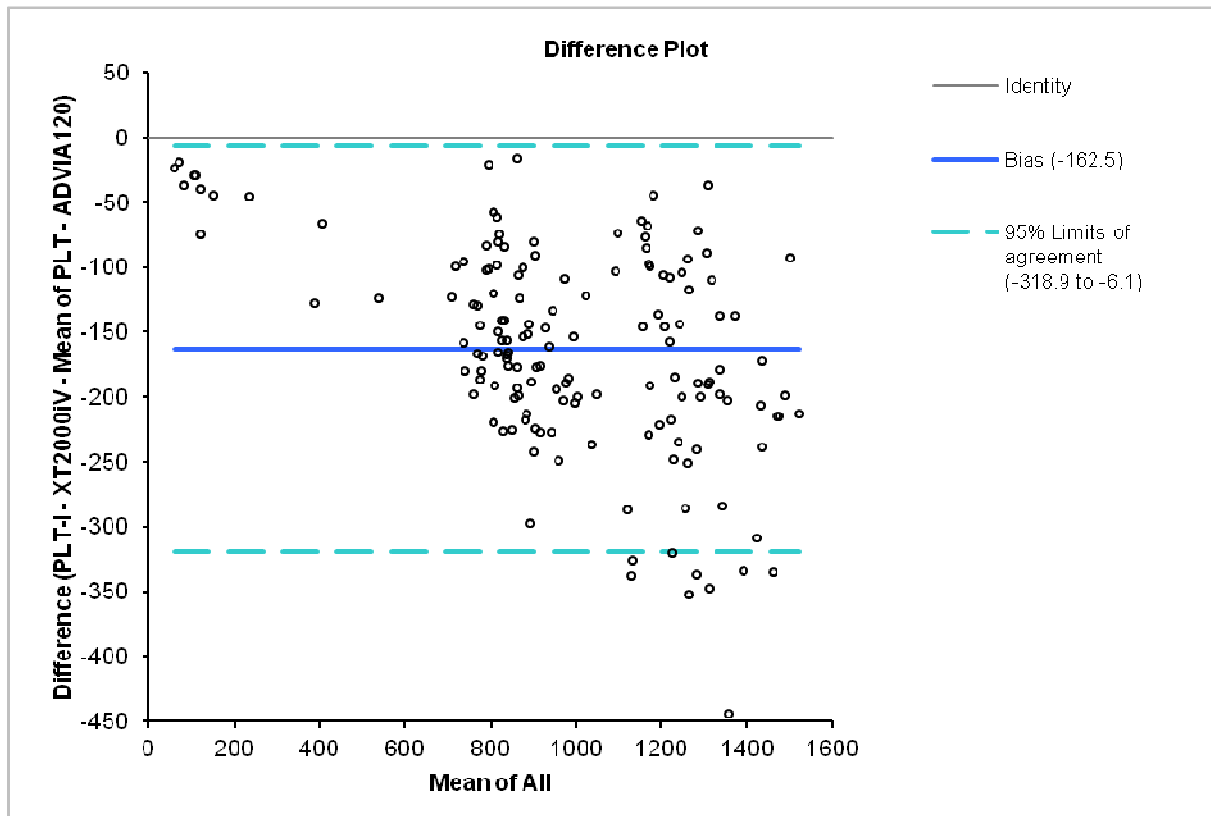


Abbildung 5.2: Bland-Altman Analyse für den Parameter platelets, Vergleich des XT-2000iV mit dem ADVIA® 120; Tierart Ratte, Stamm Wistar

Die Beschreibung möglicher konstanter oder proportionaler Fehler zwischen den beiden untersuchten Geräten für die Ratte ist wichtig, um eine umfassende Bewertung des neu zu etablierenden Systems zu gewährleisten. Bisher wurden unseres Wissens entsprechende Werte für die Messung von Rattenblut am XT-2000iV nicht veröffentlicht.

5.2.1 Blutzellzählung

Zum einen werden die eigenen Ergebnisse einer vergleichenden Studie mit zwei Geräten der Firma Sysmex für Humanblut gegenübergestellt (Langford, Luchtman-Jones et al. 2003). Zum anderen erfolgt eine Gegenüberstellung zu zwei Arbeiten aus dem veterinärmedizinischen Bereich, die den XT-2000iV mit dem ADVIA® 2120 für die Tierarten Hund und Katze vergleichen (Dunker 2010; Nakagawa 2010). Eine vierte Arbeit wird herangezogen, in der die Geräte ADVIA® 120 und XT-2000iV unter anderem für Blutproben der Ratte verglichen

werden. Hier wird allerdings nur der Korrelationskoeffizient R^2 angegeben. Die Methode zu dessen Errechnung bleibt unklar. Auch bias, intercept und slope werden nicht angegeben (Mathers, Evans et al. 2008).

Tabelle 5.1: Ergebnisvergleich für die Parameter WBC, RBC, HGB und HCT der eigenen Studie mit vier weiteren Studien (LANGFORD et al. 2003; NAKAGAWA 2010; DUNKER 2010, MATHERS et al. 2008); r = Korrelationskoeffizient (r_s : aus Spearman Korrelation), i = intercept, s = slope, b = bias

Studie	Hämatologiesystem	WBC	RBC	HGB	HCT
Eigene Studie, Tierart: Ratte	ADVIA® 120 / XT-2000iV™	$r_s = 0,99$ i = 0,09 s = 0,99 b = -0,002	$r_s = 0,89$ i = 0,31 s = 1,02 b = 0,50	$r_s = 0,77$ i = 0,40 s = 1,00 b = 0,32	$r_s = 0,75$ i = 9,52 s = 0,82 b = 2,00
LANGFORD et al. 2003, Humanblut	XE-2100 / XT-2000i	r = 1,00 i = -0,63 s = 1,12	r = 1,00 i = -0,12 s = 1,03	r = 1,00 i = -0,16 s = 1,02	r = 0,99 i = -0,43 s = 1,0
NAKAGAWA 2010, Tierart: Katze	ADVIA® 2120 / XT-2000iV	$r_s = 1,00$ i = 0,07 s = 1,01 b = 0,18	$r_s = 0,98$ i = -0,37 s = 1,11 b = 0,46	$r_s = 0,99$ i = -0,03 s = 0,82 b = -1,72	verglichen mit Zentrifugen- hämatokrit
DUNKER 2010, Tierart: Hund	ADVIA® 2120 / XT-2000iV	r = 1,00 i = -0,17 s = 1,01 b = 0,01	r = 0,98 i = -0,38 s = 1,10 b = 0,22	r = 0,82 i = -0,02 s = 1,20 b = 1,06	r = 0,98 i = 0,00 s = 1,03 b = 0,01
MATHERS et al., Tierart: Ratte	ADVIA® 120 / XT-2000iV	r = 0,995	r = 0,908	r = 0,963	r = 0,952

Für die Gesamtleukozytenzahl kann für den XT-2000iV ein exzellentes Ergebnis erzielt werden, das mit denen der anderen Studien vergleichbar ist.

Für den Parameter RBC ist das Ergebnis gut, allerdings schlechter als in den anderen aufgeführten Studien.

Beim Vergleich zweier Analysemethoden sollte möglichst das gesamte Spektrum an Ergebnissen, inklusive krankhaft veränderter Werte, herangezogen werden (Jensen and Kjelgaard-Hansen 2006). Für die Parameter des roten Blutbildes stehen für die aktuellen Untersuchungen, wie in der Abbildung 5.3 ersichtlich, nur wenige Proben außerhalb des Referenzbereiches zur Verfügung. Die meisten gemessenen Werte für RBC befinden sich im Bereich von $7-10^{12}/l$. Anämische veränderte Werte liegen nur vereinzelt vor. Die mangelnde Datenverteilungsbreite kann die schlechteren Ergebnisse der Auswertung erklären.

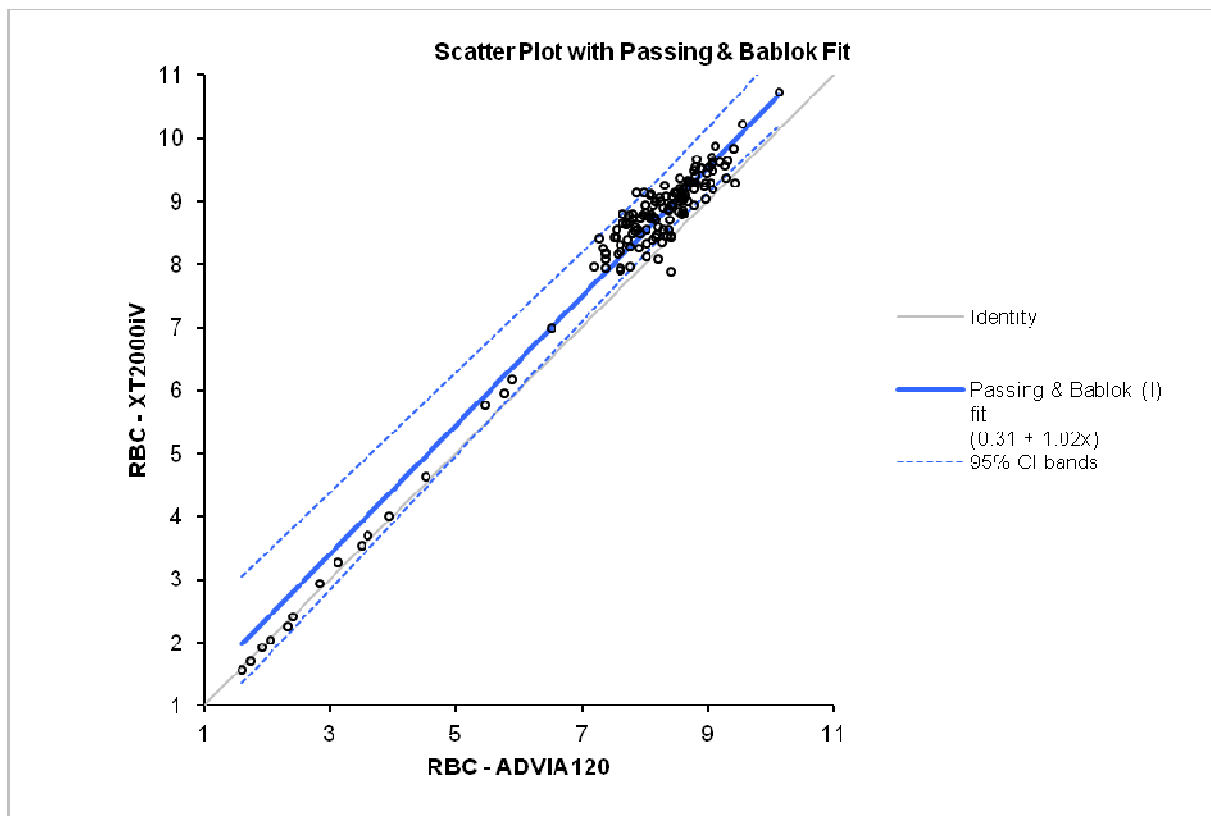


Abbildung 5.3: Passing Bablok Regression für den Parameter RBC, Vergleich XT-2000iV mit ADVIA® 120; Tierart Ratte, Stamm Wistar

Der XT-2000iV berechnet den Hämatokrit anhand der Erythrozytenvolumina und die Parameter MCV, MCH und MCHC aus den Variablen RBC, HGB und HCT. Somit setzt sich das Problem der ungenügenden Verteilung der RBC-Werte bei der Beurteilung der weiteren Parametern fort.

Hämoglobin wird vom XT-2000iV, im Gegensatz zum ADVIA® 120, mit einer cyanfreien Methode gemessen. BAUER et al. finden bei dem Vergleich von ADVIA® 120 und ADVIA® 2120, der ebenfalls cyanfrei misst, einen proportionalen Fehler mit höheren Werten für den ADVIA® 2120 (Bauer and Moritz 2008). Auch aktuell werden die meisten Proben vom XT-2000iV etwas höher bewertet als vom ADVIA® 120 mit der Cyanmethämoglobinmethode.

TOYOTA et al. gibt im Vergleich des XT-2000i mit dem ADVIA® 120 für verschiedene Labortierarten Korrelationskoeffizienten von größer 0,9 für alle untersuchten Parameter an. Nähere Angaben zu diesen Parametern und den genauen Werten werden aber nicht gemacht (Toyota, Ooe et al. 2004).

Tabelle 5.2: Ergebnisvergleich für die Parameter MCV, MCH, MCHC und platelets der eigenen Studie mit vier weiteren Studien (LANGFORD et al. 2003; NAKAGAWA 2010; DUNKER 2010, MATHERS et al. 2008), r = Korrelationskoeffizient (r_s aus Spearman Korrelation), i = intercept, s = slope, b = bias

Studie	Hämatologiesystem	MCV	MCH	MCHC	PLT
Eigene Studie, Tierart: Ratte	ADVIA® 120 / XT- 2000iV	$r_s= 0,91$ $i= -22,74$ $s= 1,43$ $b= -0,18$	$r_s= 0,89$ $i= 4,53$ $s= 0,71$ $b= -0,70$	$r_s= 0,25$ $i= 25,44$ $s= 0,26$ $b= -1,10$	$r_s= 0,94$ $i= -54,40$ $s= 0,90$ $b= -162,5$
LANGFORD et al. 2003, Humanblut	XE-2100™ / XT- 2000i™	$r= 0,98$ $i= 0,51$ $s=0,99$	$r= 0,99$ $i= -0,33$ $s=1,03$	$r= 0,86$ $i= 5,93$ $s=0,84$	$r= 0,98$ $i= 4,55$ $s= 1,04$
NAKAGAWA 2010, Tierart: Katze	ADVIA® 2120 / XT- 2000iV	$r_s= 0,87$ $i= -17,16$ $s= 1,60$ $b= 8,24$	$r_s= 0,96$ $i= 0,05$ $s= 0,72$ $b= -0,26$	$r_s= 0,39$ $i= -6,99$ $s= 0,91$ $b= -9,45$	$r_s= 0,89$ $i= 8,44$ $s= 0,93$ $b= 3,8$
DUNKER 2010, Tierart: Hund	ADVIA® 2120 / XT- 2000iV	$r= 0,91$ $i= -13,01$ $s= 1,22$ $b= 2,04$	$r= 0,50$ $i= 0,80$ $s= 0,37$ $b= -0,24$	$r= 0,28$ $i= 14,33$ $s= 0,26$ $b= -4,11$	$r= 0,98$ $i= -3,80$ $s= 0,83$ $b= -56,60$
MATHERS et al., Tierart: Ratte	ADVIA® 120 / XT- 2000iV	$r = 0,938$	$r = /$	$r = /$	$r = 0,927$

Die Korrelationskoeffizienten für die Parameter MCV, MCH und Thrombozyten sind gut bis exzellent und in den meisten Fällen in etwa vergleichbar mit denen der beiden Studien aus dem Jahre 2010 (Dunker 2010; Nakagawa 2010). Jedoch fällt ein proportionaler Fehler für MCV auf und für die Thrombozyten ein deutlicher negativer bias. Wie in Abbildung 4.3 im Ergebnisteil ersichtlich, ist auch für den Parameter MCV eine geringe Verteilungsbreite des Probenmaterials gegeben. Dennoch ist die Korrelation hierfür mit $r = 0,91$ gut und lässt sich mit den anderen Studien vergleichen.

