

BLUTZELLZÄHLUNG UND -DIFFERENZIERUNG
BEI PFERD UND SCHWEIN MIT DEM
HÄMATOLOGIESYSTEM ADVIA 120
GERÄTEVALIDIERUNG UND
SOFTWAREADAPTATION

ANGELIKA DURA



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
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 2006

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 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

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

www.doktorverlag.de

Aus der Klinik für Kleintiere Innere Medizin
und klinische Laboratoriumsdiagnostik
und der Klinik für Pferde Innere Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Blutzellzählung und -differenzierung bei Pferd und
Schwein mit dem Hämatologiesystem ADVIA 120
Gerätevalidierung und Softwareadaptation**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

eingereicht von

ANGELIKA DURA

Tierärztin aus Frankfurt/M

Gießen 2005

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

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: HDoz. Dr. A. Moritz und Prof. Dr. H.H.L. Sasse

2. Berichterstatter: PD. Dr. G. Schultheiß

Tag der mündlichen Prüfung: 2. November 2005

meinen Eltern und meiner Familie

Martin, Murielle, Paul und Maja

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Aufgabenstellung	2
2	SCHRIFTTUM	3
2.1	Historischer Überblick	3
2.2	Hämatologische Methoden	4
2.2.1	Automatisierte Analyseverfahren	4
2.2.1.1	Moderne Durchflusszytometer/ Flowcytometrie	4
2.2.1.1.1	Impedanz- oder Widerstandsmethode	5
2.2.1.1.2	Optoelektrisches Messprinzip/ Streulichtmethode.....	5
2.2.1.1.3	Fluoreszenzmethode.....	7
2.2.1.2	Quantitative Buffy Coat (QBC) Systeme.....	8
2.2.1.3	Parameter der Blutzellzählung.....	10
2.2.1.4	Parameter der Blutzelldifferenzierung.....	18
2.2.1.5	Störende Einflüsse auf die automatisierte Blutzellanalyse.....	22
2.2.1.5.1	Einflüsse auf die Blutzellzählung.....	22
2.2.1.5.2	Einflüsse auf die Blutzelldifferenzierung.....	24
2.2.2	Evaluation von Hämatologiesystemen.....	26
2.2.2.1	Qualitätssicherung	26
2.2.2.2	Standardisierung der Evaluation von Zellzähl- und Zelldifferenzierungsgeräten	26
2.2.3	Einsatz von Hämatologiesystemen bei Pferd und Schwein	28
2.2.3.1	Impedanzmethode bei den Tierarten Pferd und Schwein	29
2.2.3.1.1	Blutzellzählung	29
2.2.3.1.2	Blutzelldifferenzierung.....	33
2.2.3.2	Optoelektrisches Messprinzip beim Pferd und Schwein	35
2.2.3.2.1	Blutzellzählung	35
2.2.3.2.2	Blutzelldifferenzierung.....	37
2.2.3.3	QBC-System bei den Tierarten Pferd und Schwein.....	40
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	41
3.1	Material und Methoden	41
3.1.1	Tiere	41
3.1.2	Blutentnahme.....	43
3.1.3	Hämatologiesystem ADVIA 120.....	44

3.1.3.1	Erythrozyten- und Thrombozytenkanal	47
3.1.3.2	Retikulozytenanalytik	50
3.1.3.3	Hämoglobinkanal	51
3.1.3.4	Peroxidase-Differenzierungsmethode.....	52
3.1.3.5	Basophilenmethode/Kernsegmentierungskanal.....	53
3.1.3.6	Qualitätskontrolle und Kalibration	55
3.1.4	Hämatologiesystem Technicon H*1	55
3.1.4.1	Ergebnisdarstellung Technicon H*1.....	56
3.1.4.2	Qualitätskontrolle und Kalibration	57
3.1.5	Sysmex F 800.....	58
3.1.5.1	Ergebnisdarstellung Sysmex F-800	58
3.1.5.2	Qualitätskontrolle und Kalibration	59
3.1.6	Mikrohämatokritzentrifuge	59
3.1.7	Manuelle Differenzierung.....	59
3.1.7.1	Färbereagezien.....	59
3.1.7.2	Färbetechnik.....	60
3.1.7.2.1	Panoptische Färbung nach Pappenheim (PAN)	60
3.1.7.2.2	Alpha-Naphtyl-Acetat-Esterase (ANAE)	61
3.1.7.2.3	Peroxidasefärbung (POX).....	62
3.1.7.2.4	Retikulozytenfärbung (RETI).....	63
3.1.8	Softwareadaptation und Geräteevaluierung	64
3.1.8.1	Präzision innerhalb der Serie und über verschiedene Serien hinweg.	65
3.1.8.2	Methodenvergleich	65
3.1.8.3	Linearität und Verschleppung	66
3.1.8.4	Antikoagulanzenvergleich	67
3.1.8.5	Blutalterung und Lagerungstemperatur	67
3.1.9	Statistische Auswertung	67
3.2	Ergebnisse.....	70
3.2.1	Evaluierung des Hämatologiesystems ADVIA 120	70
3.2.1.1	Präzision	70
3.2.1.1.1	Präzision Advia 120.....	70
3.2.1.1.1.1	Präzision innerhalb der Serie	70
3.2.1.1.1.2	Präzision über verschiedene Serien hinweg.....	74
3.2.1.1.2	Präzision Technicon H*1	81
3.2.1.1.3	Präzision Sysmex F-800.....	84
3.2.1.2	Methodenvergleich.....	85

3.2.1.2.1	Parameter der Blutzellzählung	85
3.2.1.2.1.1	Softwareadaptation ADVIA 120	85
3.2.1.2.1.2	Korrelationsdiagramme Blutzellzählung	91
3.2.1.2.1.3	Retikulozytenzählung	107
3.2.1.2.1.4	Mittelwertvergleich Blutzellzählung	109
3.2.1.2.2	Parameter der Blutzelldifferenzierung	114
3.2.1.2.2.1	Softwareadaptation ADVIA 120	114
3.2.1.2.2.2	Korrelationsdiagramme Blutzelldifferenzierung	119
3.2.1.2.2.3	Mittelwertvergleich der Blutzelldifferenzierung	125
3.2.1.3	Linearität und Verschleppung.....	129
3.2.1.4	Antikoagulanzenvergleich.....	131
3.2.1.5	Blutalterung und Lagerungstemperatur	137
4	DISKUSSION	159
4.1	Evaluierung des Hämatologiesystems ADVIA 120	159
4.1.1	Präzision	159
4.1.1.1	Parameter der Blutzellzählung.....	159
4.1.1.2	Parameter der Blutzelldifferenzierung.....	163
4.1.1.3	Retikulozytenzählung.....	166
4.1.2	Methodenvergleich	167
4.1.2.1	Parameter der Blutzellzählung.....	167
4.1.2.2	Parameter der Blutzelldifferenzierung.....	169
4.1.2.3	Retikulozytenzählung.....	172
4.1.3	Linearität und Verschleppung	173
4.1.4	Antikoagulanzenvergleich	174
4.1.5	Blutalterung.....	176
4.1.5.1	Parameter der Blutzellzählung.....	176
4.1.5.2	Parameter der Blutzelldifferenzierung.....	178
4.2	Kritische Betrachtung einiger Proben	180
4.2.1	Veränderungen des roten Blutbildes.....	180
4.2.2	Veränderungen des weißen Blutbildes	184
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	186
6	SUMMARY	189
7	SCHRIFTUMVERZEICHNIS.....	192
8	DANKSAGUNG.....	203

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

Abb.	=	Abbildung
abs.	=	absolut
ADVIA 120	=	Hämatologiesystem ADVIA 120
AM	=	Analysenmodus des H*1
ANAE	=	α -Naphthylacetat Esterase (Färbung)
Basophile G.	=	Basophile Granulozyten
CHCM	=	gemessene mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (Cell hemoglobin concentration mean)
CV	=	Variationskoeffizient (Coefficient of Variation)
d	=	Mittelwert der Differenz
Eosinophile G.	=	Eosinophile Granulozyten
et al.	=	et alii
F-800	=	Sysmex F-800
fl	=	Femtoliter
fmol	=	Femtomol
h	=	Stunden (hours)
H*1	=	Hämatologiesystem Technicon H*1
HGB	=	Hämoglobin (Haemoglobin)
HCT	=	Hämatokritwert
HDW	=	Hämoglobinverteilungsbreite (Haemoglobin Distribution Width)
ICSH	=	Internationales Komitee für Standardisierung in der Hämatologie (International Committee for Standardization in Haematology)
J.	=	Jahre
K ₃ EDTA	=	Kalium-Ethylendiamintetraessigsäure
Kap.	=	Kapitel
Li	=	Lithium
LUC	=	große Peroxidase Negativ Gefärbte Zellen (Large Unstained Cells)
IBasoa	=	absolute Zahl der Basophilen Granulozyten lognormalverteilt
IEoa	=	absolute Zahl der Eosinophilen Granulozyten lognormalverteilt
ILUCa	=	absolute Zahl der LUC lognormalverteilt
ILympa	=	absolute Zahl der Lymphozyten lognormalverteilt
IMonoa	=	absolute Zahl der Monozyten lognormalverteilt
INEuta	=	absolute Zahl der Neutrophilen Granulozyten lognormalverteilt
IReti	=	absolute Zahl der Retikulozyten lognormalverteilt
Lymp	=	Lymphozyten
MCH	=	Mittlerer Zellulärer Hämoglobingehalt (Mean Corpuscular Haemoglobin)

MCHC	=	Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration)
MCV	=	Mittleres Erythrozytenvolumen (Mean Corpuscular Volume)
MN	=	Mononukleäre Zellen (Mononucleated Cells)
Mono	=	Monozyten
MPV	=	Mittleres Thrombozytenvolumen (Mean Platelet Volume)
n	=	Probenzahl
Na	=	Natrium
n. d.	=	nicht durchgeführt
NCCLS	=	Nationales Komitee für Klinische Labor-Standards (National Committee for Clinical Laboratory Standards)
Neutrophile G.	=	Neutrophile Granulozyten
PAN	=	Panoptische Färbung nach Pappenheim
PCV	=	Packed Cell Volume (Hämatokritwert)
PDW	=	Thrombozyten Volumenverteilungsbreite (Platelet Volume Distribution Width)
PLT	=	Thrombozytenzahl (Platelet Count)
PMN	=	Polymorphnukleäre Zellen (Polymorphnucleated Cells)
POX	=	Peroxidase (Färbung)
QBC	=	Quantitative Buffy-Coat (Analyse)
r	=	Korrelationskoeffizient
RBC	=	Erythrozytenzahl ((Red Blood Cells) Red Cell Count)
rd	=	relative Differenz
RDW	=	Erythrozyten(volumen)verteilungsbreite (Red Cell Volume Distribution Width)
s.	=	siehe
S.	=	Seite
SD _d	=	Standardabweichung der mittleren Differenz
SD _{in}	=	Standardabweichung innerhalb einer Probe
Tab.	=	Tabelle
µl	=	Mikroliter
vgl.	=	vergleiche
WBC	=	Leukozyten(gesamt)zahl (White Blood Cells) Total Leucocyte Count)
\bar{x}	=	Mittelwert

1 EINLEITUNG

Die Untersuchung des weißen und des roten Blutbildes gehört seit Jahren auch in der Veterinärmedizin zur Routinediagnostik und ist im 20. Jahrhundert wie viele diagnostische Bereiche der Medizin einer starken Technisierung unterworfen. In den letzten 30 Jahren wurden kontinuierlich neue automatische Systeme für die hämatologische Diagnostik entwickelt. Durch ein erhebliches Probenaufkommen vor allem in der Bestandsdiagnostik der Nutztierpraxis erscheint es sinnvoll, dass kommerzielle Laboratorien über eine entsprechende Einstellung der Geräte für die einzelnen Tierarten verfügen. Die für die Humanmedizin konzipierten Geräte müssen in entsprechenden Studien für die Veterinärmedizin angepaßt oder in ihrer Einsatzfähigkeit überprüft werden.

In der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik an der Justus-Liebig-Universität in Giessen wurden im Zeitraum von 1993 bis 1999 eine Reihe von Evaluationen an modernen Hämatologiesystemen durchgeführt. In einer Serie von fünf Dissertationen wurde das Hämatologiesystem Technicon H*1 für die Tierarten Hund, Katze, Pferd, Rind und Schaf evaluiert. (ZIEGLER, 1997; SEEGERS, 1997; SUCHFORT, 1998; GROMMELT, 1999; BEDDIES, 1999) Die Arbeitsgruppe Hämatologie um Herrn Dr. Moritz, erhielt im Anschluss an diese Arbeiten von der Firma Bayer den Auftrag, eine Alpha-Site für die Gerätezulassung im Bereich Veterinärmedizin in den USA durchzuführen. Das neue Hämatologiesystem ADVIA 120 wurde entsprechend den Richtlinien der amerikanischen Zulassungsbehörde validiert. Die Evaluation erfolgte für die Tierarten Hund, Katze, Pferd und Schwein, Rind, Schaf und Ziege. In ihrer Gesamtheit vervollständigen die Arbeiten der Autoren FICKENSCHER, HOLSTEG, MEYER und PÜSCH das Bild der Evaluierung und der tierartlichen Besonderheiten im Vergleich zum Menschen.

1.1 Aufgabenstellung

In einer tierartlichübergreifenden Studie wurde das Hämatologiesystem ADVIA 120 unter Verwendung einer Multi-Spezies Software an die Tierarten Hund, Katze, Pferd, Schwein, Rind, Schaf und Ziege angepasst. Im Rahmen dieser Studie soll das Ziel der vorliegenden Arbeit sein, für die Tierarten Pferd und Schwein die Schritte der Softwareadaptation darzustellen, tierartliche Besonderheiten zu erörtern und letztendlich die Einsatzfähigkeit des ADVIA 120 für Pferd und Schwein zu beurteilen. Hierbei stellen die Schweine mit ihren sehr labilen Blutzellen eine besondere Herausforderung dar.

Als Vergleichs- und Referenzgeräte bzw. -methoden dienen das Hämatologiesystem H*1, der Sysmex F800, die Mikrohämatokritzentrifuge und die manuellen Leukozytendifferenzierungen unter Anwendung der Panoptischen Färbung nach Pappenheim, einer Peroxidasefärbung und die Färbung mit Alpha-Naphtyl-Acetat-Esterase. Für die Beurteilung der Richtigkeit der Retikulozytenzählung dient die Brilliantkresylblaufärbung.

Als Grundlage für die Evaluation und Adaptation gelten die Richtlinien der ICSH (International Committee for Standardization in Haematology)(ICSH,1994).

2 SCHRIFTTUM

2.1 Historischer Überblick

Seit der Erfindung des Mikroskopes Ende des 16. Jahrhunderts von Hans und Zacharius war die Hämatologie einer ständigen Weiterentwicklung unterworfen. Im 17. Jahrhundert entdeckten Borel, Malpighi, Swammerdam und van Leeuwenhoek die korpuskulären Bestandteile des Blutes. Antoni van Leeuwenhoek vermochte bereits 1674 die weißen und die roten Blutkörperchen zu unterscheiden. Wenn auch noch mit sehr einfacher mikroskopischer Technik, begann hier also vor über 300 Jahren die Betrachtung und Bewertung der Blutzellen und ihrer Morphologie in der hämatologischen Labordiagnostik. Im 19. Jahrhundert entdeckte E. Home die Blutplättchen, H. Nasse beschrieb deren Rolle in der Blutgerinnung und die morphologische Unterscheidung der segmentkernigen und der rundkernigen Leukozyten. Mitte des Jahrhunderts zählten F. Vierordt (1852) und Welcker (1854) das erste Mal rote und weiße Blutkörperchen. 1905 erhielt die Zählkammer nach Bürker ihre endgültige Form. Paul Ehrlich (1854-1915), der die Färbung der Blutzellen 1877 in die Hämatologie etablierte, leistete der hämatologischen Zytologie einen riesigen Vorschub. Hieraus erwachsen die durch G. Giemsa, J.H. Wright, R. May, L. Grünwald und A. Pappenheim etablierten panoptischen Färbemethoden, während H. Quincke mit der Berliner-Blau-Reaktion die Zytochemie in der Hämatologie einführte (BOROVICZENY, 1967).