Für den Parameter MCHC ist die Korrelation schlecht. Auch in anderen Studien, die mit tierischen Materialien arbeiten, fällt der Korrelationskoeffizient hierfür nicht gut aus (Dunker 2010; Nakagawa 2010). Für MCHC liegen die Werte aller Proben in den meisten Studien in einem sehr engen Messbereich. Dadurch sind generell schlechtere Korrelationskoeffizienten zu erwarten als für solche Parameter, bei denen die Zahlenwerte eine größere Streuung aufweisen.

LANGFORD et al. finden für alle Parameter exzellente Werte (Langford, Luchtman-Jones et al. 2003). Diese Studie vergleicht allerdings zwei Geräte desselben Herstellers mit dementsprechend vergleichbarer Technik, weswegen sehr gute Werte zu erwarten sind.

Auch MATHERS et al. finden überwiegend exzellente Werte, haben aber nicht alle Parameter untersucht. (Mathers, Evans et al. 2008).

5.2.2 Differentialblutbild

Die beiden folgenden Tabellen 5.3 und 5.4 stellen die eigenen Ergebnisse für die Blutzell-differenzierung vor und vergleichen sie mit denen zweier Studien (Langford, Luchtman-Jones et al. 2003; Mathers, Evans et al. 2008). Die beiden anderen Studien, die bisher zum Vergleich herangezogen wurden, stellen diese Parameter nur der manuellen Differenzierung gegenüber (Dunker 2010; Nakagawa 2010).

Tabelle 5.3: Ergebnisvergleich für die Parameter NEUT#, LYMPH#, MONO#, EO# und BASO# der eigenen Studie mit einer weiteren Studie (LANGFORD et al. 2003), r = Korrelationskoeffizient (r_s aus Spearman Korrelation), i = intercept, s = slope, b = bias

Studie	Hämatologiesystem	NEUT#	LYMPH#	MONO#	EO#	BASO#
Eigene Studie, Tierart: Ratte	ADVIA® 120 / XT-2000iV	$r_s = 0,64$ $i = -0,05$ $s = 0,93$ $b = -0,03$	$r_s = 0,99$ $i = 0,02$ $s = 1,01$ $b = 0,06$	$r_s = 0,79$ $i = -0,04$ $s = 2,40$ $b = 0,17$	$r_s = 0,85$ $i = -0,03$ $s = 1,17$ $b = -0,02$	$r_s = 0,46$ $i = 0,0$ $s = 0,0$ $b = -0,04$
LANGFORD et al. 2003, Humanblut	XE-2100™ / XT-2000i™	$r = 1,0$ $i = 0,01$ $s = 1,01$	$r = 0,98$ $i = 0,04$ $s = 0,96$	$r = 0,98$ $i = 0,05$ $s = 1,10$	$r = 0,99$ $i = -0,01$ $s = 1,02$	$r = 0,99$ $i = -0,01$ $s = 1,09$

Für die Lymphozyten ergibt sich im Vergleich der beiden Geräte ein exzellentes und mit der Studie von LANGFORD et al. vergleichbares Ergebnis. Der Korrelationskoeffizient für die Eosinophilen ist gut, während der der übrigen Populationen als ausreichend bis schlecht (Basophile) zu beurteilen ist.

Die gemessenen Werte für die Basophilen des XT-2000iV liegen überwiegend bei null, während der ADVIA® 120 für diese Zellpopulation Zahlenwerte angibt. LILLIEHÖÖK et al. stellen in zwei Untersuchungen eine Unterschätzung der Basophilen durch den XT-2000iV für die Tierarten Hund und Katze fest (Lilliehook and Tvedten 2009; Tvedten and Lilliehook 2011). Auch MATHERS et al. finden geringere Konzentrationen von Basophilen, bei am XT-2000iV gemessenen Proben, im Vergleich zu anderen Systemen (Mathers, Evans et al. 2008).

Tabelle 5.4: Ergebnisvergleich für die Parameter NEUT%, LYMPH%, MONO%, EO% und BASO% der eigenen Studie mit einer weiteren Studie (MATHERS et al. 2008), r_s = Korrelationskoeffizient (r_s aus Spearman Korrelation)

Studie	Hämatologiesystem	NEUT%	LYMPH%	MONO%	EO%	Baso%
Eigene Studie , Tierart: Ratte	ADVIA® 120 / XT-2000iV	$r_s = 0,94$	$r_s = 0,84$	$r_s = 0,41$	$r_s = 0,72$	$r_s = 0,23$
MATHERS et al. 2008, Tierart: Ratte	ADVIA® 120 / XT-2000iV	$r = 0,974$	$r = 0,965$	$r = 0,468$	$r = 0,625$	$r = 0,169$

Die Ergebnisse für die Prozentwerte des Differentialblutbildes sind in etwa vergleichbar zu denen von MATHERS et al. gefundenen Werten (Mathers, Evans et al. 2008).

In Abbildung 4.5 im Ergebnisteil wird deutlich, dass der XT-2000iV für die Prozentzahl der Monozyten im Blut höhere Werte misst als der ADVIA® 120. Drei Werte im niedrigen Messbereich fallen aus diesem Muster heraus und werden vom ADVIA® 120 höher gemessen.

TVEDTEN und LILLIEHÖÖK finden für den Hund eine Überbewertung der Monozyten durch den ADVIA® 120 bei geringen Zellkonzentrationen und eine Unterschätzung bei hohen Werten (Tvedten and Lilliehook 2011). Dieses Ergebnis kann somit in vorliegender Studie in Ansätzen bestätigt werden.

Die Technik zur Ermittlung der Monozyten unterscheidet sich bei den verwendeten Laborgeräten. Der ADVIA® 120 misst die Leukozyten nach Peroxidasefärbung im Halogenlicht. Beim XT-2000iV hingegen werden intrazelluläre Nukleinsäuren angefärbt und die Zellen im Anschluss mittels Fluoreszenzdurchflusszytometrie gemessen. Beide Techniken stellen nicht die Referenzmethode zur exakten Identifikation von Monozyten dar. Als solche gilt die Ermittlung mittels Differenzierung am Mikroskop. Jedoch ist diese Methode subjektiv und hat aufgrund der geringen Anzahl der Monozyten im Blut eine schlechte Reproduzierbarkeit.

HOLSTEG stellt die Messung der Leukozyten am ADVIA® 120 der manuellen Blutzelldifferenzierung mittels Peroxidase-, Panoptischen- und α -Naphthylacetat-Esterasegefärbten Blutausstrichen gegenüber (Holsteg 2002). Für die Peroxidase-Färbung kann hier

ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,410$ für Monozyten ermittelt werden. Für die beiden anderen Färbungen fallen die Ergebnisse ähnlich schlecht aus (Holsteg 2002). GOOSSENS et al. finden im Vergleich zur manuellen Differenzierung gute Ergebnisse mittels durchflusszytometrischer Messung nach Antikörpermarkierung mit CD45 und dem Monozytenmarker CD14 (Goossens, Van Hove et al. 1991). Diese Technik ist aber für den Routinegebrauch zu aufwändig. Daher wird in dieser Veröffentlichung das generelle Fehlen einer geeigneten Referenzmethode zur Bestimmung von Monozyten diskutiert (Goossens, Van Hove et al. 1991).

Die Vergleichbarkeit der manuellen Zelldifferenzierung mit den beiden Geräten fällt jeweils ähnlich aus. Für die Neutrophilen finden sich mit Korrelationskoeffizienten von jeweils 0,82 gute Werte (%/#). Für die Lymphozyten fallen diese ausreichend aus, für die Eosinophilen und Monozyten schlecht.

Die manuelle Differenzierung von Blutaussstrichen hat eine geringe Reproduzierbarkeit. So spielt, neben der Erfahrung des Untersuchers und der Verteilung der Zellen im Ausstrich, vor allem die Anzahl der gezählten Zellen eine Rolle. Je mehr Zellen ausgezählt werden, desto präziser wird das Ergebnis der manuellen Auswertung. Vor allem Zellen, die im Blut relativ selten vertreten sind, bedingen eine hohe statistische Variabilität. RÜMKE gibt als statistisches Beispiel einen Ausstrich mit 4% stabförmigen Neutrophilen an, bei dem bei einem manuellen 200-Zell-Diff Werte zwischen 1% und 8% in 95% der Fälle ermittelt werden können (Rümke 1959).

Weiterhin ist auch hier wieder anzumerken, dass die Proben der Ratten ausnahmslos für die Monozyten und Eosinophilen Granulozyten Werte in einem engen Messbereich aufweisen. Wie bereits besprochen, stellt dies einen limitierenden Faktor für eine abschließende Beurteilung dar (Jensen and Kjelgaard-Hansen 2006).

Bei Studien aus dem klinischen Bereich streuen die Werte des Differentialblutbildes aufgrund des meist breiten Spektrums an Krankheitsbildern weiter. Daher fallen die ermittelten Korrelationskoeffizienten dort meist besser aus (Dunker 2010; Nakagawa 2010). Jedoch können auch in diesen Studien keine zufriedenstellenden Ergebnisse für die Monozyten ermittelt werden. Grund hierfür ist die stark variable Morphologie dieser Zellen,

die in den verschiedenen Bestimmungsmethoden zu jeweils unterschiedlichen Fehlklassifizierungen führen kann.

5.2.3 Retikulozyten

Folgende Tabelle 5.5 vergleicht die Ergebnisse für die Retikulozyten mit denen einer weiteren Studie, in der ein Vergleich der Messung an zwei verschiedenen Sysmex-Geräten vorgenommen wurde (Langford, Luchtman-Jones et al. 2003).

Tabelle 5.5: Ergebnisvergleich für die Retikulozyten der eigenen Studie mit einer weiteren Studie (LANGFORD et al. 2003), r = Korrelationskoeffizient (r_s aus Spearman Korrelation), i = intercept, s = slope, b = bias

Studie	Hämatologiesystem	Retikulozyten #	Retikulozyten %
Eigene Studie , Tierart: Ratte	ADVIA® 120 / XT-2000iV	$r_s = 0,83$ $i = -0,02$ $s = 1,77$ $b = 0,1$	$r_s = 0,92$ $i = 0,19$ $s = 1,43$ $b = 1,01$
LANGFORD et al. 2003, Humanblut	XE-2100™ / XT- 2000i™	$r = 0,99$ $i = -0,01$ $s = 1,2$	$r = 0,99$ $i = -0,22$ $s = 1,22$

Die Korrelationskoeffizienten sind als gut zu bewerten. Die Messwerte des XT-2000iV liegen im Mittel über denen des ADVIA® 120. Diese Beobachtung machen auch andere Autoren (Mathers, Evans et al. 2008; Bourguès-Abella, Geffré et al. 2011).

Auch bei diesen Parametern erzielt LANGFORD et al. exzellente Ergebnisse beim Vergleich der beiden Geräte aus dem Hause Sysmex (Langford, Luchtman-Jones et al. 2003). MATHERS et al. erzielten einen Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,782$ für die Retikulozyten (% , Tierart Ratte) im Vergleich zwischen ADVIA® 120 und XT-2000iV (Mathers, Evans et al. 2008). Als Referenzmethode zur Bestimmung der Retikulozyten dient eigentlich die manuelle Auszählung nach Supravitalfärbung. Diese Untersuchung wurde für die Blutproben der Ratte in dieser Studie jedoch nicht durchgeführt. Auch die Prüfung auf Linearität und Versuche

zum Carry over konnten leider aufgrund des geringen Probenvolumens nicht durchgeführt werden. Diese sollten für eine abschließende Bewertung in weiteren Studien ermittelt werden.

Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Auswertungen, dass sich das Gerät XT-2000iV für die Untersuchung von Blut der Tierart Ratte gut eignet.

5.3 Vergleich von Blutproben von Wistar Ratten aus unterschiedlicher Herkunft

Der Vergleich der beiden Rattengruppen zweier verschiedener Züchter zeigt einen deutlichen Einfluss bezüglich der Herkunft der Tiere für die meisten routinemäßig gemessenen Parameter. Für Ratten ist bekannt, dass interne Faktoren (wie Alter, Geschlecht und Stamm) die Ausprägung hämatologischer Parameter beeinflussen können (Jackson, Hutson et al. 1988; Turton, Hawkey et al. 1989; Robel, Lochmiller et al. 1996; Aleman, Mas et al. 1998; Gikins 1999; Feldmann 2000; Gikins 2008). Außerdem werden Referenzintervalle durch externe Faktoren, beispielsweise Lebensraum und Bewegungsintensität, in ihrer Ausprägung beeinflusst (Kaufman, Harris et al. 1994; Robel, Lochmiller et al. 1996). Auch der Einfluss der Fütterung auf die Blutwerte wurde bereits hinlänglich beschrieben (Schwartz, Tornaben et al. 1973; Pickering and Pickering 1984; Ogawa, Matsumoto et al. 1985; Levin, Semler et al. 1993; Hubert, Laroque et al. 2000; Yoshii, Y. et al. 2002/2003; Moriyama, Tsujioka et al. 2008; Miyata, Asanuma et al. 2009; Asanuma, Miyata et al. 2011).

In der pharmazeutischen Industrie verwendete Ratten sind ausschließlich unter Laborbedingungen gezüchtete Tiere. Die Tatsache, dass eine unterschiedliche Herkunft bei Tieren gleicher Rasse Alterationen bezüglich der hämatologischen Werte bedingt, wurde meines Wissens bisher noch nicht in der Literatur beschrieben.

Jedoch ist aus der Humanmedizin bekannt, dass die geographische Herkunft und ethnische Zugehörigkeit durchaus Einfluss auf die Hämatologie haben kann (Bain, Seed et al. 1984; Bain 1996). Daher ist unter anderem die Etablierung angepasster Referenzintervalle für Menschen in unterschiedlichen Gebieten üblich (Karita, Ketter et al. 2009). Auch im

veterinärmedizinischen Bereich wird dazu geraten, die geographische Lokalisation bei der Erstellung von Referenzintervallen zu berücksichtigen (Friedrichs, Barnhart et al. 2011).

Die untersuchten Ratten in dieser Studie wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten. Nach ihrer Ankunft im Institut für Toxikologie durften sie sich einige Wochen bis zum Studienbeginn akklimatisieren. Daher können Faktoren, welche die Umgebungsbedingungen betreffen, als Grund für die unterschiedlichen Referenzintervalle ausgeschlossen werden. Männliche und weibliche Tiere werden getrennt bewertet und das Alter der eingesetzten Tiere ist vergleichbar. Die Verabreichung unterschiedlicher Trägersubstanzen an die Tiere könnte eine Ursache der Unterschiede sein. Jedoch wurde überwiegend 0,25% Aqueous Hydroxypropyl Methylcellulose eingesetzt. Die gruppenübergreifende Anwendung spricht gegen einen ausschlaggebenden Effekt auf die hämatologischen Parameter. Die dargestellten Resultate sind für die gruppenweise Auswertung präklinischer Sicherheitsstudien in der pharmazeutischen Forschung bedeutend. Bei hämatologischen Untersuchungen ist eine dosisbezogene Bewertung einzelner Tiergruppen notwendig. Üblicherweise werden Tiere in mindestens vier Dosisgruppen eingeteilt. Die Kontrollgruppe bekommt nur die Trägersubstanz des zu testenden Materials verabreicht. Drei weitere Gruppen bekommen steigende Konzentrationen der Substanz appliziert.

Somit sollte beispielsweise die Gesamtleukozytenzahl nach Gabe einer Substanz, die einen Abfall dieser Zellpopulation bedingt, in der Niedrig-Dosis-Gruppe weniger sinken als in der Tiergruppe, die mit einer hohen Dosis behandelt wurde.

Bei Tieren, die nur wenige Leukozyten im Blut aufweisen, ist eine Darstellung von dosisbezogenen Abstufungen für solche Substanzen kaum möglich. Eine solche gruppenbezogene Differenzierung ist, basierend auf den vorliegenden Daten, bei weiblichen Gruppe-2-Tieren mit WBC-Werten von rund $8,5 \times 10^9/L$ besser zu verdeutlichen als bei weiblichen Tieren der Gruppe 1 mit WBC-Werten von ca. $3 \times 10^9/L$.

Weiterhin haben die vorliegende Ergebnisse Relevanz bezüglich der Auswertung von hämatologischen Messergebnissen einzelner Tiere, da es zur Fehlinterpretation von erhobenen Werten kommen kann. Wendet man nicht optimierte Referenzintervalle bei der Beurteilung von Blutanalysen an, können zum einen pathologische Werte übersehen werden (falsch-negativ). Zum anderen werden unauffällige Werte eventuell als pathologisch gedeutet (falsch-positiv). Nimmt man z. B. die Referenzintervalle der Gruppe-1-Tiere als

Bewertungsbasis, würden relativ hohe WBC-Werte der zweiten Rattengruppe als Leukozytose fehlinterpretiert. Zum anderen kommt es zur falschen Diagnose einer Thrombozytopenie bei einem Tier der ersten Gruppe, das mit Referenzwerten der Gruppe-2-Tiere beurteilt wird.

In der Literatur ist eine Studie mit Wistar Ratten weiblichen Geschlechts zu finden, die zur Beurteilung der eigenen erhobenen Daten herangezogen wird (Liberati, Sansone et al. 2004). Vergleichbare aktuelle Werte für männliche Tiere lassen sich nicht finden, mit Ausnahme einer Studie aus dem Hause eines Züchters und Vertreibers für Labortiere (Gikins 2008).

Tabelle 5.6: Vergleich der Parameter WBC, Lymphozyten, RBC und MCV der weiblichen Ratten, Stamm Wistar, Gruppe 1 ($n = 73$) und 2 ($n = 30$) mit denen von LIBERATI et al. ($n = 150$)

Parameter	Gruppe 1	Gruppe 2	Liberati et al.
WBC ($\times 10^9/L$)	2,13 – 6,99	4,20 – 9,38	4,12 – 9,59
LYMPH ($\times 10^9/L$)	1,69 – 5,67	3,38 – 8,18	3,32 – 8,53
RBC ($10^{12}/L$)	7,61 – 9,05	8,45 – 10,07	7,64 – 8,85
MCV (fl)	47,91 – 56,87	45,50 – 51,70	51,0 – 55,8

Aus Tabelle 5.6 wird deutlich, dass bereits publizierte Werte für die Parameter WBC und Lymphozytenzahl vergleichbar mit denen der aktuellen Gruppe-2-Tiere sind. Die Werte von Ratten der Gruppe 1 liegen deutlich darunter.

Ein Abfall von WBC- und Lymphozytenwerten im Blut wurde durch die Gabe verschiedener Pharmazeutika beschrieben (Thomson, Whiting et al. 1981; Yao, DuBois et al. 2008). Auch das Alter hat Einfluss auf die Quantität der Leukozyten im Blut (Wolford, Schroer et al. 1986; Turton, Hawkey et al. 1989; Gikins 1999; Feldmann 2000; Gikins 2008).

Außerdem kommt es zu erniedrigten Werten dieser Parameter bei restriktiv gefütterten Tieren (Ogawa, Matsumoto et al. 1985; Levin, Semler et al. 1993; Hubert, Laroque et al. 2000; Yoshii, Y. et al. 2002/2003; Moriyama, Tsujioka et al. 2008; Miyata, Asanuma et al. 2009; Asanuma, Miyata et al. 2011).

Für den Parameter RBC sind die erhobenen Daten der Tiere der Gruppe 1 vergleichbar mit denen von LIBERATI et al., wohingegen die weiblichen Tiere der aktuellen Gruppe 2 höhere Werte zeigen (Liberati, Sansone et al. 2004).

Für das mittlere Erythrozytenvolumen liegt das Referenzintervall der älteren Studie ebenfalls eher im Bereich dessen der aktuellen Gruppe-1-Tiere. Es weist allerdings einen engeren 95%-Bereich und vor allem ein höheres unteres Referenzlimit auf.

Auch für das rote Blutbild sind oben aufgeführte Faktoren mögliche Auslöser für Veränderungen. So haben verschiedene Pharmazeutika und Chemikalien Einfluss (Nemoto, Yokota et al. 2001; Woo, Krzyzanski et al. 2007; Berradi, Bertho et al. 2008), genauso wie eine restriktive Fütterung (Schwartz, Tornaben et al. 1973; Pickering and Pickering 1984; Levin, Semler et al. 1993; Yoshii, Y. et al. 2002/2003; Moriyama, Tsujioka et al. 2008; Miyata, Asanuma et al. 2009; Asanuma, Miyata et al. 2011). Mit steigendem Alter findet man bei Ratten Veränderungen bei den Werten für RBC, MCV, MCH und Retikulozyten (Wolford, Schroer et al. 1986; Turton, Hawkey et al. 1989; Gikins 1999; Feldmann 2000; Gikins 2008).

Signifikante Unterschiede zeigen sich beim Vergleich der Thrombozyten zwischen den beiden Rattengruppen sowohl für weibliche als auch für männliche Tiere. Gruppe-2-Tiere weisen höhere PLT-Werte auf. Die Thrombozyten der Tiere der Gruppe 1 sind etwas größer, wohingegen der PCT dieser Gruppe etwas geringer ausfällt.

Quantitative Abweichungen für Thrombozytenparameter werden durch den Einsatz von pharmazeutischen Produkten (Ramot, Lewis et al. 2007) oder in speziell gezüchteten Inzucht-Stämmen gesehen (Jackson, Hutson et al. 1988).

Und auch hier wird wieder ein Einfluss der Fütterung deutlich, in Form von verminderten Werten bei den hungernden Tieren (Levin, Semler et al. 1993; Hubert, Laroque et al. 2000; Moriyama, Tsujioka et al. 2008; Miyata, Asanuma et al. 2009).

All die beschriebenen Faktoren können für die festgestellten signifikanten Unterschiede zwischen den hämatologischen Parametern der aktuellen Rattengruppen ausgeschlossen werden. Die Tiere sind zum Zeitpunkt der Untersuchung gleich alt und leben unter denselben Haltungs- und Fütterungsbedingungen. Nach ihrer Ankunft im Institut für

Toxikologie haben sie Zeit, sich an die Umgebung zu gewöhnen. Es handelt sich um Kontrolltiere, die keine pharmakologisch wirksamen Produkte erhalten.

Eine plausible Ursache für die unterschiedlichen hämatologischen Referenzwerte wären genetische Faktoren. Durch die Weiterzucht eines Rattenstammes an zwei verschiedenen Standorten könnten sich diese genetisch über die Jahre soweit auseinander entwickelt haben, dass dies Einflüsse auf die Blutzellen haben könnte.

Dieser Aspekt wurde während der aktuellen Untersuchung nicht berücksichtigt. Die Durchführung genetischer Tests war leider nicht möglich. Daher werden zur weiteren Klärung der beschriebenen Ergebnisse derartige Untersuchungen in zusätzlichen Studien angeraten.

5.4 Referenzintervalle für die Tierart Ratte

Für den XT-2000iV wurden unseres Wissens bisher keine Referenzintervalle für die Tierart Ratte und im Speziellen für den Stamm Wistar erstellt. Für Ratten dieses Stammes sind Referenzintervalle im Allgemeinen rar gesät. Während erst in der neuesten Auflage des Standardwerkes der hämatologischen Literatur (Schalm's Veterinary Hematology) Referenzintervalle für Wistar Ratten beschrieben werden, sind diese im speziellen Werk für Ratten als Labortiere (The Laboratory Rat) nicht berücksichtigt (Suckow 2006; Weiss and Wardrop 2010). Unterschiede zwischen verschiedenen Züchtern bzw. Rattenstämmen finden sich in der Literatur nicht (Suckow 2006; Weiss and Wardrop 2010). Weiterhin sollten publizierte Referenzintervalle generell kritisch und nur nach einer Überprüfung der Anwendbarkeit auf die eigene Untersuchungspopulation angewandt werden (Bourgès-Abella, Geffré et al. 2011; Friedrichs, Barnhart et al. 2011).

Die in dieser Untersuchung beschriebenen Ratten der Gruppe 1 werden in der pharmazeutischen Industrie häufig genutzt. Auch der XT-2000iV findet immer mehr Einzug in entsprechende Labore. Daher ist die Etablierung von gesonderten Referenzintervallen sinnvoll.

Eine vergleichende Studie für Blutproben der Ratte am XT-2000iV mit anderen Geräten zeigt moderate bis exzellente Korrelationen mit nur geringen Unterschieden zwischen den Ergebnissen (arithmetische Mittelwerte) (Mathers, Evans et al. 2008). Dennoch können unterschiedliche Techniken immer ein Grund für abweichende Laborergebnisse sein, weswegen gesonderte Referenzintervalle für einzelne Geräte zu empfehlen sind (Bourgès-Abella, Geffré et al. 2011).

LIBERATI et al. untersuchten nur weibliche Tiere und analysierten die Proben am Technicon H*1, einem älteren Gerät der Firma Bayer (Liberati, Sansone et al. 2004). Vor allem für die Parameter des weißen Blutbildes und der Differenzierung unterscheiden sich deren Werte deutlich zu den hier gemessenen (Liberati, Sansone et al. 2004).

Eine weitere Publikation von Referenzintervallen für männliche und weibliche Wistar Ratten stammt aus dem Hause des Züchters dieses Stammes (Gikins 2008). Die dort gesammelten Daten wurden über aus einem Zeitraum von fünf Jahren erhoben und am ADVIA® 120 analysiert. Verwendet wurden 8-16 Wochen alte Tiere ($n = 156 - 181$). Angegeben sind der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung und der Range der Messwerte (Gikins 1999).

Bei Angabe des Ranges werden Ausreißer zu beiden Seiten nicht ausgeschlossen. Eher üblich ist es, nur 95% der Referenzpopulation in die Berechnung mit einzubeziehen und diese somit durch Berechnung der 0,025 und 0,975 Perzentile einzugrenzen (Geffré, Friedrichs et al. 2009). Manche Autoren bevorzugen allenfalls die Berechnung des 0,999-Fraktils für Routineuntersuchungen (Jorgensen, Brandslund et al. 2004).

Trotz der Unterschiede bezüglich des Messsystems und der statistischen Auswertung sollen die aktuell ermittelten Werte für die Gruppe-1-Tiere mit denen von GIKINS et al. verglichen werden (Gikins 2008). In dieser Studie wurde der Parameter PCT nicht untersucht.

Tabelle 5.7: Vergleich der aktuellen Werte (2,5% und 97,5% Referenzlimit) mit denen von GIKINS et al. (Range, n = zwischen 163 und 181 je nach Parameter), Tierart Ratte, Stamm Wistar, Gruppe 1, männliche Tiere, n = 72

Parameter	Einheit	95%-Referenzintervall	
		Eigene Studie	Range Gikins et al.
WBC	$10^9/l$	3,58 – 9,45	1,96 – 8,25
RBC-I	$10^{12}/l$	8,10 – 9,59	7,27 – 9,65
HGB	mmol/l	8,99 – 10,30	8,50 – 10,92 *
HCT	l/l	0,41 – 0,48	0,40 – 0,53 *
MCV	fl	46,22 – 54,95	48,9 – 57,9
MCH	fmol	0,86 – 1,17	1,06 – 1,27 *
MCHC	mmol/l	20,95 – 22,33	20,42 – 23,27 *
PLT-I	$10^9/l$	600 – 942	638 – 1177
MPV	fl	6,90 – 8,02	6,2 – 9,4
NEUT#	$10^9/l$	0,44 – 1,58	0,22 – 1,57
LYMPH#	$10^9/l$	2,72 – 7,65	1,41 – 7,11
MONO#	$10^9/l$	0,07 – 0,54	0,03 – 0,18
EO#	$10^9/l$	0,02 – 0,19	0,01 – 0,16
BASO#	$10^9/l$	0,00 – 0,01	0,0 – 0,05
NEUT%	%	8,88 – 23,07	6,2 – 26,7
LYMPH%	%	68,24 – 86,08	66,6 – 90,3
MONO%	%	1,92 – 8,42	0,8 – 3,8
EO%	%	0,57 – 2,87	0,2 – 3,5
BASO%	%	0,00 – 0,20	0,0 – 0,8
RET#	$10^9/l$	184,0 – 461,4	152,3 – 381,5
RET%	%	2,25 – 5,27	1,7 – 4,9

* umgerechnet in internationale Einheiten zur besseren Vergleichbarkeit (originale Werte: HGB: 13,7-17,6 g/dL; HTC: 39,6-52,5%; MCH: 17,1-20,4 pg; MCHC: 32,9-37,9 g/dL)

Die meisten Parameter der verglichenen Studien sind ähnlich. Die Werte für MCV und MCH der eigenen Tiere sind etwas niedriger, diese für die Monozyten und Retikulozyten fallen etwas höher aus. Da sich die zitierte Studie mit Tieren derselben Herkunft befasst, sind die Übereinstimmungen nicht überraschend. Die Tiere befinden sich zwar an verschiedenen Standorten, mit diversen Unterschieden bezüglich der Umgebungsbedingungen, unterscheiden sich aber kaum in der Hämatologie. Diese Feststellung stützt die These, dass die im vorherigen Kapitel beschriebenen Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen genetischen Ursprungs sein könnten.

Tabelle 5.8: Vergleich der aktuellen Werte (2,5% und 97,5% Referenzlimit) mit denen von GIKINS et al. (Range, n = zwischen 156 und 176 je nach Parameter), Tierart Ratte, Stamm Wistar, Gruppe 1, weibliche Tiere, n = 73

Parameter	Einheit	95%-Referenzintervall Eigene Studie	Range Gikins et al.
WBC	$10^9/l$	2,13 – 6,99	1,13 – 7,49
RBC-I	$10^{12}/l$	7,61 – 9,05	7,07 – 9,03
HGB	mmol/l	8,34 – 10,14	8,50 – 10,43 *
HCT	l/l	0,37 – 0,47	0,38 – 0,50 *
MCV	fl	47,91 – 56,87	49,9 – 58,3
MCH	fmol	1,04 – 1,21	1,10 – 1,30 *
MCHC	mmol/l	20,82 – 22,18	20,60 – 23,52 *
PLT-I	$10^9/l$	604 – 892	680 – 1200
MPV	fl	6,97 – 8,16	6,2 – 9,8
NEUT#	$10^9/l$	0,22 – 1,19	0,15 – 1,50
LYMPH#	$10^9/l$	1,69 – 5,67	0,82 – 5,66
MONO#	$10^9/l$	0,06 – 0,40	0,02 – 0,16
EO#	$10^9/l$	0,02 – 0,17	0,01 – 0,15
BASO#	$10^9/l$	0,00 – 0,01	0,0 – 0,03
NEUT%	%	7,15 – 24,21	7,1 – 33,2
LYMPH%	%	68,35 – 87,95	62,2 – 90,0
MONO%	%	1,38 – 7,05	0,8 – 3,9
EO%	%	0,39 – 2,78	0,5 – 4,5
BASO%	%	0,00 – 0,32	0,0 – 0,8
RET#	$10^9/l$	203,45 – 426,77	129,8 – 383,7
RET%	%	2,66 – 5,23	1,7 – 4,7

* umgerechnet in internationale Einheiten zur besseren Vergleichbarkeit (originale Werte: HGB: 13,7-16,8 g/dL; HCT: 37,9-49,9%; MCH: 17,8-20,9 pg; MCHC: 33,2-37,9 g/dL)

Auch bei den weiblichen Tieren stimmen die meisten Parameter gut überein. Bei MCH und den Thrombozyten fallen leicht niedrigere Werte bei den eigenen Tieren auf. Das obere Referenzintervall der Thrombozyten ist deutlich niedriger als der Range bei GIKINS et al. Bei dem Parameter MCV sind die Werte deutlich niedriger als die der Tiere der Vergleichsstudie. Bezüglich der Monozyten und Retikulozyten zeigen die eigenen weiblichen und männlichen Tiere höhere Werte.