Die seit Anfang des 20. Jahrhunderts bekannten Entdeckungen bilden in der heutigen modernen Hämatologie immer noch die Grundlage zur morphologischen Beurteilung der Blutzellen. Im Laufe des 20. Jahrhunderts hat neben einer starken Technisierung auch eine starke Spezifizierung stattgefunden. Untersuchungen beschränken sich nicht nur auf das Humanblut und seine Morphologie, inzwischen wird eine weitreichende Diagnostik, vor allem auch im Rahmen der Forschung, auf dem Tierblutsektor gefordert. Am Anfang der automatisierten Blutzellzählung stehen in den 50iger Jahren von Coulter entwickelte Durchflussszytometer (Coulter Counter Model A), die nach dem Impedanzmessprinzip arbeiten. Für die Zelldifferenzierung kombinierte Technicon Instruments in den 60iger Jahren die Durchflussszytometrie mit zytochemischen Färbemethoden. Durch ihre hohe Leistungsfähigkeit, Richtigkeit und Präzision etablierte sich eine Vielfalt von modernen Zellzählssystemen in klinischen Laboratorien.

2.2 Hämatologische Methoden

2.2.1 Automatisierte Analyseverfahren

Das Angebot an modernen Hämatologiesystemen ist sehr vielfältig. Es reicht von kleineren, halbautomatischen für die praktische Routinehämatologie (z.B. in der tierärztlichen Praxis) einsetzbaren Geräten (mit Impedanzmessprinzip oder quantitative Buffy-Coat-Analyse, QBC), bishin zu Großgeräten für die vollautomatisierte Blutzellzählung und -differenzierung in größeren kommerziellen Laboratorien bzw. Kliniken.

Zellzählgeräte können die Zellen nicht wie das menschliche Auge an ihren morphologischen Eigenschaften erkennen, sondern bedienen sich hierfür einfacher physikalischer Prinzipien. Hierbei differenziert man elektronische und optische Messmethoden (WEBER, 1992).

2.2.1.1 Moderne Durchflusszytometer/ Flowcytometrie

In der modernen Durchflusszytometrie unterscheidet man

Impedanz- oder Widerstandsmethode	z.B. Coulter S, Coulter Electronics; Sysmex F800 und E-2500, TOA Medical Electronics*
Optoelektrisches Messprinzip/ Streulichtmethode	z.B. Ortho ELT-8/DS, Ortho Diagnostics Systems; Technicon H*1 und ADVIA 120; Miles Diagnostics Division Tarrytown, NY*
Fluoreszenzmethode	z.B. Facs Scan, Becton Dickinson*

** beispielhaft aufgeführt, anhand der für die Tierarten Pferd und Schwein aus der Literatur verwendeten Hämatologiesysteme*

Der Untersucher kann entsprechend seinen individuellen Anforderung aus einer großen Palette von Systemen auswählen. Systeme mit der Möglichkeit zur Erythrozyten-, Leukozyten-, Thrombozytenzählung und Bestimmung der Hämoglobinkonzentration, des weiteren aus solchen, die ein Differenzialblutbild

anfertigen und/oder über die Möglichkeit einer automatisierten Retikulozytendiagnostik verfügen.

2.2.1.1.1 Impedanz- oder Widerstandsmethode

Das Verfahren der Widerstandsmessung basiert auf der elektrischen Impulsänderung, welche beim Durchfließen einer Zelle durch die Messvorrichtung (Detektor) entsteht. Eine die Zelle umgebende Elektrolytlösung besitzt eine bestimmte elektrische Leitfähigkeit, die unter einem sog. Schwellenwert liegt. Aus der Spannungsänderung beim Durchfluss einer Zelle durch die Messanordnung resultieren Impulsbreite (Durchlaufzeit der Zelle durch den Detektor) und Impulshöhe (abhängig von Größe und Form der Zelle). Zellen verschiedener Größe erzeugen Impulse unterschiedlicher Höhe. Gezählt werden je nach Geräteeinstellung alle Impulse, deren Höhe einen bestimmten Schwellenwert überschreiten. Niedrigere Impulse bilden das sog. Rauschen und werden nicht bei der Zellzählung berücksichtigt. Daraus resultiert die absolute Partikelzählung. Eine Unterscheidung der einzelnen Zellpopulationen erfolgt durch Einteilung nach Impulshöhe. (WEBER, 1992).

Probleme für die Blutzellzählung mittels Impedanzmessung ergeben sich aus tierartlichen Spezifitäten der Blutzellen. Dies sind z.B. unterschiedliche Lyseresistenz oder variierende Enzymreaktionen, sowie kleine Erythrozyten (Pferd, Schaf, Ziege), große Thrombozyten (Katze) wie auch unterschiedliche Morphologie der Leukozytenpopulationen verschiedener Tierarten (FINOCCHIO et al., 1970; SCHALM et al., 1975; WEISER, 1987).

2.2.1.1.2 Optoelektrisches Messprinzip/ Streulichtmethode

Die Streulichtmethode berücksichtigt die Richtungsänderung eines Lichtstrahls, die durch mikroskopisch kleine Partikel bei einer entsprechenden Wellenlänge verursacht werden. Die Streuung des Lichts z.B. an einem Erythrozyten, Leukozyten oder Thrombozyten bewirkt zunächst verschiedene optische Erscheinungen. Ein auftreffender Lichtstrahl unterliegt Reflexion, Brechung und Absorption (durch höheren Brechungsindex der Zellen), Beugung der Wellenlänge (bei mit der Größe des Teilchens vergleichbarer Wellenlänge) und Depolarisation des Lichtes (Änderung der Schwingungsrichtung)(WEBER, 1992).

Streuung und Absorption werden messtechnisch genutzt, indem der gestreute Licht – oder Laserstrahl auf einem Detektor aufgefangen und in ein elektrisches Signal umgewandelt wird (vgl. Kap.3.1.3). Die Intensität des Streulichts ist hierbei proportional zur Größe der Zelle (GRONER und TYCKO, 1980).

Zur Vermeidung von Fehlmessungen, z.B. durch Zellen (Thrombozyten), die marginal im Probenstrom die Messvorrichtung passieren, bedient man sich bei den beschriebenen Messmethoden der *hydrodynamischen Zellfokussierung* (Abb. 01). Die Abbildung zeigt eine Durchflussküvette (entsprechend den H*Systemen und ADVIA 120) mit Reagenz-, Proben- und Sheathzulauf (im unteren Teil). In der Messebene findet Streulicht- und Absorptionsmessung statt.