Zur Berechnung der 2,5%- und 97,5%-Perzentile sollten mindestens vierzig, besser mehr als 120 Referenzindividuen herangezogen werden (Solberg 1983; Horowitz, Altaie et al. 2008; Geffré, Friedrichs et al. 2009; Friedrichs, Barnhart et al. 2011).

Eine Ermittlung anhand einer geringeren Menge von Werten kann zu Abweichungen der erhobenen Werte vom wahren Referenzintervall der Population führen.

Hier wurden 72 männliche und 73 weibliche Tiere verwendet. Diese Zahl liegt also über der geforderten Mindestanzahl an Referenzindividuen, aber noch unter dem Optimum.

Der XT-2000iV misst die Erythrozyten und Thrombozyten mittels der Impedanzmethode und im optischen Kanal. Die Referenzintervalle der Impedanzmessung für die Erythrozyten liegen etwas über denen der optischen Messung. Für die Thrombozyten jedoch werden höhere Werte mit der optischen Messung erzielt.

5.4 Referenzintervalle für die Tierart Hund

Bezüglich hämatologischer Referenzintervalle für die Rasse Beagle (< 1 Jahr) liegt eine Veröffentlichung aus dem Jahre 1986 von WOLFORD et al. vor (Wolford, Schroer et al. 1986). Angegeben werden hier, neben arithmetischem Mittelwert und Standardabweichung, auch das 10%- und 90%-Perzentil; also werden hier 80% der Population in die Untersuchung einbezogen. Die Technik entspricht dem damaligen Stand der Wissenschaft. Die Parameter WBC, RBC, HCT, platelets, HGB, MCV und MCH wurden automatisch am Coulter S-Plus gemessen, die Retikulozyten und das Differentialblutbild wurden manuell ermittelt. Es ist nicht beschrieben, wie viele Zellen hier zur Auswertung herangezogen wurden. Jedoch ist die

manuelle Auszählung bezüglich der Präzision der automatischen Messung im Allgemeinen unterlegen (Tvedten and Lilliehook 2011). Bei automatischen Systemen werden natürlich wesentlich mehr Zellen erfasst.

Außerdem muss auch hier beachtet werden, dass ältere Referenzintervalle nicht generell auf aktuell ermittelte Werte übertragen werden können (Friedrichs, Barnhart et al. 2011). So ändern sich zum einen die technischen Möglichkeiten der Messung, zum anderen ist eine Veränderung von hämatologischen Parametern auch durch genetische Variationen, Änderungen in der Haltung, Fütterung und Krankheitsvorsorge möglich (George, Snipes et al. 2010).

Neuere Publikationen bezüglich hämatologischer Werte sind meist in der Klinik angesiedelt und fassen zahlreiche Rassen, Altersgruppen und meist auch männliche und weibliche Tiere zusammen (Moritz, Fickenscher et al. 2004; Bourgès-Abella, Geffré et al. 2011). Alternativ befassen sie sich speziell mit einzelnen Hunderassen (Shiel, Brennan et al. 2007; Nielsen, Kjelgaard-Hansen et al. 2010).

So untersuchten MORITZ et al. das Blut 46 klinisch gesunder Hunde verschiedener Rassen im Alter von 0,5 bis 11 Jahren am ADVIA® 120. BOURGÈS-ABELLA et al. untersuchten 132 reinrassige Hunde verschiedenen Alters am XT-2000iV (Bourgès-Abella, Geffré et al. 2011). Eine Trennung nach Geschlecht wird bei beiden nicht vorgenommen.

Der Vergleich der aktuell erhobenen Daten für die Beagle ergibt jedoch einen signifikanten Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren für einige Parameter (PLT, PCT, LYMPH#, EO#, LYMPH%, EO%). Weiterhin ist es in präklinischen Sicherheitsstudien im Allgemeinen üblich, männliche und weibliche Tiere getrennt zu beurteilen. Daher ist auch eine getrennte Untersuchung der Geschlechter zur Erstellung von Referenzintervallen für diesen Bereich sinnvoll.

Trotz der Unterschiede bezüglich der Population, Messtechnik und statistischer Auswertung sollen hier die Werte der eigenen Untersuchung mit denen von WOLFORD et al., MORITZ et al. und BOURGÈS-ABELLA et al. verglichen werden (Wolford, Schroer et al. 1986; Moritz, Fickenscher et al. 2004; Bourgès-Abella, Geffré et al. 2011).

Tabelle 5.9: Vergleich der aktuellen Werte (2,5% und 97,5% Referenzlimit) mit denen von WOLFORD et al. (10% und 90% Perzentil), Tierart Hund

Parameter	Einheit	95% RI ♂ Hunde (n = 77), eigene Studie #	95% RI ♀ Hunde (n = 77), eigene Studie #	80% RI ♂ Hunde (n = 288), Wolford et al. +	80% RI ♀ Hunde (n = 235), Wolford et al. +
WBC	10 ⁹ /l	6,21 – 15,54	6,76 – 15,01	7,6 – 13,9	7,2 – 12,9
RBC	10 ¹² /l	5,89 – 8,67	6,01 – 8,49	5,97 – 7,29	6,44 – 7,63
HGB	mmol/l	8,31 – 12,09	8,68 – 12,00	8,63 – 10,49*	8,94 – 10,86*
HCT	l/l	0,41 – 0,60	0,40 – 0,54	0,39 – 0,49*	0,42 – 0,50*
MCV	fl	61,09 – 71,0	59,28 – 74,08	63,6 – 68,8	63,7 – 67,2
MCH	fmol	1,31 – 1,50	1,30 – 1,50	1,37 – 1,51*	1,35 – 1,46*
PLT	10 ⁹ /l	170 – 395	186 – 392	220 – 416	231 – 403
NEUT%	%	41,12 – 75,68	47,96 – 71,90	47 – 66	42 – 68
LYMPH%	%	15,10 – 39,42	18,12 – 40,98	22 – 39	21 – 42
MONO%	%	3,15 – 13,21	2,87 – 12,20	3 – 9	3 – 9
EO%	%	1,30 – 15,03	1,12 – 9,43	2 – 9	1 – 13
BASO%	%	0,10 – 1,01	0,10 – 1,61	0 – 1	0 – 1
RET%	%	0,37 – 1,95	0,40 – 1,96	0 – 1,2	0,2 – 1,4

* umgerechnet in internationale Einheiten zur besseren Vergleichbarkeit (originale Werte:

♂: HGB: 13,9-16,9 g/dL; HCT: 39,1-48,5%; MCH: 22,1-24,3 pg; ♀: HGB: 14,4-17,5 g/dL; HCT: 42,3-50,3%; MCH: 21,8-23,5 pg)

Messung am Sysmex XT-2000iV, RBC und PLT aus Impedanzmessung

+ RBC, WBC, PLT, HCT, HGB, MCV, MCH gemessen am Coulter S-Plus, Retikulozyten und Differentialblutbild manuell ausgezählt

WOLFORD et al. gibt nicht für alle hier untersuchten Parameter Werte an. Für die berechneten Parameter findet die ältere Studie häufig niedrigere obere Referenzlimits. Anzumerken ist allerdings, dass hier nur 80%, anstatt 95% der Referenzpopulation Beachtung finden. Für die Thrombozyten fallen die älteren Werte etwas höher aus (Wolford, Schroer et al. 1986).

Tabelle 5.10: Vergleich der aktuellen Werte mit denen von MORITZ et al. und BOURGÈS-ABELLA et al., 2,5% und 97,5% Perzentil, Tierart Hund

Parameter	Einheit	95% RI ♂ Hunde (n = 77) eigene Studie #	95% RI ♀ Hunde (n = 77) eigene Studie #	95% RI ♂ + ♀ Hunde (n = 46) Moritz et al. ‡	95% RI ♂ + ♀ Hunde (n = 132) Bourgès-Abella et al. ∞
WBC	10 ⁹ /l	6,21 – 15,54	6,76 – 15,01	5,84-20,26	5,6 – 20,4
RBC	10 ¹² /l	RBC-I: 5,89 – 8,67	RBC-I: 6,01 – 8,49	5,68 – 9,08	RBC-I: 5,2 – 7,9
RBC-O	10 ¹² /l	5,40 – 8,17	5,72 – 7,89	-	5,1 – 7,6
HGB	mmol/l	8,31 – 12,09	8,68 – 12,00	8,55 – 12,65*	7,70 – 11,92*
HCT	l/l	0,41 – 0,60	0,40 – 0,54	0,42 – 0,62	0,35 – 0,52
MCV	fl	61,09 – 71,0	59,28 – 74,08	62,7 – 74,56	60 – 71
MCH	fmol	1,31 – 1,50	1,30 – 1,50	1,27 – 1,54*	1,36 – 1,63*
MCHC	mmol/l	20,25 – 22,16	20,21 – 22,19	19,62 – 21,32*	21,35 – 23,64*
PLT-I	10 ⁹ /l	PLT-I: 170 – 395	PLT-I: 186 – 392	173,05 – 486,50	PLT-I: 64 – 613
PLT-O	10 ⁹ /l	163 – 366	174 – 373	-	108 – 562
MPV	fl	8,67 – 12,32	8,50 - 12,04	8,56 – 14,41	9,05 – 12,68
PCT	l/l	0,0018 – 0,0041	0,0021 – 0,0041	-	0,0014 – 0,0061
NEUT#	10 ⁹ /l	3,15 – 10,90	3,59 – 10,04	4,27 – 9,06	2,9 – 13,6
LYMPH#	10 ⁹ /l	1,51 – 3,83	1,75 – 4,22	2,04 – 4,66	1,1 – 5,3
MONO#	10 ⁹ /l	0,27 – 1,48	0,26 – 1,36	0,24 – 2,04	0,4 – 1,6
EO#	10 ⁹ /l	0,12 – 1,52	0,10 – 1,07	0,10 – 1,20	0,1 – 3,1
BASO#	10 ⁹ µl	0,01 – 0,09	0,01 – 0,13	0,01 – 0,08	-
NEUT%	%	41,12 – 75,68	47,96 – 71,90	46,25 – 73,63	-

Fortsetzung der Tabelle 5.10 auf Seite 118

Fortsetzung der Tabelle 5.10 von Seite 117: Vergleich der aktuellen Werte mit denen von MORITZ et al. und BOURGÈS-ABELLA et al., 2,5% und 97,5% Perzentil, Tierart Hund

LYMPH%	%	15,10 – 39,42	18,12 – 40,98	18,97 – 41,28	-
MONO%	%	3,15 – 13,21	2,87 – 12,20	3,12 – 6,94	-
EO%	%	1,30 – 15,03	1,12 – 9,43	1,23 – 9,33	-
BASO%	%	0,10 – 1,01	0,10 – 1,61	0,19 – 0,70	-
RET#	10 ⁹ /l	23,57 – 157,78	27,78 – 144,87	10,92 – 110,96	19,4 – 150,1
RET%	%	0,37 – 1,95	0,40 – 1,96	0,14 – 1,48	0,3 – 2,37

* umgerechnet in internationale Einheiten zur besseren Vergleichbarkeit (originale Werte: MORITZ: HGB: 13,77-20,38 g/dL; MCH: 20,46-24,81 pg; MCHC: 31,61-34,35 g/dL; Bourgès-Abella: HGB: 124-192 g/L; MCH: 21,9-26,3 pg; MCHC: 344-381 g/L)

Messung am Sysmex XT-2000iV

‡ Messung am ADVIA® 120

∞ Messung am Sysmex XT-2000iV

Die Werte der Eosinophilen und Monozyten in Prozent und die Absolutwerte für die Retikulozyten fallen für die eigenen Tiere etwas höher aus als bei MORITZ et al. Jene Studie beschreibt für die Tiere aus der Klinik ein höheres oberes Referenzlimit für die Gesamtleukozytenzahl, für die Thrombozyten und das MPV (Moritz, Fickenscher et al. 2004). Die Studie aus dem Jahre 2011 beschreibt ein höheres oberes Referenzlimit für WBC, für Eosinophile und für die Thrombozyten. Die Werte für RBC und HCT liegen unter denen der eigenen Studie (Bourgès-Abella, Geffré et al. 2011). Für den RBC werden sowohl in der eigenen Studie als auch in der von BOURGÈS-ABELLA in der Impedanzmessung des XT-2000iV etwas höhere Werte für gemessen als im optischen Messkanal. Für die Thrombozyten werden in der eigenen Studie etwas niedrigere Werte im optischen Kanal gefunden, die Vergleichsstudie beschreibt dahingegen einen engeren Messbereich (Bourgès-Abella, Geffré et al. 2011).

Die hier gemessenen Werte der Labor-Hunde sind zum Teil durchaus vergleichbar mit denen, der Tiere aus dem klinischen Bereich. Aufgrund der deutlich unterschiedlichen Lebens- und Umweltbedingungen wären größere Differenzen durchaus zu erwarten gewesen.

Parallel zur Ratte werden auch beim Hund unterschiedliche Referenzintervalle für die Erythrozyten und Thrombozyten in der optischen Messung und der Impedanzmessung gefunden. Auch hier wird der RBC in der Impedanzmessung höher gemessen, die Thrombozyten jedoch im optischen Kanal.

In der vorliegenden Studie wird der Oberflächenmarker CD4 kombiniert mit CD3 angewandt, um die Prozentzahl der T-Helferzellen zu ermitteln. Das diesbezügliche 95%-Referenzintervall beträgt 34,65-54,29% für weibliche Tiere und 30,36-55,13% für männliche. Außerdem wird ein Referenzintervall für einfach CD5-positive Zellen errechnet, das 43,37-64,86%, respektive 40,91-65,54% beträgt.

CD8 wird mit CD5 kombiniert, mit dem Ziel, zytotoxische T-Zellen zu vereinzeln. Das Referenzintervall hierfür beträgt 11,43-29,27% (weiblich), bzw. 12,47-27,31% (männlich). Wie in folgender Abbildung 5.4 zu erkennen ist, lässt sich bei den untersuchten Proben die Population der CD5-CD8-positiven Zellen nochmals unterteilen. Im rechten Bild zeigen die blau dargestellten zytotoxischen T-Zellen deutlich zwei Unterpopulationen, eine stärker fluoreszierend als die andere.

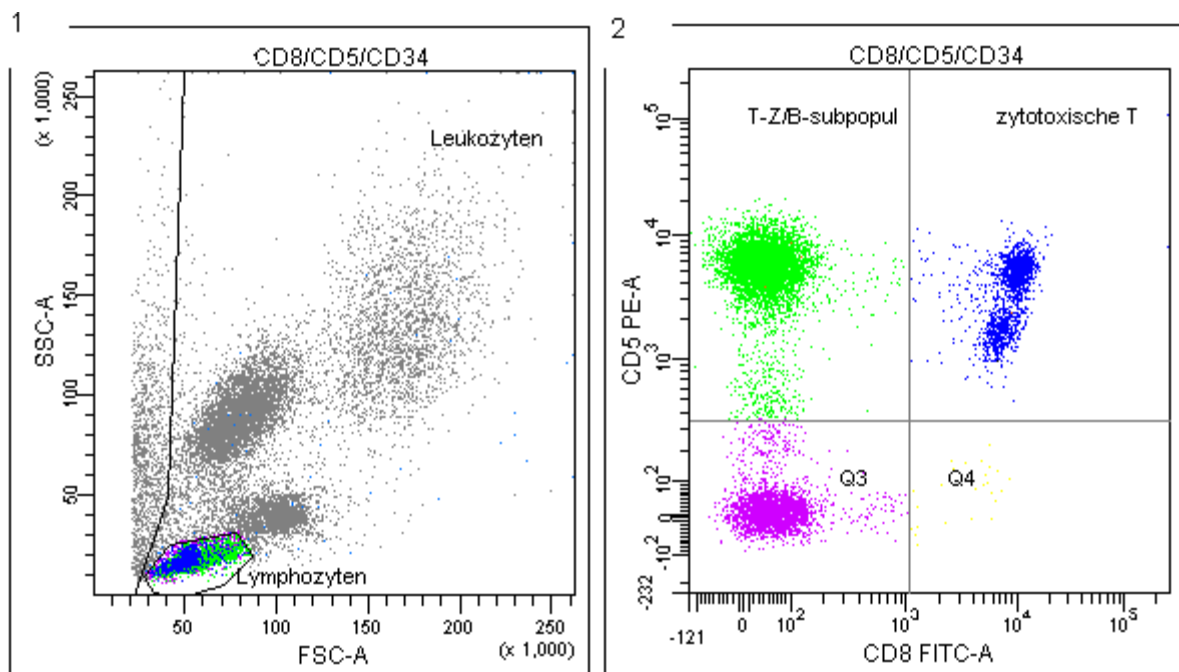


Abbildung 5.4: Durchflusszytometrische Messung, Antikörper gegen CD5- und CD8-Oberflächenmoleküle; Tierart Hund, Marshall Beagle

x-Achse: Vorwärtsstreulicht (FSC, Größe der Zelle)

y-Achse: Seitwärtsstreulicht (SSC, Granularität der Zelle)

Mit Ausnahme der Proben von zwei Hunden ist es möglich die beiden Unterpopulationen zu trennen und das Verhältnis von hoch zu niedrig fluoreszierenden Zellen zu berechnen. Dieses

ergibt ein 95% Referenzintervall von 0,8 bis 5,11 (Range: 0,65 – 10,1) für männliche Tiere und von 0,65 bis 4,64 (Range: 0,61 – 7,7) für weibliche Tiere. Bei der Betrachtung der Einzelwerte fällt auf, dass nur wenige Hunde mehr CD5- und CD8-positive Zellen aufweisen, die schwach Antigen exprimieren. Für die meisten Tiere ist ein zum Teil wesentlich höherer Anteil der stark fluoreszierenden Population zu erkennen.

Für das Verhältnis der T-Helfer-Zellen zu den zytotoxischen T-Zellen (CD4/CD8-Quotient) wird für die aktuelle Gruppe männlicher Beagle ein Referenzintervall von 1,27 bis 3,58 berechnet. Für die weiblichen Tiere liegt es mit 1,15 bis 3,43 in einem ähnlichen Bereich. Für die weiblichen Tiere kann, da der Datensatz normal verteilt ist, ein arithmetischer Mittelwert von 2,29 errechnet werden.

Weiterhin wurden CD21-positive Zellen untersucht, für die ein Referenzintervall von 9,7-31,45% für weibliche Tiere und eines von 8,03-32,61% für männliche Tiere errechnet wird.

Der in der aktuellen Studie eingesetzte Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD9, ist von humaner Spezifität. Da jedoch eine Kreuzreaktivität zu caninen Zellen festgestellt werden konnte, eignet er sich auch zur Anwendung bei dieser Tierart (Brodersen, Bijlsma et al. 1998; Schubert, Kucinskiene et al. 2007). Beim Menschen bindet dieser Antikörper, außer auf frühen B-Zellen, auch auf Thrombozyten, Endothelzellen und Monozyten (Boucheix, Benoit et al. 1991).

Abbildung 5.5 zeigt eine durchflusszytometrische Messung des Hundeserums, markiert mit den Antikörpern gegen CD21 und CD9. Die im rechten Bild dargestellten Events ergeben sich aus dem Lymphozyten-Gate im linken FSC-SSC-Scattergramm. Lila stellen sich auf der y-Achse die B-Zellen dar. Auf der x-Achse (braun) sind einfach CD9-positiv markierte Zellen zu sehen. Thrombozyten, die von diesem Antikörper beim Menschen erfasst werden, haben andere FSC-SSC-Eigenschaften als Lymphozyten. Sie liegen am linken Rand des großen Leukozyten-Gates und ziehen nach oben in die Neutrophilen-Population. Somit sind keine Thrombozyten im Lymphozyten-Gate eingeschlossen und werden daher in der rechten Graphik nicht dargestellt. Monozyten liegen, da sie größer und von höherer Granularität als Lymphozyten sind, etwas rechts oberhalb des Lymphozyten-Gates. Und auch Endothelzellen sind im betreffenden Bereich nicht von Bedeutung. Die CD9-positiven Zellen liegen innerhalb

des Lymphozyten-Gates, müssen also entsprechende Eigenschaften bezüglich der Größe und der Granularität haben. Sollte es sich - analog zum Menschen - um B-Zell-Vorläufer handeln, sind diese hier CD21-negativ. Eine Verifikation dieser Zellpopulation sollte durch weitere Untersuchungen erfolgen.

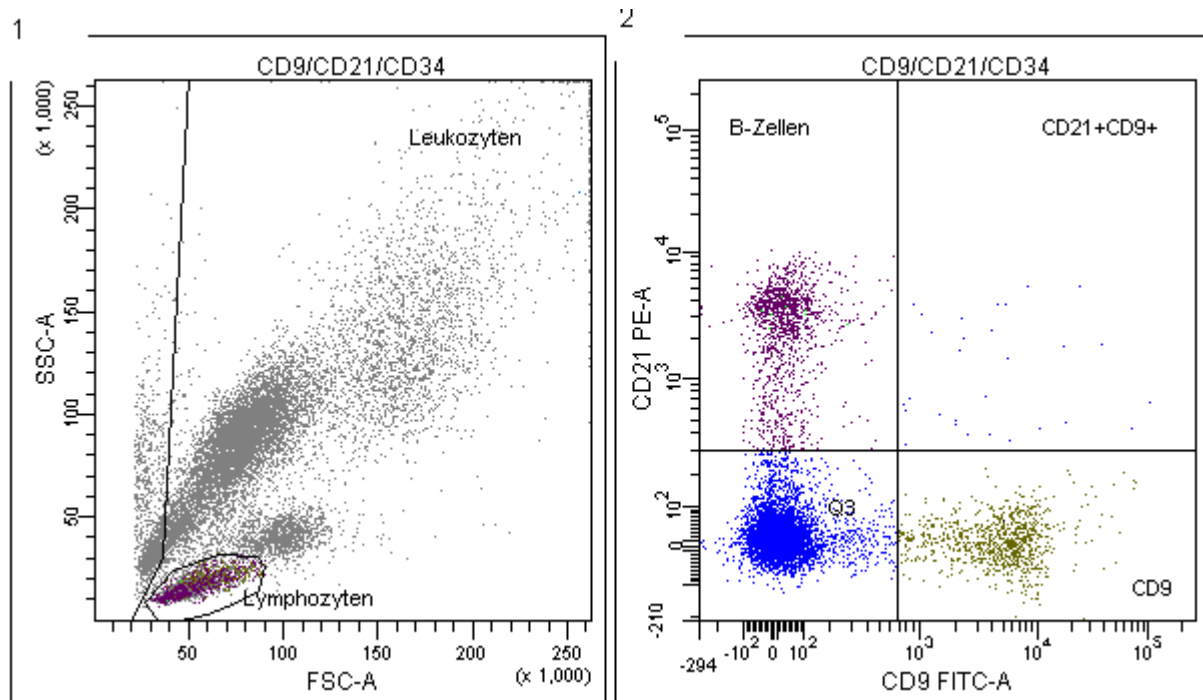


Abbildung 5.5: Durchflusszytometrische Messung, Antikörper gegen CD9 und CD21 - Oberflächenmoleküle; Tierart Hund, Marshall Beagle

x-Achse: Vorwärtsstreulicht (FSC, Größe der Zelle)

y-Achse: Seitwärtsstreulicht (SSC, Granularität der Zelle)

BOKEMEYER ermittelte Mittelwerte für verschiedene CD-Marker im Blut von gesunden erwachsenen Hunden (Bokemeyer 2003). Hier wurden Unterschiede, sowohl für verschiedene Altersstufen, als auch im Vergleich zwischen Beaglen und einer gemischtrassigen Gruppe erkannt. Für die Beagle-Population findet BOKEMEYER im Mittel 38,20% CD4-positive Lymphozyten, 37,16% CD8-positive Zellen und 7,93% CD21-positive.

Somit liegen die Werte für CD4 und CD21 aus der früheren Studie eher am unteren Referenzlimit der eigenen Untersuchung; der für CD8 ist hingegen höher.

Für CD5 gibt BOKEMEYER einen Wert von 82,76% für die dort untersuchte Beagle-Population an. Allerdings wird in dieser Studie CD5 alleine verwendet, nicht in Kombination mit einem

weiteren Marker (vergleiche CD8 in der aktuellen Studie). In der eigenen Studie besteht eine weitere, CD5- und CD8- doppelt positive, Zellpopulation. Diese CD5/CD8-markierten Zellen müssten für einen direkten Vergleich zu den einfach positiven addiert werden.

Auch in weiteren früheren Studien werden Werte für die beschriebenen Zellpopulationen angegeben. BYRNE et al. geben folgende Normalwerte (Range) für die CD-Marker an (Byrne, Kim et al. 2000): CD5: 77,9-92,4%; CD4: 31,5-66,0%, CD8: 20,5-43,6%, B-Zellen: 5,6-21,3%. Auch hier fallen höhere Werte für CD21-positive Zellen und niedrigere für CD4, CD5 und CD8 in der eigenen Studie auf.

Alle diese Parameter wurden auch von CHABANNE et al. untersucht, die einen Mittelwert von $19,3\% \pm 4$ für die CD8-positiven Zellen finden und somit in einem ähnlichen Bereich liegen, wie die hier untersuchte, entsprechende Zellpopulation. Alle weiteren Werte sind ähnlich denen von BYRNE et al. (Chabanne, Marchal et al. 1995; Byrne, Kim et al. 2000).

Schließlich geben FALDYNA et al. Werte für eine Gruppe Beagle an. Es werden zehn Tiere im Alter von 1-2 Jahren untersucht. Mit $81,7 \pm 5,8\%$ CD-3 positiven Zellen finden sie sehr hohe Werte für T-Zellen an. CD4 liegt mit $45,9 \pm 7,4\%$ schon eher im Bereich der eigenen Berechnung. Für CD8 geben FALDYNA et al. Werte von $18,9 \pm 3,3\%$ und für CD21 von $14,8 \pm 4,0\%$ an. In dieser Studie werden weiterhin Alterseinflüsse auf die Lymphozytenpopulationen beschrieben (Faldyna, Levá et al. 2001).

BOKEMEYER findet bei unterschiedlichen Hunden, auch bei einem Kontrolltier, keine CD5-positiven Zellen im Blut. Diese Beobachtung konnte in der aktuellen Beagle-Population nicht gemacht werden. Alle Hunde weisen CD5-positve Zellen auf.

BOKEMEYER kann eine Trennung von CD5-positiven Zellen in zwei unterschiedlich stark fluoreszierende Unterpopulationen beobachten. Allerdings ist es nicht möglich, diese Zellpopulation deutlich zu trennen. Daher wird in der vorangegangenen Studie auf eine quantitative Auswertung verzichtet (Bokemeyer 2003). Auch COBBOLD und METCALF vermuten zwei Subpopulationen, eine größere, die stärker Antigene exprimiert, und eine kleine, weniger intensive (Cobbold and Metcalfe 1994). HUANG et al. gelingt es, diese beiden Subpopulationen zu quantifizieren. Sie finden eine deutlich größere Population von CD5-positiven Zellen, die stark fluoreszieren (Huang, Hung et al. 2008). Dieses Ergebnis kann in der eigenen Studie bestätigt werden.

BOKEMEYER gibt den geometrischen Mittelwert für das Verhältnis von T-Helfer-Zellen zu zytotoxischen Zellen für verschiedene Tiergruppen an. Für die Gruppe der Beagle betragen die Werte 1,03, für eine Gruppe adulter Hunde gemischter Rassen 1,95 und für Welpen 1,51 (Bokemeyer 2003). Eine ältere Studie beschreibt das Verhältnis von CD4 zu CD8 mit ca. 2 zu 1 (Gebhard and Carter 1992). BYRNE et al. geben es mit 0,98 bis 2,83 an und FALDYNA et al. mit $2,5 \pm 0,6$ (Byrne, Kim et al. 2000; Faldyna, Levá et al. 2001).

Die eigenen Werte liegen also tendenziell höher als die der Vergleichsstudien.

Bei den meisten der erwähnten Studien muss bedacht werden, dass andere Hunde als Beagle Gegenstand der Untersuchungen waren. Auch werden z.T. wenige gesunde Referenztiere verwendet (beispielsweise 12 bei CHABANNE et al.) (Chabanne, Marchal et al. 1995). Die Studie von BOKEMEYER aus dem Jahre 2003 ist die aktuellste der Veröffentlichungen, die mit einer ähnlichen Antikörperauswahl für die Tierart Hund arbeiten (Bokemeyer 2003). Aktuellere Veröffentlichungen beschäftigen sich mit der Kreuzreaktivität von humanen monoklonalen Antikörpern für verschiedene Tierarten oder mit einzelnen Lymphozyten-Subpopulationen (Faldyna, Samankova et al. 2007; Saalmüller and Aasted 2007; Huang, Hung et al. 2008). Weitere Studien sind in der Klinik angesiedelt und haben ihren Fokus vor allem in der Beurteilung neoplastischer Erkrankungen (Comazzi, Gelain et al. 2006; Comazzi, Gelain et al. 2006; Allison, Brunker et al. 2008; Comazzi and Gelain 2011).

Die Identifizierung und quantitative Bestimmung von Leukozytenpopulationen mittels Antikörper-Markierung (Immunophänotypisierung) wird in der präklinischen Forschung regelmäßig angewandt. Bei der Nutzen-Risiko-Analyse eines Arzneimittelkandidaten muss abgeschätzt werden, ob dieser die Funktion des Immunsystems beeinflusst. Besteht der Verdacht, dass die Immunantwort unterdrückt oder gesteigert wird, sind zusätzliche Studien zur Bestimmung der Immunotoxizität notwendig (ICH 2005). Die Immunophänotypisierung ist ein nicht-funktioneller Test und dient vor allem zur quantitativen Bestimmung einzelner Zellpopulationen (ICH 2005). Somit kann beispielsweise die verminderte Bildung von Lymphozytenpopulationen sichtbar gemacht werden. Auch Verschiebungen im Verhältnis von T-Helfer-Zellen und zytotoxischen T-Zellen werden deutlich.