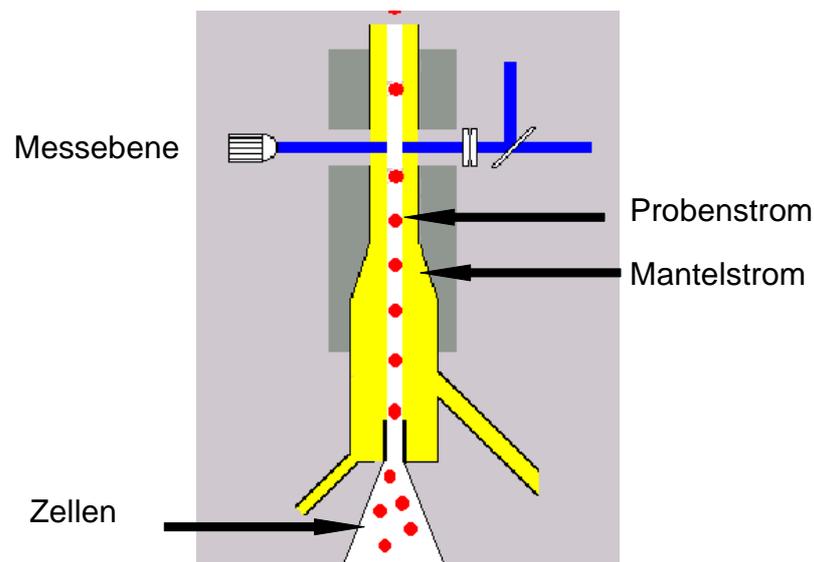


Abbildung 01: Hydrodynamische Zellfokussierung in einer Durchflussküvette (nach ADVIA 120 Hematology System Benutzerhandbuch)

Bedingt durch eine laminare Strömung wird eine Mischung mit dem Probenstrom verhindert. Der Mantelstrom darf sich in seinen optischen (oder elektrischen) Eigenschaften nicht von dem Reagenz (Probenstrom) unterscheiden, dies gewährleistet, dass die Lichtstreuung, Absorption (oder Impedanzänderung) tatsächlich nur durch die die Messvorrichtung passierende Zelle hervorgerufen wird.

Durch die Vereinzelung der in Zellsuspension vorliegenden Blutzellen werden Koinzidenzen verringert und eine exaktere Bestimmung der Anzahldichte ermöglicht.

Eine weitere Problematik stellt die Form von Erythrozyten und Thrombozyten dar. Ihre individuelle Verformbarkeit bedingt in der Volumetrie der Zellen einen großen Variabilitätsfaktor. Zur Vermeidung findet z.B. bei den Hämatologiesystemen H*1 und ADVIA 120 eine isovolumetrische Aufkugelung (s. Abb. 02) der Erythrozyten und Thrombozyten statt (KIM und ORNSTEIN, 1983). Die kugelförmigen Zellen, die axial durch die Messkapillare fließen, liefern volumenproportionale Signale.

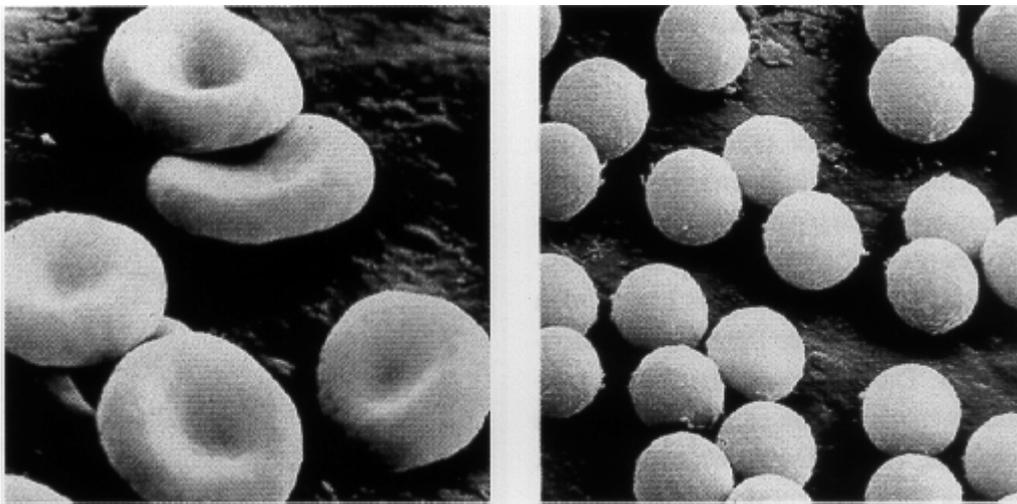


Abbildung 02: (a) physiologisch bikonkav geformte Erythrozyten
(b) Isovolumetrische Aufkugelung (sphering) von Erythrozyten
(Elektronenmikroskopie aus Blutbildatlas BAYER DIAGNOSTIC)

Die Kombination von Streulichttechnik und Lichtabsorption bewährt sich seit Jahrzehnten im hämatologischen Routineeinsatz. Mit Hilfe von zytochemischen Verfahren (z.B. Peroxidasefärbung) wird die Absorption, d.h. die Konzentration des angefärbten Zellinhaltes der einzelnen Zellpopulationen ermittelt (WEBER, 1992) (siehe auch Kap. 3.1.3.4). Dies ermöglicht die Differenzierung der fünf Leukozytenpopulationen (SAUNDERS, 1972).

2.2.1.1.3 Fluoreszenzmethode

Ein weiteres Messprinzip stellt die Fluorometrie dar. Durch die Kombination des Streulichts mit der Messung der Fluoreszenz können z.B. T- und B- Lymphozyten,

Monozyten und Makrophagen, identifiziert werden (WEBER, 1992). Spezifische Oberflächenmarker und intrazelluläre Marker dienen zur Differenzierung von bestimmten Zellpopulationen. Ebenfalls mittels Fluorometrie zu bestimmende Zellgruppe sind die Retikulozyten. Die in den Zellen vorhandene restliche RNA wird mit sich quantitativ anlagernden fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Die simultane Erfassung der Streu- und Fluoreszenzlichtintensität ermöglicht eine Trennung von Erythrozyten und fluoreszierenden Retikulozyten.

2.2.1.2 Quantitative Buffy Coat (QBC) Systeme

Das Quantitative Buffy Coat System (Idexx GmbH 1996) trennt mittels Zentrifugation die Blutsäule in einer Kapillare und unterscheidet die einzelnen Zellpopulationen anhand von Dichte- und Fluoreszenzbestimmung. Folgende Parameter können ermittelt werden: Leukozyten (White blood cells, WBC), Erythrozyten (Red blood cells, RBC), Retikulozyten/Normoblasten (bei Hunden und Katzen), eosinophile und neutrophile Granulozyten, Lymphozyten/Monozyten, Thrombozyten (Platelets, PLT), Hämatokritwert (Packed cell volume, HCT), Hämoglobin (HGB), Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (Mean corpuscular Hemoglobin Concentration, MCHC).

Das QBC-Vet Autoread Hämatologiesystem ist eine weiterentwickelte Version des QBC-Vet Hämatologiesystems (BROWN und BARSANTI, 1988; FISCHER et al., 1989; MEISTER et al., 1990). In Abb. 03 ist die Auftrennung der einzelnen Zellpopulation in einer Kapillare dargestellt.

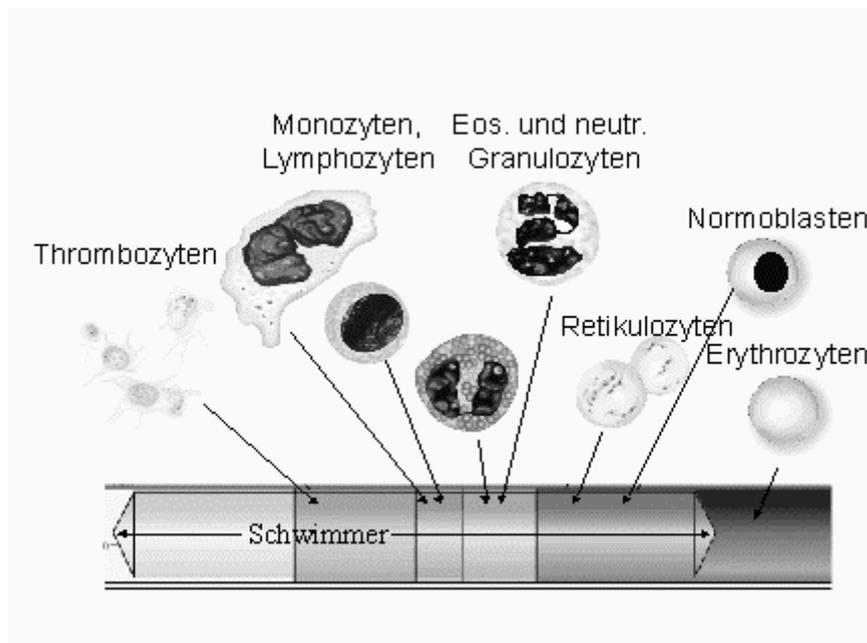


Abbildung 03: QBC[®]-Analyse Vet-AutoRead[®] Hämatologiesystem (Fa. IDEXX)

Nach Darstellung der einzelnen Analysemethoden, soll im Folgenden auf die relevanten Parameter der Blutzellzählung und -differenzierung und deren Interpretation eingegangen werden.