5.5 *Retikulierte Thrombozyten beim Hund*

Die Tatsache, dass ein Teil der Thrombozyten geringe Mengen RNA enthalten, wurde 1969 von INGRAM et al. beschrieben, die diese Reste im Mikroskop sichtbar machen konnten (Ingram and Coopersmith 1969). In Anlehnung an die Retikulozyten wurden diese Zellen retikulierte Thrombozyten (Synonym: RNS reiche Thrombozyten) genannt. In der Folgezeit wurde entdeckt, dass diese RNA-Reste durch bestimmte Farbstoffe anfärben sind, welche die Zellmembran perforieren (Kienast and Schmitz 1990). Daraufhin wurden retikulierte Thrombozyten standardmäßig per Durchflusszytometrie gemessen. Auch in der Veterinärmedizin hielt diese Methode in zahlreichen Studien Einzug (Russell, Perkins et al. 1997; Weiss 1998; Hanahachi, Moritomo et al. 2001; Wilkerson, Shuman et al. 2001; Smith and Thomas 2002; Weiss 2004). Nachteilig an dieser Messmethode sind der große Zeitaufwand und die nicht unerheblichen Kosten für Antikörper und sonstige Verbrauchsmaterialien. Außerdem unterliegt die durchflusszytometrische Darstellung einer weiten Variation innerhalb des Labors, aber vor allem auch zwischen verschiedenen Laboratorien (Harrison 1997).

Durch den optischen Messkanal ist der XT-2000iV in der Lage, die in den Thrombozyten enthaltenen RNA-Reste, nach Anfärben darzustellen. PANKRATZ et al. nutzten diese Methode für einen Vergleich des Gerätes mit der durchflusszytometrischen Messung der retikulierten Thrombozyten des Hundes, wobei zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden konnten (Pankraz, Bauer et al. 2009). Der in dieser Studie berechnete Spearman's rank Korrelationskoeffizient beträgt 0,71, wobei ein negativer bias von - 6,26 gefunden wurde.

Die Auswertung der eigenen Studie zeigt bezüglich der Korrelation mit einem Wert von 0,42 ein schlechteres Ergebnis. Jedoch ist anzumerken, dass hier ausschließlich Proben gesunder Tiere zum Einsatz kommen. Das kann diesen schlechten Wert mit bedingen, soll zur Korrelationsberechnung doch ein möglichst breiter Messbereich abgedeckt werden (Jensen and Kjelgaard-Hansen 2006). Der Bias liegt mit 0,82 wesentlich näher am Wert „Null“ als von PANKRAZ et al. beschrieben (Pankraz, Bauer et al. 2009).

In der früheren Studie werden für die untersuchten Proben von gesunden Tieren ein Intra-assay CV von 25,82% für die Messung am Durchflusszytometer angegeben und für die am XT-2000iV Werte von 26,55% bis 66,85%.

Die eigene Untersuchung zeigt im Vergleich einen CV von 7,48% für den FACSCanto™.

Für den XT-2000iV wurde eine 20-fache Messung, sowohl im Modus „Manual“ (M) als auch im Modus „Capillary“ (C), durchgeführt. Für den Prozentsatz der retikulierten Thrombozyten finden sich CV-Werte von 16,08% (M) und 15,32% (C), für die Absolutwerte 15,09% (M) und 17,09% (C).

Am XT-2000iV wurden die gemessenen Zellen nach ihrer Fluoreszenzintensität in einzelne Reifungsstufen unterteilt. Da nur Proben von unauffälligen Tieren zum Einsatz kommen, nimmt die Größe der Populationen hin zu den RNA-reicheren Thrombozyten immer weiter ab, während die Höhe des Variationskoeffizienten kontinuierlich steigt. Es ist allerdings bekannt, dass Zellpopulationen, die geringere Konzentrationen im Blut aufweisen, höhere intra-assay CVs bedingen (Reed, Lynn et al. 2002).

Der XT-2000iV zeigt Vorteile gegenüber der durchflusszytometrischen Messung in Hinblick auf den Arbeits- und Kostenaufwand und die Standardisierung. Jedoch sollte in weiteren Studien ein breiterer Messbereich abgedeckt werden, um eine abschließende Beurteilung der Anwendbarkeit für Hunde in der pharmazeutischen Industrie vornehmen zu können.

Für die Messung am Durchflusszytometer wird für die 154 Beagle männlichen und weiblichen Geschlechts ein 95%-Referenzintervall von 2,86 bis 8,22% errechnet. Für den XT-2000iV findet sich ein 95%-Referenzintervall von 1,78% bis 8,51% für die Messung der relativen Werte. Auf eine Trennung nach Geschlechtern wird hier verzichtet. Für den FACSCanto™ besteht kein signifikanter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren, für den XT-2000iV ist dieser nur schwach signifikant.

PANKRATZ et al. untersuchten 40 gesunde Hunde verschiedener Rassen im Alter von einem bis vierzehn Jahren. Für diese Population konnte ein Range von 0,78% bis 3,68% am Durchflusszytometer gemessen werden, am XT-2000iV von 0,11% bis 2,16%. Diese liegen also unter den eigenen gemessenen Werten.

Ältere Studien berechnen für retikulierte Thrombozyten Referenzintervalle von 0% bis 4,3% für Vollblut und $2,7\% \pm 2,0\%$ für thrombozytenreiches Plasma (Wilkerson, Shuman et al. 2001; Smith and Thomas 2002). WEISS et al. beschreiben einen Range von 3,9-15,1% ($9,3 \pm 2,7\%$) (Weiss 1998).

Für die höheren Fluoreszenzstufen liegen die hier ermittelten Werte nahe Null. Klinisch unauffällige Beagle zeigen also so gut wie keine retikulierten Thrombozyten mit höheren

Fluoreszenzstufen im peripheren Blut. Allerdings gibt es keine Tiere, die keine Thiazole orange-positiven Thrombozyten mit geringer Fluoreszenz aufweisen.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist es, verschiedene Untersuchungsmethoden für die Tierarten Ratte und Hund in der präklinischen Forschung zu etablieren. Im Mittelpunkt stehen Untersuchungen an den hämatologischen Analysesystem Systemex XT-2000iV und Siemens ADVIA® 120 für den speziellen Einsatz im GLP-kompatiblen Laborumfeld.

Ein weiterer Schwerpunkt liegt in der vergleichenden Untersuchung hämatologischer Parameter zwischen verschiedenen Tiergruppen und in der Erstellung von Referenzintervallen.

Die Untersuchungen erfolgen mit Blutproben von Wistar Ratten und Marshall Beagle aus präklinischen Sicherheitsstudien.

Die **Präzision** für den XT-2000iV (Messmodi „Manual“ und „Capillary“) und den ADVIA® 120 wird mit zwei gepoolten Blutproben der Ratte mit unterschiedlicher Zusammensetzung geprüft – eine hat höhere Werte für die Leukozytenpopulationen als die andere. Der XT-2000iV und der ADVIA® 120 weisen für die Blutzellzählung gute bis exzellente Variationskoeffizienten auf (CV zwischen 0,22% und 7,66%). Für die Blutzelldifferenzierung zeigt die Probe mit hohen Anteilen von Leukozytenpopulationen im Blut ebenfalls überwiegend gute Werte am ADVIA® 120 und im Modus „Manual“ des XT-2000iV (CV zwischen 0,72% und 11,54%). Für die Messung der Monozyten am ADVIA® 120 fällt das Ergebnis schlechter aus (CV = 26,65% und 28,00%). Sinkt die Konzentration von einzelnen Zellpopulationen im Blut, wird das Ergebnis der Präzision tendenziell schlechter. Im Verdünnungsmodus des XT-2000iV werden ebenfalls höhere Werte für den Variationskoeffizienten gefunden.

Der **Methodenvergleich** des XT-2000iV mit dem ADVIA® 120 für die Tierart Ratte ergibt für die Parameter WBC, RBC, MCH, MCV und PLT gute bis exzellente Korrelationen (Spearman's rank $r_s = 0,89$ bis $0,99$). Für HGB und HCT ist die Korrelation mäßig ($r_s = 0,77$ und $0,75$) und für MCHC ($r_s = 0,25$) schlecht. Für die Parameter Neutrophile (%), Lymphozyten (% , #) und

Eosinophile (#) ist die Übereinstimmung gut bis exzellent ($r_s = 0,84$ bis $0,99$). Mäßige Ergebnisse zeigen Neutrophile (#), Monozyten (#) und Eosinophile (%) ($r_s = 0,64$ bis $0,79$). Für Basophile (% , #) und Monozyten (%) ist die Korrelation schlecht ($r_s = 0,23$ bis $0,41$). Die gemessenen Monozytenwerte des XT-2000iV liegen über denen des ADVIA® 120. Für die Retikulozyten liegen die Korrelationskoeffizienten bei $r_s = 0,83$ (#) bzw. $r_s = 0,92$ (%). Im Vergleich zur Leukozytendifferenzierung am Mikroskop schneiden beide Geräte ähnlich ab. Für die neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten fällt das Ergebnis zufriedenstellend aus, während für die Monozyten und Eosinophilen schlechte Werte erzielt werden.

Wistar Ratten von zwei verschiedenen Züchtern zeigen im Vergleich signifikante Unterschiede in zahlreichen hämatologischen Parametern. Für sowohl männliche als auch weibliche Tiere unterscheiden sich die Parameter WBC, RBC, MCV, MCH, PLT, MPV, PCT, Lymphozyten, Monozyten, Eosinophile und Retikulozyten signifikant. Für die weiblichen Tiere unterscheiden sich zusätzlich die Parameter HGB und HCT.

Für die **Ratte** (Stamm Wistar, Züchter 1) werden geschlechtsspezifische 95%-**Referenzintervalle** für das hämatologische Analysegerät Sysmex XT-2000iV erstellt.

Auch für die Tierart **Hund** (Marshall Beagle, männlich und weiblich) werden 95%-**Referenzintervalle** errechnet für den XT-2000iV und für durchflusszytometrisch gemessene CD-Marker (CD3+CD4+ - T-Helferzellen; CD5+ - T-Zellen; CD5+CD8+ - zytotoxische T-Zellen; CD21+ - B-Zellen, CD9-positive Zellen und CD4/CD8-Verhältnis). Die Hunde zeigen eine Zweiteilung der CD5 und CD8 doppelt-positiven Zellpopulation, die quantitativ ausgewertet werden kann. Dies ergibt für die meisten Hunde einen höheren Anteil von Zellen, die stärker Antigen exprimieren.

Schließlich werden die **retikulierten Thrombozyten des Hundes** am Durchflusszytometer FACSCanto und am XT-2000iV gemessen. Für beide Messsysteme werden Referenzintervalle erstellt. Die Korrelation zwischen beiden Messmethoden fällt schlecht aus ($r = 0,42$), vermutlich aufgrund des eingeschränkten Messbereiches. Für die Präzision zeigt das

Durchflusszytometer bessere Werte als der XT-2000iV (XT: CV = 16,08% („Manual“), 15,32% („Capillary“); FACS: CV = 7,48%).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Sysmex XT-2000iV für den Einsatz im präklinischen Forschungslabor für die Tierart Ratte geeignet ist. Für eine abschließende Bewertung sollten in einer weiteren Studie die Linearität, der Carry-over und der Einfluss der Lagerungstemperatur und der Lagerungsdauer auf die Messung überprüft werden.

Die Untersuchung der beiden Rattengruppen zeigt deutliche herkunftsbedingte Unterschiede für hämatologische Parameter. Dies unterstützt die Notwendigkeit von Kontrollgruppen in Studien um eine Fehlinterpretation der erhobenen Daten zu vermeiden. Weiterhin ist die Auswahl der geeigneten Gruppe je nach Fragestellung der Studie anzuraten.

Die erstellten Referenzintervalle für Hunde und Ratten können eine Grundlage für die Beurteilung von Daten aus präklinischen Sicherheitsstudien bilden.

Die Verwendung des XT-2000iV zur Messung von retikulierten Thrombozyten des Hundes ist sinnvoll. Jedoch sollte mittels einer weiteren Studie, die Proben von thrombozytopenischen Tieren einschließt, eine abschließende Beurteilung vorgenommen werden.

7 Summary

The aim of this study is to establish several methods for analyzing blood of rats and dogs in preclinical research. The focus is on the hematology analyzer Sysmex XT-2000iV and ADVIA® 120 for use in GLP-compatible laboratories.

A second main topic is the comparative analysis of hematologic variables between different animal groups and the calculation of reference intervals.

Wistar rats and Marshall Beagle used in preclinical safety studies are included in the study.

Intra-assay precision is determined for the XT-2000iV (mode “manual” and “capillary”) and the ADVIA® 120 with two different pooled blood samples of rats – one of them with higher values for leucocyte subpopulations than the other. XT-2000iV and ADVIA® 120 reflect well to excellent coefficients of variation for variables of blood cell count (CV between 0.22% and 7.66%). Results for blood cell differentiation are good for the sample with high quantities of leucocytes measured with XT-mode “manual” and ADVIA® 120 (CV between 0.72% and 11.54%). Measurement of monocytes with the ADVIA® 120 indicates poorer results (CV = 26.65% and 28.00%). Decreasing leucocyte values in blood samples result in increasing coefficient of variations. Moreover, coefficients of variation are higher for the XT-mode “capillary” in comparison to “manual”.

Agreement between XT-2000iV and ADVIA® 120 are good to excellent for WBC, RBC, MCH, and platelets with Spearman rank correlation coefficients (r_s) ranging from 0.89 to 0.99. A fair correlation is evident for HGB and HCT ($r_s = 0.77$ and 0.75), whereas correlation for MCHC is poor ($r_s = 0.25$). A good to excellent correlation is recognized for neutrophils (%), lymphocytes (%), and eosinophils (#), r_s ranging from 0.84 to 0.99. Neutrophils (#), monocytes (#) and eosinophils (%) show fair results ($r_s = 0.64$ to 0.79). However, correlation between both analyzers is poor for basophils (%), and monocytes (%) ($r_s = 0.23$ and 0.41). Values for monocytes measured by the XT-2000iV are higher compared to them obtained by the ADVIA® 120. Correlation coefficient for reticulocytes are $r_s = 0.83$ (#) and $r_s = 0.92$ (%). Comparisons of manual leucocyte differentiation with both analyzers are similar. While the

results obtained for neutrophilic granulocytes and lymphocytes are adequate, they are poor for monocytes and eosinophils.

Wistar rats obtained from two different breeders show significant differences for many hematologic variables. WBC, RBC, MCV, MCH, platelets, MPV, PCT, lymphocytes, monocytes eosinophils and reticulocytes show differences for male and female animals. Additionally, HGB and HCT are different in females.

Reference intervals are calculated for male and female **rats** (strain Wistar, breeder 1) for the hematologic analyzer Sysmex XT-2000iV.

95%-**Reference intervals** are also calculated for **dogs** (Marshall Beagle, male and female) for the XT-2000iV and for CD-marker measured flowcytometrically (CD3+CD4+ - T-helpercells; CD5+ - T-cells; CD5+CD8+ - cytotoxic T-cells; CD21+ - B-cells, CD9-positive cells and CD4/CD8 ratio). Dogs have two different types of CD5+CD8+ double positive lymphocytes with varying degree of antigen expression. Quantification show a majority of cells with high expression (high fluorescence) for most animals.

Finally, **reticulated platelets for dogs** are measured with FACSCanto flow cytometer and XT-2000iV. Reference intervals are calculated for both methods. Correlation between both analyzers is poor ($r_s = 0.42$), probably due to limited range of values. Intra-assay precision is better for FACSCanto flow cytometer (CV = 7.48%) compared to the XT-2000iV (CV = 16.08% (mode "manual"), CV = 15.32% (mode "capillary")).