2.2.1.3 Parameter der Blutzellzählung

Die ausgewerteten Parameter der Blutzellzählung beinhalten in erster Linie die Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl, Erythrozyten- und Thrombozytenzählung, Ermittlung der Hämoglobinkonzentration und des mittleren korpuskulären Volumens (MCV) und in der neueren Generation der automatischen Zellcounter auch die Zählung der Retikulozyten. Aus den gemessenen Parametern wird rechnerisch der Hämatokritwert (HCT), der mittlere korpuskuläre Hämoglobingehalt (MCH) und die zelluläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) ermittelt.

Die Erythrozytenindizes werden anhand der folgenden Formeln berechnet:

$$MCV = \frac{HCT \times 10}{RBC} \quad MCH = \frac{HB \times 10}{RBC} \quad MCHC = \frac{Hb \times 100}{HCT}$$

Im hämatologischen Routinelabor wurden manuelle Methoden zur Blutzellzählung inzwischen durch die viel effektiver arbeitenden automatischen Systeme, die eine deutliche Kosten- und Zeitersparnis erbringen, verdrängt. Durch eine automatische Vorbereitung, Erkennung und Verarbeitung der Blutprobe werden mechanische Fehler und (subjektive) Interpretationsfehler vermieden (MANSBERG et al., 1974). Fehlermeldungen (Beflaggung) der Messergebnisse führen zu einer Auswahl von kritischen Proben, denen aufgrund der eingesparten Zeit mehr Aufmerksamkeit gewidmet werden kann. Zur Überprüfung dieser ausgewählten Proben dient jedoch nach wie vor die manuelle, visuelle Kontrolle. Kriterien zur Beurteilung des kleinen bzw. Differentialblutbildes werden in Kap. 2.2.1.5 näher erläutert. Im folgenden Abschnitt sollen zunächst die einzelnen Zellpopulationen besprochen werden.

Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten

Im humanmedizinischen Einsatz liefern sowohl nach Coulter-Prinzip (Widerstandsmessgeräte) als auch nach optoelektrische Messprinzip arbeitende Geräte (H*1) in der Regel gute Messergebnisse für **Leukozyten-** und **Erythrozytenzählung**. Eine gute Vergleichbarkeit der beiden Messmethoden ermitteln BOLLINGER et al. (1987), WENTZ et al. (1987) und KERSHAW (1987). Die Korrelationskoeffizienten lagen z.B. für die Leukozytenzählung bei $r \geq 0,99$. ROSS und BENTLEY (1986) verglichen in ihrer Studie den Technicon H*1 mit dem Technicon H*6000 und dem Coulter S Plus IV. Sie erhielten enge Korrelationen u.a.

für die Parameter WBC, RBC und PLT. Vergleichsstudien von CARLSON et al. (1986) ergaben ähnlich gute Ergebnisse für die Zellzählung.

STANWORTH et al. (1999) konnten in einer Vergleichsstudie des ADVIA 120 mit dem Coulter STKS für **Thrombozyten** bei gesunden Probanden innerhalb des Referenzbereiches einen guten Zusammenhang ermitteln ($r = 0,96$). Die für thrombozytopenische (nach Chemotherapie) Patienten erbrachten Korrelationen betragen $r = 0,97$. Deutlich problematischer stellte sich die Auswertung von sog. Thrombopathien, wie z.B. die Immunthrombozytopenischen Purpura (ITP) oder disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC), dar. Hier lagen die Korrelationen nur noch bei etwa $r = 0,80$. Die mit dem ADVIA 120 gemessenen Werte lagen signifikant höher als die der Impedanzmessung. Interferierende große Thrombozyten wurden beim Coulter STKS vermutlich nicht als solche erfasst (STANWORTH et al., 1999), während der ADVIA 120 Thrombozyten bis zu einer Größe von 60 fl analysieren und von Mikrozyten, Erythrozytenfragmenten und Zelldebris abgrenzen kann (KUNICKA et al., 1998). Möglich wird dies durch die in Kap. 3.1.3.1 beschriebene neue Zweidimensionale Thrombozytenanalyse. Vergleichsstudien mit dem Technicon H*3, einem vergleichbaren System ohne 2D-PLT Analyse (lediglich „Volumensignal“ des Niedrigwinkelstreulichts) ergaben schlechtere Korrelationen als der Vergleich mit der manuellen Zellzählung .

In der Tiermedizin untersuchten GREENE et al. (1985) verschiedene Tierarten mit dem Coulter Model ZBI/Channelyser und erhielten ein ähnliches Ergebnis und schlussfolgerten: Nach dem Widerstandsmessprinzip arbeitende Geräte können kleine Erythrozyten und Zelldebris aufgrund von elektronischen Interferenzen nicht einwandfrei von Thrombozyten trennen.

Für die **Erythrozytenindizes** MCV, MCH und MCHC werden recht unterschiedliche Korrelationen beim Vergleich der verschiedenen automatischen Zellzählgeräte ermittelt. In Abhängigkeit vom Messprinzip (MOHANDAS et al., 1986; WENZ et al., 1987) schwanken die Werte z.B. für das MCHC von $r = 0,345$ (H*6000) über $r = 0,455$ (KERSHAW et al., 1987) bis $r = 0,953$ (H*1) (ROSS und BENTLEY, 1986).

Werte für das MCV geben die Autoren CARLSON et al. (1986) mit $r = 0,61$ (H*1), ROSS und BENTLEY (1986) mit $r = 0,895$ (H*6000) und $r = 0,856$ (Coulter S Plus) an, während der H*1 hier beim MCV mit $r = 0,974$ korreliert.

Bei vergleichenden Untersuchungen mit humanmedizinischen Blutproben zwischen dem Hämatologiesystem ADVIA 120 (Bayer Diagnostics) und dem H*3 (Technicon) liegen die Korrelationskoeffizienten nach Herstellerangaben für die Blutzellzählung, außer für den CHCM (gemessenes MCHC, $r = 0,97$) bei $r > 0,99$. Das eingesetzte Vergleichsgerät, der H*1E, arbeitet nach dem gleichen Messprinzip.

Die Tabelle 01 zeigt Variations- und Korrelationskoeffizienten des ADVIA 120 für die entsprechenden Parameter im Vergleich.

Tabelle 01: Mit ADVIA 120 ermittelte Variations- und Korrelationkoeffizienten für Leukozyten, Erythrozyten, Erythrozytenindizes und Thrombozyten beim gesunden Menschen

Autor	Spezies	Parameter	CV %	r
Bayer Diagnostics (Herstellerangabe)	Mensch	WBC	2,7	0,997 ⁴
		RBC	1,0	0,997 ⁴
		MCV	0,4	0,994 ⁴
		MCH	0,2	0,990 ⁴
		CHCM*	0,5	0,974 ⁴
		PLT	2,7	0,991 ⁴

CV=Variationskoeffizient; r =Korrelationskoeffizient; ⁴Referenzgerät Technicon H*3;
*gemessener Wert des Einzelerythrozyten

In der nachfolgende Tabelle 02 sind Variations- und Korrelationskoeffizienten für die Parameter WBC, RBC und PLT von verschiedenen Untersuchern aufgeführt, die zeitgleich mit der hier vorgestellten Arbeit eine Evaluationsstudie für die Tierarten Hund, Katze, Rind, Schaf und Ziege erstellen.

Tabelle 02: Mit ADVIA 120 ermittelte Variations- und Korrelationkoeffizienten für Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten bei verschiedenen Spezies

Autor	Spezies	Parameter	CV %	r
FICKENSCHER (2001)	Hund	WBC	2,1	0,981 ³
		RBC	1,0	0,99 ³
		PLT	2,6	0,956 ³
MEYER (in Arbeit)	Katze	WBC	2,4	0,911 ³
		RBC	1,1	0,989 ³
		PLT	7,5	0,907 ³
HOLSTEG (2002)	Rind	WBC	4,0	0,997 ³
		RBC	2,4	0,974 ³
		PLT	4,7	0,963 ³
PÜSCH (2002)	Schaf	WBC	2,0	0,75 ³
		RBC	0,9	0,893 ³
		PLT	3,9	0,848 ³
	Ziege	WBC	2,4	0,855 ³
		RBC	1,2	0,895 ³
		PLT	5,3	0,878 ³

CV=Variationskoeffizient %; r=Korrelationskoeffizient; ³Vergleichsgerät Sysmex F-800

Die Untersucher ermittelten Variationkoeffizienten (CV) am ADVIA 120 für die Leukozyten- und Erythrozytenzählung bei Hund, Katze, Schaf und Ziege von $\leq 2,4$ %. Lediglich der WBC beim Rind liegt mit CV = 4,0% darüber. Die Werte für Thrombozytenzählung zeigen sich beim Hund mit CV = 2,6 % am niedrigsten und erreichen bei der Katze die höchste Variation mit 7,5 %. Die aus dem Methodenvergleich gewonnenen Korrelationen liegen für Hund, Katze und Rind für Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten z.T. deutlich über $r > 0,9$. Bei der gleichen Versuchsreihe korrelieren die Messergebnisse von PÜSCH (2002) jedoch deutlich schlechter. Vor allem der WBC zeigt mit $r = 0,75$ nur eine mäßige Übereinstimmung zum Vergleichsgerät Sysmex F-800.

Hämoglobinbestimmung

Die Bestimmung der **Hämoglobinkonzentration** mittels Photometrie reicht zurück bis in das Jahr 1878. Heute bedient man sich der durch die ICSH 1966 übernommenen und modifizierten Cyanmethämoglobinmethode unter Verwendung der sog. Drabkin Lösung (alkalischer Kaliumferrizyanidlösung). Nach Lyse der Erythrozyten erfolgt eine Freisetzung des Hämoglobins. Fe-zyanid oxidiert das im Häm enthaltene Fe^{2+} zu Fe^{3+} . An das entstehende Methämoglobin bindet Zyanid. Es entsteht sog. Zyanmethämoglobin, welches photometrisch (bei einer Wellenlänge von 546 nm) bestimmt werden kann (ZELMANOVIC et al., 1992a).

Tabellen 03 zeigt eine Übersicht der Variations- und Korrelationskoeffizienten für die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration. Die dargestellten Werte wurden im Rahmen der Evaluation des Technicon H*1 für verschiedene Tierarten ermittelt. Als Vergleichsgerät diente der Sysmex F-800.

Tabelle 03: Variations- und Korrelationkoeffizienten für die Hämoglobinkonzentration H*1/Sysmex F-800 bei verschiedenen Spezies

Autor	Spezies	CV %	r
ZIEGLER (1997)	Hund	0,7	0,994 ³
SUCHFORT (1998)	Katze	1,0	0,987 ³
SEEGERS (1997)	Pferd	0,8	0,979 ³
GROMMELT (1999)	Rind	1,0	0,962 ³
BEDDIES (1999)	Schaf	0,7	0,957 ³

CV=Variationskoeffizient %;

r=Korrelationskoeffizient;

³Vergleichsgerät Sysmex F-800

Die in Tabelle 04 dargestellten Variations- und Korrelationskoeffizienten für die Hämoglobinkonzentration entstammen der zeitgleichen Studie für die Tierarten Hund, Katze, Rind, Schaf und Ziege am ADVIA 120.

Tabelle 04: Variations- und Korrelationkoeffizienten für die Hämoglobinkonzentration ADVIA 120/ Sysmex F-800 bei verschiedenen Spezies

Autor	Spezies	CV %	r
FICKENSCHER (2001)	Hund	0,8	0,995 ³
MEYER (in Arbeit)	Katze	1,0	0,991 ³
HOLSTEG (2002)	Rind	1,5	0,995 ³
PÜSCH (2002)	Schaf	4,5	0,958 ³
	Ziege	9,9	0,986 ³

CV=Variationskoeffizient %;

r=Korrelationskoeffizient;

³Vergleichsgerät Sysmex F-800

Alle ermittelten Korrelationen für Hämoglobinkonzentration der sechs oben in Tab. 03 und 04 dargestellten Tierarten liegen bei $r = \geq 0,957$. Die Wiederholbarkeit der Messergebnisse mittels Präzision ergeben einen $CV \leq 1,0\%$ beim H*1 für die Tierarten Hund, Katze, Pferd, Rind und Schaf, beim ADVIA 120 für die Tierarten Hund und Katze. HOLSTEG (2002) ermittelt mit dem ADVIA 120 beim Rind einen CV von 1,5%, während die bei PÜSCH (2002) festgestellten Präzisionswerte für Schaf und Ziege mit $CV = 4,5\%$ bzw. $CV = 9,9\%$ deutlich höhere Schwankungen aufwiesen.

Hämatokritwert

Das Prinzip der **Hämatokritwert**bestimmung beruht auf der Zentrifugation in Mikrohämatokritröhrchen und Ablesen des prozentualen Anteils der korpuskulären Bestandteile des Probenvolumens. Nach der internationalen Standardmethode des Zellpackvolumens nach DIN 58933-1 werden spezielle, unbeschichtete Kapillarröhrchen zu ca. 80% mit Blut gefüllt, am Ende verschlossen und mit dem verschlossenen Ende in zentrifugaler Richtung in die vorgesehene Halterung eingelegt. Bis heute liefert diese Methode den sog. „Golden Standard“ zur Evaluierung von modernen automatischen Blutanalytoren.

Tabelle 05: Variations- und Korrelationskoeffizienten für den Hämatokritwert ADVIA 120/ H*1 bzw. Sysmex F-800 und Mikrohämatokritzentrifuge bei verschiedenen Spezies

Autor	Spezies	CV %	r
FICKENSCHER (2001)	Hund	1,2	0,997 ⁴
			0,988 ³
			0,991 ²
MEYER (in Arbeit)	Katze	1,3	0,992 ⁴
			0,963 ³
			0,990 ²
HOLSTEG (2002)	Rind	2,1	0,995 ⁴
			0,946 ³
			0,975 ²
PÜSCH (2002)	Schaf	1,2	0,972 ⁴
			0,844 ³
			0,970 ²
	Ziege	1,7	0,663 ⁴
			0,860 ³
			0,945 ²

CV=Variationskoeffizient;
³Vergleichsgerät Sysmex F-800

r=Korrelationskoeffizient;
⁴Vergleichsgerät H*1

² Vergleichsgerät Zentrifuge

Retikulozyten

Die Zahl der Retikulozyten wird konventionell im supravital mit Brillantkresylblau-Lösung gefärbten Blutaussstrich relativ zur Erythrozytenzahl bestimmt. Da diese herkömmliche Methode als aufwendig und ungenau gilt, werden seit Jahren neuere alternative Verfahren avisiert. KOEPKE (1988) und SAVAGE et al. (1985) fordern eine Norm für die herkömmlichen Verfahren mit einer Automatisierung der Zählung, während eine größere Anzahl von Autoren die automatisierte Retikulozytenzählung

unter Einsatz von Durchflussverfahren befürworten. Prinzipielle Schwierigkeiten der sicheren Abgrenzung der Retikulozyten- von der Erythrozytenpopulation scheinen hier weitgehend überwunden (EDER, 1988; FERGUSON et al., 1990; DAVIES et al., 1997).

Zu der neuen Generation von automatischen Hämatologiesystemen, die in der Lage sind ein „rotes Differentialblutbild“ zu ermitteln, gehört der in dieser Arbeit evaluierte **ADVIA 120**. Entsprechende Ergebnisse von Vorläufermodellen der Reihe der H*Systeme und retikulozytentauglicher Impedanzsysteme werden im Folgenden erläutert.