In conclusion, Sysmex XT-2000iV is a good hematologic system for use in preclinical research with blood samples from rats. Additional studies evaluating linearity, carry-over and influence of temperature and storage duration are necessary for a final assessment.

Rats of two different origins show significant differences for hematologic variables. These results indicate the need of control groups in studies for avoiding misinterpretation of acquired data. Additionally, choosing the adequate animal group for different topics of research is recommended.

Calculated reference intervals for rats and dogs are good for evaluating data obtained in preclinical safety studies.

Using the XT-2000iV is a useful tool for analyzing reticulated platelets in blood samples from dogs. However, for complete evaluation additional studies should be performed including samples from animals with thrombocytopenia.

8 Literatur

- Aleman, C. L., R. M. Mas, et al. (1998). "Reference database of the main physiological parameters in Sprague-Dawley rats from 6 to 32 months." Lab Anim **32**(4): 457-466.
- Allison, R. W., J. D. Brunker, et al. (2008). "Dendritic cell leukemia in a Golden Retriever." Vet Clin Pathol **37**(2): 190-197.
- Ameri, M., H. A. Schnaars, et al. (2011). "Stability of hematologic analytes in monkey, rabbit, rat, and mouse blood stored at 4 degrees C in EDTA using the ADVIA 120 hematology analyzer." Vet Clin Pathol **40**(2): 188-193.
- Anonymus (1946). Verfassung der Weltgesundheitsorganisation. Vereinte Nationen New York
- Asanuma, F., H. Miyata, et al. (2011). "Feature on erythropoiesis in dietary restricted rats." J Vet Med Sci **73**(1): 89-96.
- AVV (1997). Allgemeine Verwaltungsvorschrift zum Verfahren der behördlichen Überwachung der Einhaltung der Grundsätze der Guten Laborpraxis (ChemVwV-GLP) vom 15. Mai 1997.
- AVV (2004). Zweite Allgemeine Verwaltungsvorschrift zur Änderung der Allgemeinen Verwaltungsvorschrift zur Anwendung der Arzneimittelprüfrichtlinien vom 11. Oktober 2004 (BAnz. Nr. 197 vom 16.10.04).
- Bain, B., M. Seed, et al. (1984). "Normal values for peripheral blood white cell counts in women of four different ethnic origins." J Clin Pathol **37**(2): 188-193.
- Bain, B. J. (1996). "Ethnic and sex differences in the total and differential white cell count and platelet count." J Clin Pathol **49**(8): 664-666.
- Bauer, N. and A. Moritz (2008). "Evaluation of three methods for measurement of hemoglobin and calculated hemoglobin parameters with the ADVIA 2120 and ADVIA 120 in dogs, cats, and horses." Vet Clin Pathol **37**(2): 173-179.
- BayerHealthcare (2002). "Die Kunst der Hämatologie."
- BayerHealthcare (2003). "ADVIA 120 Hämatologiesystem - Informationen für Gerätedemonstrationen".
- BD (2008). "FACSCanto Schulungsunterlagen."
- Bernard, A. and L. Boumsell (1984). "The cluster of differentiation (CD) defined by the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens." Hum Immunol **11**(1): 1-10.
- Berradi, H., J. M. Bertho, et al. (2008). "Renal Anemia Induced by Chronic Ingestion of Depleted Uranium in Rats." Toxicol Sci **103**(2): 397-408.

- Bland, J. M. and D. G. Altman (1999). "Measuring agreement in method comparison studies." Stat Methods Med Res **8**(2): 135-160.
- Bokemeyer, J. (2003). Durchflußzytometrische Analyse von Lymphozytenpopulationen im peripheren Blut von Hunden mit immunsuppressiven Erkrankungen. Dissertation. Gießen, Justus-Liebig Universität.
- Boucheix, C., P. Benoit, et al. (1991). "Molecular cloning of the CD9 antigen. A new family of cell surface proteins." J Biol Chem **266**(1): 117-122.
- Bourgès-Abella, N., A. Geffré, et al. (2011). "Canine reference intervals for the Sysmex XT-2000iV hematology analyzer." Vet Clin Pathol **40**(3): 303-315.
- Brodersen, R., F. Bijlsma, et al. (1998). "Analysis of the immunological cross reactivities of 213 well characterized monoclonal antibodies with specificities against various leucocyte surface antigens of human and 11 animal species." Vet Immunol Immunopathol **64**(1): 1-13.
- Brun-Hansen, H. C., A. H. Kampen, et al. (2006). "Hematologic values in calves during the first 6 months of life." Vet Clin Pathol **35**(2): 182-187.
- Byrne, K. M., H. W. Kim, et al. (2000). "A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes." Vet Immunol Immunopathol **73**(2): 167-182.
- Byrne, K. M., G. A. Reinhart, et al. (2000). "Standardized flow cytometry gating in veterinary medicine." Methods Cell Sci **22**(2-3): 191-198.
- Chabanne, L., T. Marchal, et al. (1995). "Lymphocyte subset abnormalities in German shepherd dog pyoderma (GSP)." Vet Immunol Immunopathol **49**(3): 189-198.
- Cobbold, S. and S. Metcalfe (1994). "Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: Summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW)." Tissue Antigens **43**(3): 137-154.
- Comazzi, S. and M. E. Gelain (2011). "Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma." Vet J **188**(2): 149-155.
- Comazzi, S., M. E. Gelain, et al. (2006). "Flow cytometric expression of common antigens CD18/CD45 in blood from dogs with lymphoid malignancies: a semi-quantitative study." Vet Immunol Immunopathol **112**(3-4): 243-252.
- Comazzi, S., M. E. Gelain, et al. (2006). "Flow cytometric patterns in blood from dogs with non-neoplastic and neoplastic hematologic diseases using double labeling for CD18 and CD45." Vet Clin Pathol **35**(1): 47-54.
- Culmsee, K., Mischke, R., Nolte, I. (2001). "Durchflusszytometrische Untersuchung von Knochenmark leukämiekranker Hunde." Tierärztliche Praxis **29**: 176-183.
- Dale, G. L., P. Friese, et al. (1995). "Demonstration That Thiazole-Orange-Positive Platelets in the Dog Are Less Than 24 Hours Old." Blood **85**(7): 1822-1825.

- Daniel, V. (1992). "Klinisch relevante Anwendungen der Durchflusszytometrie." GIT, Labor-Medizin **1-2**: 27-30.
- Dörner, K., Schulze, S., Reinhardt, M.A. (1993). "Erste Evaluationsergebnisse mit dem Hämatologiesystem Cell-Dyn 3500 " Klin. Lab.: 39-44.
- Dunker, C. (2010). Evaluation der Hämatologiesysteme Sysmex pochH-100iV Diff und XT-2000iV für die Tierart Hund. Dissertation. Gießen, Justus-Liebig-Universität
- Dybkaer, R., Solberg, H.E. (1987). "Approved recommendation on the theory of reference values. Part 6. Presentation of observed values related to reference values " Clin Chim Acta **170**: 33-42.
- Faldyna, M., L. Levá, et al. (2001). "Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs--a flow cytometric study." Vet Immunol Immunopathol **82**(1-2): 23-37.
- Faldyna, M., P. Samankova, et al. (2007). "Cross-reactive anti-human monoclonal antibodies as a tool for B-cell identification in dogs and pigs." Vet Immunol Immunopathol **119**(1-2): 56-62.
- Faldyna, M., J. Sinkora, et al. (2003). "Flow cytometric analysis of bone marrow leukocytes in neonatal dogs." Vet Immunol Immunopathol **95**(3-4): 165-176.
- Feeman, W. E., 3rd, C. G. Couto, et al. (2003). "Serum Creatinine Concentrations in Retired Racing Greyhounds." Vet Clin Pathol **32**(1): 40-42.
- Feldmann, B. F., Zinkl, J.G, Jain, M.G., Ed. (2000). Schalm's Veterinary Hematology, 5th Edition, Lippincott Williams & Wilki.
- Fernandes, B. and Y. Hamaguchi (2003). "Performance characteristics of the Sysmex XT-2000i hematology analyzer." Lab Hematol **9**(4): 189-197.
- Fickenscher, Y. (2001). Softwareadaptation und Evaluation des lasergestützten Multiparameter-Hämatologiesystems ADVIA120 bei der Tierart Hund. Dissertation. Gießen, Justus-Liebig-Universität.
- Friedrichs, K. (2010). "Reference intervals: an essential, expanding, and occasionally equivocal standard " Vet Clin Pathol **39**(2): 131-132.
- Friedrichs, K., K. Barnhart, et al. (2011). Quality Assurance and Laboratory Standards Committee (QALS) Guidelines for the Determination of Reference Intervals in Veterinary Species and other related topics. American Society of Veterinary Clinical Pathology
- Gebhard, D. H. and P. B. Carter (1992). "Identification of canine T-lymphocyte subsets with monoclonal antibodies." Vet Immunol Immunopathol **33**(3): 187-199.
- Geffré, A., K. Friedrichs, et al. (2009). "Reference values: a review." Vet Clin Pathol **38**(3): 288-298.
- George, J. W., J. Snipes, et al. (2010). "Comparison of bovine hematology reference intervals from 1957 to 2006." Vet Clin Pathol **39**(2): 138-148.

- Gikins, M. L. A., Clifford, C.B. (1999). "Clinical Laboratory Parameters for Crl:CD(SD)TM Rats. Charles River Laboratories.
http://www.criver.com/sitecollectiondocuments/rm_rm_r_clinical_parameters_cd_rat_06.pdf."
- Gikins, M. L. A., Clifford, C.B. (2008). "Clinical Laboratory Parameters for Crl:WI(Han). Charles River Laboratories.
http://www.criver.com/sitecollectiondocuments/rm_rm_r_wistar_han_clin_lab_parameters_08.pdf."
- Goossens, W., L. Van Hove, et al. (1991). "Monocyte counting: Discrepancies in results obtained with different automated instruments." J Clin Pathol **44**(3): 224-227.
- Gräsbeck, R. (1983). "Reference value philosophy " Bull Mol Biol Med **8**: 1-11.
- Gräsbeck, R. and N. E. Saris (1969). "Establishment and use of normal values." Scand J Clin Lab Invest **26**(Suppl 110): 62-63.
- Hanahachi, A., T. Moritomo, et al. (2001). "Thiazole orange-positive platelets in healthy and thrombocytopenic dogs." Vet Rec **149**(4): 122-123.
- Harrison, P. (1997). "Variables affecting flow cytometry analysis of platelets " Lab Hematol **3**: 167.
- Henny, J., Hyltoft Petersen, P. (2004). "Reference values: from philosophy to a tool for laboratory medicine " Clin Chem Lab Med **42**: 686-691.
- Holsteg, M. (2002). Softwareadaptation und begleitende Evaluation des Hämatologiesystems ADVIA 120 für die Tierart Rind; Erstellung von hämatologischen Referenzbereichen für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und deutsches Fleckvieh. Dissertation. Gießen, Justus-Liebig-Universität.
- Horowitz, G. L., S. Altaie, et al. (2008). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory. Approved Guideline. 3rd edition (C28-A3).
- Huang, Y. C., S. W. Hung, et al. (2008). "CD5-low expression lymphocytes in canine peripheral blood show characteristics of natural killer cells." Journal of Leukocyte Biology **84**(6): 1501-1510.
- Hubert, M. F., P. Laroque, et al. (2000). "The effects of Diet, ad Libitum Feeding, and Moderate and Severe Dietary Restriction on Body Weight, Survival, Clinical Pathology Parameters, and Cause of Death in Control Sprague-Dawley rats." Toxicol Sci **58**(1): 195-207.
- Hyltoft Petersen, P., O. Blaabjerg, et al. (2004). "Graphical interpretation of confidence curves in rankit plots." Clin Chem Lab Med **42**(7): 715-724.
- ICH (2005). ICH harmonised tripartite guideline - Immunotoxicity studies for human pharmaceuticals. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use.
- ICH (2008). ICH Topic M3 (R2). Note for Guidance on Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals (CPMP/ICH/286/95). European Medicines Agency, London

- ICSH (1994). "Guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting and cell marker applications. International Council for Standardization in Hematology: prepared by the ICSH Expert Panel on Cytometry." Clin Lab Haematol **16**(157-174).
- Ingram, M. and A. Coopersmith (1969). "Reticulated platelets following acute blood loss." Br J Haematol **17**(3): 225-229.
- IOFS (2012). ISO 15189:2012. Medical laboratories - Requirements for quality and competence. International Organisation for Standardization.
- Jackson, C. W., N. K. Hutson, et al. (1988). "The Wistar Furth rat: an animal model of hereditary macrothrombocytopenia." Blood **71**(6): 1676-1686.
- Jensen, A. L. and M. Kjelgaard-Hansen (2006). "Method comparison in the clinical laboratory." Vet Clin Pathol **35**(3): 276-286.
- Jorgensen, L. G., I. Brandslund, et al. (2004). "Should we maintain the 95 percent reference intervals in the era of wellness testing? A concept paper." Clin Chem Lab Med **42**(7): 747-751.
- Karita, E., N. Ketter, et al. (2009). "CLSI-derived hematology and biochemistry reference intervals for healthy adults in eastern and southern Africa." PLoS One **4**(2): e4401.
- Kaufman, J. C., T. J. Harris, et al. (1994). "Exercise-induced enhancement of immune function in the rat." Circulation **90**(1): 525-532.
- Kern, W., Diem, H., Haferlach, T. (2005). "Immunphänotypisierung in der modernen Leukämiediagnostik." Deutsche Medizinische Wochenschrift **130**: 215-219.
- Kienast, J. and G. Schmitz (1990). "Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders." Blood **75**(1): 116-121.
- Langford, K., L. Luchtman-Jones, et al. (2003). "Performance Evaluation of the Sysmex XT-2000i Automated Hematology Analyzer." Lab Hematol **9**(1): 29-37.
- Levin, S., D. Semler, et al. (1993). "Effects of Two Weeks of Feed Restriction on Some Common Toxicologic Parameters in Sprague-Dawley Rats." Toxicol Pathol **21**(1): 1-14.
- Lewi, P. J. and R. P. Marsboom (1982). "Toxicology reference data for the Wistar rat." Arch Toxicol Suppl **5**: 271-276.
- Liberati, T. A., S. R. Sansone, et al. (2004). "Hematology and clinical chemistry values in pregnant Wistar Hannover rats compared with nonmated controls." Vet Clin Pathol **33**(2): 68-73.
- Lilliehook, I. and H. Tvedten (2009). "Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. I. Erythrocytes, platelets, and total leukocyte counts." Vet Clin Pathol **38**(2): 163-174.
- Lilliehook, I. and H. Tvedten (2009). "Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. II. Differential leukocyte counts." Vet Clin Pathol **38**(2): 175-182.