BRUGNARA et al. (1994) evaluiert in einer Vergleichstudie den H*3 der Firma Technicon beim Menschen. Zum Einsatz kamen neben der manuellen Zählung, das Durchflusszytometer FACSCAN der Firma Becton Dickinson und der Sysmex R 3000. Für die Retikulozytenzählung der automatischen Analyse erhielten sie eine sehr gute Vergleichbarkeit von $r \geq 0,92$. Unbefriedigend waren dagegen die Korrelationen zwischen automatisierter und manueller Zählung mit $r = 0,538 - 0,755$. Die Präzision (within batch) lag bei 9,7 %.

Ein Vergleich der absoluten Retikulozytenzahlen von ADVIA 120 mit dem Sysmex R 3000 fiel mit $r = 0,82$ schlechter aus als die der relativen Zählung ($r = 0,91$), während die Korrelationen zum H*3 mit vergleichbarer Messtechnik deutlich enger beieinander lagen (BRUGNARA et al., 1997). Die ermittelte Präzision für den ADVIA 120 lag bei $CV = 7,7\%$.

Die Retikulozytenzählung und Reifegradverteilung untersuchten FUCHS und EDER (1991) u.a. beim **Schwein** unter Verwendung des Sysmex R 1000. Hierbei konnten die genannten Parameter nach Angaben der Autoren problemlos bestimmt werden. Die Bestimmung von Reifegrad und Verteilungsquotient erfolgt objektiver als bei manueller Bestimmung und bietet durch die bessere Auflösung eine gute Grundlage zur Beurteilung der erythropoetischen Aktivität. Schwierigkeiten sehen die Autoren speziell bei den Hauswiederkäuern mit relativ geringen Retikulozytenzahlen und bei der Katze.

In der folgenden Tabelle 06 sind speziesspezifische Unterschiede für die Retikulozytenzählung aufgezeigt.

Tabelle 06: Mit unterschiedlichen Geräten ermittelte Variations- und Korrelationskoeffizienten für die Retikulozytenzählung in % bei gesunden und kranken Probanden verschiedener Spezies

Autor	Gerät	Spezies	CV %	r
BRUGNARA (1994)	Technicon H*3	Mensch	9,7	0,952*
BRUGNARA (1997)	ADVIA 120	Mensch	7,7	0,91*
FICKENSCHER (2001)	ADVIA 120	Hund (n=46)	8,7	0,92 ^R
MEYER (in Arbeit)	ADVIA 120	Katze (n=61)	23,2	0,697 ^R
PÜSCH (2002)	ADVIA 120	Ziege (n=172)	24,8	0,917 ^R

CV=Variationskoeffizient;

r=Korrelationskoeffizient;

*Sysmex R 3000

^R Patienten mit Retikulozytose bei manueller Zählung

2.2.1.4 Parameter der Blutzellendifferenzierung

Zu den ausgewerteten Parametern der automatischen Blutzellendifferenzierung gehören die folgenden fünf Leukozytenpopulationen: Neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, Eosinophile Granulozyten und Basophile Granulozyten. Die Vorteile gegenüber der manuellen Differenzierung zeigt MANSBERG et al. (1974) mit seinen Zielvorstellungen für Geräte zur automatischen Differenzierung von Leukozyten. Eine Anpassung der Geräte an die einzelnen Tierarten erweist sich gerade bei der Differenzierung als sehr sinnvoll, um die gesamten Fähigkeiten der für die Humanmedizin konzipierten Geräte auszuschöpfen.

Schwierigkeiten entstehen in diesem Zusammenhang bei der Bewertung von automatischen Leukozytendifferenzierungsgeräten, da es keine praktikablen Alternativen zur manuellen Differenzierung mit ihren bekannten Fehlerquellen gibt (KRAUSE, 1990). Die manuelle Leukozytendifferenzierung mittels Blutaussstrich ist

heute noch in vielen Laboratorien Vergleichsmethode der Wahl für die Evaluation von Hämatologiesystemen (ZELMANOVIC et al., 1992b).

Als Routinemethode in fast jedem Labor angewandt, birgt sie jedoch eine Reihe von Fehlerquellen, die bereits BARNETT (1933) bei seinen Untersuchungen erfasste. Ursachen für diese ungenaue und unspezifische Technik (PIERRE, 1985) sind zum einen mechanische oder Handhabungsfehler, wie zum Beispiel fehlerhaftes Ausstreichen auf dem Objektträger oder die Wahl des Antikoagulanzen und zum anderen Interpretationsfehler (BARNETT, 1933). Diese sind durch die subjektive Beurteilung des Untersuchers bedingt (BACCUS, 1973).

Hauptfehlerquelle stellt bei einer Differenzierung von 100 Leukozyten der statistische oder Zufallsfehler dar (BACCUS, 1973). Dieser nimmt nach RÜMKE (1960 und 1977) mit einer Erhöhung der Anzahl der differenzierten Zellen ab. Bei 400 statt 100 ausgezählten Zellen, verdoppelt sich die Präzision. Wertet man 10.000 Zellen aus, erreicht man eine Verbesserung der Präzision um das 10fache. Das von RÜMKE (1985) und THOMAS et al. (1989) erstellte 95%-Konfidenzintervall gibt Auskunft über die statistische Genauigkeit einer Untersuchungsmethode zur Erfassung des wahren Zahlenwertes einer Leukozytenpopulation.

Präzisionsangaben aus der Literatur zur manuellen Leukozytendifferenzierung ergeben große Schwankungen der Variationskoeffizienten. Für Humanblut ermitteln THOMAS et al. (1989) Werte zwischen 10% (Neutrophile Granulozyten) und 48 % (Basophile Granulozyten) für die verschiedenen Zellpopulationen bei 500 ausgezählten Zellen, während BUTTARELLO et al. (1992) mit 200 differenzierten Leukozyten eine Variationsbreite von 5,5% (Neutr. Gr.) bis 96,3% (Basoph. Gr.) erhalten.

In der nachfolgenden Tabelle 07 werden entsprechende Variation- und Korrelationskoeffizienten von mehreren Untersuchern für verschiedene Spezies dargestellt. Die vergleichende Methode ist dem Tabellenindex zu entnehmen.

Tabelle 07: Mit dem H*1 ermittelte Variations- und Korrelationskoeffizienten für die relativen Zahlen von Neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten bei verschiedenen Spezies

Leukozytenart	Autor	Spezies	CV %	r
Neutrophile G.	BUTARELLO et al. (1992)	Mensch	≤ 1,57	0,974 ¹
		Rind	-	0,94 ²
	TVEDTEN und KORCAL (1996)	Katze	-	0,87 ²
		ZIEGLER (1997)	Hund	3,3
	SUCHFORT (1998)	Katze	2,4	0,901 ³
	GROMMELT (1999)	Rind	4,8	0,945 ³
	BEDDIES (1999)	Schaf	4,3	0,949 ³
Lymphozyten	BUTARELLO et al. (1992)	Mensch	≤ 2,45	0,955 ¹
		Rind	-	0,88 ²
	TVEDTEN und KORCAL (1996)	Katze	-	0,83 ²
		ZIEGLER (1997)	Hund	10,4
	SUCHFORT (1998)	Katze	6,9	0,866 ³
	GROMMELT (1999)	Rind	3,5	0,943 ³
	BEDDIES (1999)	Schaf	3,5	0,939 ³
Monozyten	BUTARELLO et al. (1992)	Mensch	≤ 9,41	0,717 ¹
		Rind	-	0,19 ²
	TVEDTEN und KORCAL (1996)	Katze	-	0,34 ²
		ZIEGLER (1997)	Hund	25,9
	SUCHFORT (1998)	Katze	-	0,243
	GROMMELT (1999)	Rind	-	0,244
	BEDDIES (1999)	Schaf	-	0,234