- Linnert, K. (1987). "Two-stage transformation systems for normalization of reference distributions evaluated " Clin Chem **33**: 381-386.
- Looringh van Beeck, F. A., D. M. Zajonc, et al. (2008). "Two canine CD1a proteins are differentially expressed in skin." Immunogenetics **60**(6): 315-324.
- Lumdsen, J. H., Mullen, K. (1978). "On establishing reference values." Can J Comp Med **42**: 293-301.
- Masellis-Smith, A., Jensen, G.S., Seehader, J.G., Slupsky J.R., Shaw AR (1990). "Anti-CD9 monoclonal antibodies induce homotypic adhesion of pre-B cell lines by a novel mechanism." J Immunol **144**(5): 1607-1613.
- Masellis-Smith, A., Shaw A.R. (1994). "CD9-regulated adhesion. Anti-CD9 monoclonal antibody induce pre-B cell adhesion to bone marrow fibroblasts through de novo recognition of fibronectin." J Immunol **152**(6): 2768-2777.
- Mathers, R. A., G. O. Evans, et al. (2007). "Total and Differential Leucocyte Counts in Rat and Mouse Bronchoalveolar Lavage Fluids using the Sysmex XT-2000iV." Comp Clin Pathol **16**: 29-39.
- Mathers, R. A., G. O. Evans, et al. (2008). "Evaluation of the Sysmex XT-2000iV haematology analyser for rat, dog and mouse whole blood samples." Comp Clin Pathol **17**(3): 137-144.
- Miyata, H., F. Asanuma, et al. (2009). "Evaluation of Myelotoxicity in Dietary Restricted Rats." J Toxicol Pathol **22**: 53-63.
- Moore, P. F., P. V. Rossitto, et al. (1992). "Monoclonal antibodies specific for canine CD4 and CD8 define functional T-lymphocyte subsets and high-density expression of CD4 by canine neutrophils." Tissue Antigens **40**(2): 75-85.
- Moritz, A. (2000). "Der Einsatz lasergestützter Multiparameter-Hämatologiesysteme in der Veterinärmedizin - Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen."
- Moritz, A., Y. Fickenscher, et al. (2004). "Canine and feline hematology reference values for the ADVIA 120 hematology system." Vet Clin Pathol **33**(1): 32-38.
- Moriyama, T., S. Tsujioka, et al. (2008). "Effects of reduced food intake on toxicity study parameters in rats." J Toxicol Sci **33**(5): 537-547.
- Nakagawa, J. (2010). Evaluation der Hämatologiesysteme pocH-100iV Diff und XT-2000iV für die Tierart Katze. Dissertation. Gießen, Justus-Liebig-Universität
- Nemoto, T., N. Yokota, et al. (2001). "Recombinant erythropoietin rapidly treats anemia in ischemic acute renal failure." Kidney Int **59**(1): 246-251.
- Nielsen, L., M. Kjelgaard-Hansen, et al. (2010). "Breed-specific variation of hematologic and biochemical analytes in healthy adult Bernese Mountain dogs." Vet Clin Pathol **39**(1): 20-28.
- Ogawa, Y., K. Matsumoto, et al. (1985). "Effect of feed restriction on peripheral blood and bone marrow cell counts of Wistar rats." Exp Animal **34**: 407-416.

- Pankraz, A., N. Bauer, et al. (2009). "Comparison of flow cytometry with the Sysmex XT2000iV automated analyzer for the detection of reticulated platelets in dogs." Vet Clin Pathol **38**(1): 30-38.
- Papasouliotis, K., S. Cue, et al. (1999). "Analysis of feline, canine and equine hemograms using the QBC VetAutoread." Vet Clin Pathol **28**(3): 109-115.
- Passing, H. and Bablok (1983). "A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I." J Clin Chem Clin Biochem **21**(11): 709-720.
- PetitClerc, C., Solberg, H.E. (1987). "Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 2. Selection of individuals for the production of reference values." J Clin Chem Clin Biochem **25**: 639-644.
- Pickering, R. G. and C. E. Pickering (1984). "The effects of reduced dietary intake upon the body and organ weights, and some clinical chemistry and haematological variates of the young Wistar rat." Toxicol Lett **21**(3): 271-277.
- Ramot, Y., D. Lewis, et al. (2007). "Age and dose sensitivities in the 2-butoxyethanol F344 rat model of hemolytic anemia and disseminated thrombosis." ExpToxicol Pathol **58**(5): 311-322.
- Reed, G. F., F. Lynn, et al. (2002). "Use of Coefficient of Variation in Assessing Variability of Quantitative Assays." Clin Diagn Lab Immunol **9**(6): 1235-1239.
- Robel, G. L., R. L. Lochmiller, et al. (1996). "Environmental, Age, and Sex Effects on Cotton rat (*Sigmodon Hispidus*) Hematology." J Wildl Dis **32**(2): 390-394.
- Rümke, C. L. (1959). "Variability of Results in Differential Cell Counts on Blood Smears." Triangle **4**: 154-158.
- Russell, K. E., P. E. Perkins, et al. (1997). "Flow cytometric method for detecting thiazole orange-positive (reticulated) platelets in thrombocytopenic horses." Am J Vet Res **58**(10): 1092-1096.
- Saalmüller, A. and B. Aasted (2007). "Summary of the animal homologue section of HLDA8." Vet Immunol Immunopathol **119**(1-2): 2-13.
- Schuberth, H.-J., G. Kucinskiene, et al. (2007). "Reactivity of cross-reacting monoclonal antibodies with canine leukocytes, platelets and erythrocytes." Vet Immunol Immunopathol **119**(1-2): 47-55.
- Schwartz, E., J. A. Tornaben, et al. (1973). "The Effects of Food Restriction on Hematology, clinical Chemistry and Pathology in the Albino Rat." Toxicol Appl Pharmacol **25**: 515-524.
- Sharkey, L., K. Gjevre, et al. (2009). "Breed-associated variability in serum biochemical analytes in four large-breed dogs." Vet Clin Pathol **38**(3): 375-380.
- Shiel, R. E., S. F. Brennan, et al. (2007). "Hematologic values in young pretraining healthy Greyhounds." Vet Clin Pathol **36**(3): 274-277.

- Smith, R., 3rd and J. S. Thomas (2002). "Quantitation of reticulated platelets in healthy dogs and in nonthrombocytopenic dogs with clinical disease." Vet Clin Pathol **31**(1): 26-32.
- Solberg, H. E. (1983). "The theory of reference values Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits." J Clin Chem Clin Biochem **21**(11): 749-760.
- Solberg, H. E. (1987). "International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), Scientific Committee, Clinical Section, Expert Panel on Theory of Reference Values, and International Committee for Standardization in Haematology (ICSH), Standing Committee on Reference Values. Approved Recommendation (1986) on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values." J Clin Chem Clin Biochem **25**(5): 337-342.
- Solberg, H. E. and C. PetitClerc (1988). "Approved recommendation (1988) on the theory of reference values. Part 3. Preparation of individuals and collection of specimens for the production of reference values." J Clin Chem Clin Biochem **26**: 593-598.
- Solberg, H. E. and D. Stamm (1991). "International Federation of Clinical Chemistry, Scientific Division: approved recommendation on the theory of reference values. Part 4. Control of analytical variation in the production, transfer and application of reference values." Eur J Clin Chem Clin Biochem **29**(8): 531-535.
- Suckow, M. A., Weisbroth, S.H., Franklin, C.L., Ed. (2006). The Laboratory Rat, Elsevier.
- Sundermann, F. W. J. (1975). "Current concepts of "normal values", "reference values" and "discrimination values" in clinical chemistry." Clin Chem **21**: 1873-1877.
- Symex (1/2007). "XT-2000iV - Messen Sie einfach, was Sie wollen!".
- Symex (1/2008). "Fluoreszenz-Durchflusszytometrie in der Hämatologie (XT-Serie) "
- Symex (2/2007). "XT-2000iV - Fluoreszenz-Durchflusszytometrie in der Tierblutanalytik ".
- Symex (2009). XT-2000iV/XT-1800iV Instructions for use.
- Thomson, A. W., P. H. Whiting, et al. (1981). "Pathological changes developing in the rat during a 3-week course of high dosage cyclosporin A and their reversal following drug withdrawal." Transplantation **32**(4): 271-277.
- Tizard, I. R. (2009). Veterinary Immunology - An Introduction Saunders Elsevier.
- Toyota, N., M. Ooe, et al. (2004). "Basic evaluation of hematology analyzer XT-2000i for laboratory animals " J Toxicol Sci **29**: 487.
- Tsumagari, S., I. Otani, et al. (2007). "Characterization of CD34+ cells from canine umbilical cord blood, bone marrow leukocytes, and peripheral blood by flow cytometric analysis." J Vet Med Sci **69**(11): 1207-1209.
- Turton, J. A., C. M. Hawkey, et al. (1989). "Age-related changes in the haematology of female F344 rats." Lab Anim **23**(4): 295-301.

- Tvedten, H. W. and I. E. Lilliehook (2011). "Canine differential leukocyte counting with the CellaVision DM96Vision, Sysmex XT-2000iV, and Advia 2120 hematology analyzers and a manual method." Vet Clin Pathol **40**(3): 324-339.
- Walton, R. M. (2001). "Establishing reference intervals: Health as a relative concept." Semin Avian Exotic Pet Med **10**(2): 66-71.
- Weiss, D. J. (2001). "Evaluation of monoclonal antibodies for identification of subpopulations of myeloid cells in bone marrow obtained from dogs." Am J Vet Res **62**(8): 1229-1233.
- Weiss, D. J. (2001). "Evaluation of proliferative disorders in canine bone marrow by use of flow cytometric scatter plots and monoclonal antibodies." Vet Pathol **38**(5): 512-518.
- Weiss, D. J. (2002). "Flow Cytometric Evaluation of Hemophagocytic Disorders in Canine Bone Marrow." Vet Clin Pathol **31**(1): 36-41.
- Weiss, D. J. (2004). "Flow cytometric evaluation of canine bone marrow based on intracytoplasmic complexity and CD45 expression." Vet Clin Pathol **33**(2): 96-101.
- Weiss, D. J., Moritz, A. (2004). Analysis of platelets by cytometry. 55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) & 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP)
- Weiss, D. J., Townsend, E. (1998). "Evaluation of reticulated platelets in dogs." Comp Haematol Int **8**(3): 166-170.
- Weiss, D. J. and K. J. Wardrop, Eds. (2010). Schalm's Veterinary Hematology, 6th Edition, Wiley Blackwell.
- Westgard, J. O. (2003). Basic Method Validation, 2nd Edition.
- Wilkerson, M. J., W. Shuman, et al. (2001). "Platelet size, platelet surface-associated IgG, and reticulated platelets in dogs with immune-mediated thrombocytopenia." Vet Clin Pathol **30**(3): 141-149.
- Wolford, S. T., R. A. Schroer, et al. (1986). "Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals." J Toxicol Environ Health **18**(2): 161-188.
- Woo, S., W. Krzyzanski, et al. (2007). "Pharmacodynamic model for chemotherapy-induced anemia in rats." Cancer Chemother Pharmacol **62**(1): 123-133.
- Yao, Z., D. C. DuBois, et al. (2008). "Pharmacokinetic / pharmacodynamic modeling of corticosterone suppression and lymphocytopenia by methylprednisolone in rats." J Pharm Sci **97**: 2820-2832.
- Yoshii, A., S. Y., et al. (2002/2003). Effects of Food Restriction on Results of Hematology Examination and Urinalysis in CD(SD)IGS Rats - a Four-Week Restricted Feeding Examination with Two-Week Recovery Period in Six Weeks old Rats. Tokyo, Best Printing.

9. Abkürzungen

BASO	basophils (basophile Granulozyten)
CD	Cluster of Differentiation
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CV	coefficient of variation (Variationskoeffizient)
EDTA	ethylenediaminetetraacetate acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
EO	eosinophils (eosinophile Granulozyten)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
fl	Femtoliter
fmol	Femtomol
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht, entspricht der Zellgröße)
HCT	Hämatokrit
HFR	high fluorescence ratio (reticulocytes)
HGB	Hämoglobin
high_p	Thrombozyten mit hohen Mengen an RNA-Resten (Messung am XT-2000iV)
IRF	immature reticulocyte fraction
Ig	Immunglobulin
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
ISO	International Organization for Standardization
kDa	Kilodalton
l	Liter
LFR	low fluorescence ratio (reticulocytes)
low_p	Thrombozyten mit geringen Mengen an RNA-Resten (Messung am XT-2000iV)
LUC	large unstained cells
LYMPH	lymphocytes (Lymphozyten)
MCH	mean corpuscular hemoglobin (Mittlerer Zellulärer Hämoglobingehalt)
MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration (Mittlere Hämoglobin- konzentration der Erythrozyten)
MCV	mean corpuscular volume (Mittleres Erythrozytenvolumen)

medium_p	Thrombozyten mit mittleren Mengen an RNA-Resten (Messung am XT-2000iV)
MFR	medium fluorescence ratio (reticulocytes)
MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
ml	Milliliter
MONO	monocytes (Monozyten)
MPV	mean platelet volume (Mittleres Thrombozytenvolumen)
n	Probenzahl
NaCL	Natriumchlorid
NEUT	neutrophils (Neutrophile Granulozyten)
no_p	Thrombozyten ohne RNA-Reste (Messung am XT-2000iV)
p	Signifikanz
PCT	plateletcrit (Hämatokrit der Thrombozyten)
PCV	packed cell volume (Hämatokritwert Mikrohämatokritzentrifuge)
PDW	platelet distribution width (Thrombozyten Volumenverteilungsbreite)
PE	<i>R-phycoerythrin</i>
P-LCR	platelet large cell ration (Anteil großer Thrombozyten)
PLT	platelet count (Thrombozytenzahl)
PLT-I	platelet count – Impedanzmessung am XT-2000iV
PLT-O	platelet count – optische Messung am XT-2000iV
r	Korrelationskoeffizient
RBC	red blood count (Erythrozytenzahl)
RBC-I	red blood count – Impedanzmessung am XT-2000iV
RBC-O	red blood count – optische Messung am XT-2000iV
RET / retic	reticulocytes (Retikulozyten)
RDW-CV	red cell distribution width – coefficient of variation (Erythrozytenverteilungsbreite)
RDW-SD	red cell distribution width – standard deviation
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SFL	Side Fluorescence (Seitenfluoreszenzlicht, entspricht der Fluoreszenzintensität)

SLS	Sodiumlaurylsulfat
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreulicht, entspricht der Granularität der Zelle)
μl	Mikroliter
WBC	white blood count (Leukozytenzahl)

Danksagung

Ein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Andreas Moritz für die Überlassung des interessanten Themas und die überaus nette Betreuung während der Anfertigung der Arbeit.

Herrn Prof Dr. Hans Harleman möchte ich für den immer freundlichen Kontakt und die schnelle Korrektur der Arbeit danken.

Der Firma Merck KGaA, Darmstadt danke ich für die finanzielle Unterstützung und dem Institut für Toxikologie unter Leitung von Dr. Marian Brändle für die freundliche Aufnahme im Labor.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Sigrid Johannes, die jederzeit eine sehr nette und fachlich kompetente Ansprechpartnerin war.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Toxikologie für ihre Hilfsbereitschaft bedanken, im Besonderen bei Bianka Funke, Heike Strauß und Gerald Schäfer. Es war sehr nett bei euch in der „Häma“!

Ich bedanke mich sehr bei der Firma Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt für die Bereitstellung des Sysmex XT-2000iV und bei Frau Dr. Melanie Ginder für die tolle fachliche Unterstützung.

Frau PD Dr. Natali Bauer möchte ich für das lehrreiche Praktikum im Zentrallabor des Fachbereichs für Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen danken. Außerdem war sie eine tolle Hilfe für Fragen rund um die Hämatologie und die statistische Auswertung der Daten. Vielen Dank hierfür!

Sophie, Annika und Steve danke ich für das Gegenlesen der Arbeit und das Aufspüren meiner zahlreichen Kommafehler.

Die Vierbeiner und „Krummschnäbel“ sowie alle meine Freunde haben nicht immer zum zügigen Vorwärtkommen der Dissertation beigetragen – vielen Dank für die schönen Stunden mit euch während meiner Doktoranden-Zeit.

Und schließlich gilt mein ganz besonderer Dank der besten Familie, die man sich wünschen kann – nämlich meiner. Danke für die immerwährende liebevolle Unterstützung.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6069-5