CV = Variationskoeffizient %
²manuelles Diff 100 Zellen

r = Korrelationskoeffizient
¹manuelles Diff 800 Zellen
³Panoptische Färbung Diff 200 Zellen

Fortsetzung Tabelle 7

Leukozytenart	Autor	Spezies	CV %	r
Eosinophile G.	BUTARELLO et al. (1992)	Mensch	≤ 9,40	0,948 ¹
	TVEDTEN und KORCAL (1996)	Rind	-	0,85 ²
		Katze	-	0,15 ²
	ZIEGLER (1997)	Hund	14,9	0,821 ³
	SUCHFORT (1998)	Katze	-	0,190
	GROMMELT (1999)	Rind	-	0,92
	BEDDIES (1999)	Schaf	-	0,882
Basophile G.	BUTARELLO et al. (1992)	Mensch	≤ 17,56	0,532 ¹
	TVEDTEN und KORCAL (1996)	Rind	-	0,96 ²
		Katze	-	0,08 ²
	ZIEGLER (1997)	Hund	129,4	-
	SUCHFORT (1998)	Katze	-	-
	GROMMELT (1999)	Rind	-	-
	BEDDIES (1999)	Schaf	-	0,441

CV = Variationskoeffizient in % r = Korrelationskoeffizient ¹manuelles Diff 800 Zellen
²manuelles Diff 100 Zellen ³Panoptische Färbung Diff 200 Zellen

Maßgeblichen Einfluss auf die Präzision der Leukozytendifferenzierung hat außerdem der prozentuale Anteil der einzelnen Zellpopulationen (BENTLEY, 1993). Für in niedriger Anzahl vorkommende Zellen müssten dementsprechend mehr Zellen ausgezählt werden. Dies bedeutet, dass für Monozyten, Eosinophile Granulozyten 1000 Zellen und Basophile Granulozyten sogar 10000 Zellen gezählt werden müssten, damit eine vergleichbare Präzision wie für die Hauptleukozytenpopulationen Neutrophile Granulozyten und Lymphozyten ermittelt werden kann (ORNSTEIN et al., 1976).

Vorteile der manuellen Beurteilung von Blutausstrichen liegen eindeutig in der Erkennung von Veränderung der Leukozytenmorphologie (Vakuolen, toxische Granulation, Döhle-Körperchen), der Erythrozytenmorphologie (Mikro-, Makrozytose,

Hyper-, Hypochromasie, Geldrollenbildung, Howell-Jolly-Bodies) (JAIN, 1993) und der Thrombozytenmorphologie.

Bei Beflagung von abnormen und nicht identifizierbaren Zellpopulationen, ist dementsprechend eine subjektive Beurteilung erwünscht. Über Kriterien für die Nachkontrolle des kleinen und des Differenzialblutbildes gibt der nachfolgende Abschnitt Auskunft.

2.2.1.5 Störende Einflüsse auf die automatisierte Blutzellanalyse

2.2.1.5.1 Einflüsse auf die Blutzellzählung

Zeigt eine Blutprobe eine starke pathologische Veränderung, kann dies einen erheblichen Einfluss für bestimmte Parameter bei der Erstellung eines automatisierten Blutbildes haben. Kriterien für die Nachkontrolle des kleinen Blutbildes sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt (KATZ und LENZ, 1986):

Tabelle 08: Grenzwerte der Blutparameter Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, MCV und MCH und ihre Ursachen beim Menschen (entnommen aus „Kriterien für die Nachkontrolle des kleinen Blutbildes“ (KATZ und LENZ, 1986))

Parameter	Minimum	Ursache	Maximum	Ursache
Leukozyten	< 2,0 ($10^9/l$)	Leukopenie	> 40 ($10^9/l$)	Leukozytose Thrombozyten- aggregate
Erythrozyten	< 2,5 ($10^{12}/l$)	Anämie Agglutination Hämolyse	> 6,5 ($10^{12}/l$)	Polyzythämie
Thrombozyten	< 30 ($10^9/l$)	Thrombopenie Thrombozyten- -aggregation abnorme Thrombozyten- -größe	> 650 ($10^9/l$)	Thrombozytose Mikrozytose Leukozyten- trümmer (nach Cytostatika)
MCV	< 75 fl	Mikrozytose	> 105 fl	Leukozytose Agglutination
MCH	< 26 pg	Mikrozytose Anämie	> 36 pg	Lipämie Leukozytose Hämolyse Agglutination

Liegen die ermittelten Parametergrößen unter oder über den angegebenen Werten, sollten zur Verifizierung, ob tatsächlich eine pathologische Veränderung oder eine Fehlmessung (z.B. Thrombozytenzahl bei Agglutinaten) vorliegt, die Blutbilder entsprechend überprüft werden. Moderne Hämatologiesysteme (z.B. H*1 und ADVIA 120) verwenden entsprechende Warnsignale (sog. Flags) zur Erkennung von solchen elektronischen Fehlbestimmungen (KATZ und LENZ, 1986), so dass bei Beachtung und genauer Nachkontrolle, Falschmessungen bezüglich des kleinen Blutbildes nahezu vollständig zu vermeiden sind.

2.2.1.5.2 Einflüsse auf die Blutzelldifferenzierung

Bei der automatisierten Erstellung des Differentialblutbildes stellt die morphologische Vielfalt der Leukozytenpopulationen zwischen einzelnen Tierarten, aber auch innerhalb einer Spezies, höchste Anforderungen an Automat und Untersucher. Geräte mit optoelektrischem Messprinzip und zytochemischer Differenzierung (H*1, ADVIA 120) geben beim Vorliegen von sog. atypischen Zellen entsprechende Warnsignale für die sog. LUC (Large unstained cells) und eine zu hohe Peroxidaseaktivität (HPX-Signal) an. Da sich hinter dem LUC-Signal Blasten, Plasmazellen, atypische Lymphozyten, aber auch eine abnorme Peroxidaseaktivität normaler Zellen verbergen können, sollte die graphische Ausgabe eines Leukogramms den Untersucher bei entsprechenden Unklarheiten zu einer morphologischen Kontrolle veranlassen. (KATZ und LENZ, 1986)

Die von KATZ und LENZ (1986) postulierten Kriterien zur Nachkontrolle des humanen Differentialblutbildes sind in der folgenden Tabelle 09 angegeben.

Tabelle 09: Grenzwerte der Blutparameter des Differentialblutbildes beim Menschen (entnommen aus „Kriterien für die Nachkontrolle des kleinen Blutbildes“ (KATZ und LENZ, 1986))

Parameter/Signal	Maximum
Neutrophile Granulozyten	> 85 %
Lymphozyten	> 65 %
Eosinophile Granulozyten	> 10 %
Monozyten	> 20 %
LUC	> 1,5 %
HPX	> 1,2 %

Neben dem oben Beschriebenen, sollte der Hinweis oder Verdacht auf abnormale Zellmorphologie (bei H*1 und ADVIA 120 ebenfalls durch Flags angezeigt) der Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten, sowie Unregelmäßigkeiten des Leukogramms bei zytochemischer Differenzierung ein weiteres Kriterium für die visuelle Nachkontrolle der Blutbilder sein. In der nachfolgenden Tabelle sind beispielhaft einige Abnormalitäten der einzelnen Zellpopulationen aufgeführt.

Tabelle 10: Morphologische Veränderungen der Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten des Menschen (KATZ und LENZ, 1986))

Parameter/Signal	Veränderung
Leukozyten	Kernanomalie, Granulationsanomalie, toxische Veränderungen, Hypersegmentierung
Erythrozyten	Anisozytose, Poikilozytose, Sphärozytose, Sichelzellen, Einschlusskörperchen, Aggregation, Geldrollenbildung
Thrombozyten	Aggregation, Makro- und Mikrothrombozyten

Die graphische Ergebnisdarstellung für die Hämatologiesysteme H*1 und ADVIA 120 wird im Kapitel 3.1.3 gezeigt. Hieraus ist auch die Auflistung der morphologischen Signale zu entnehmen. Einzelne ausgewählte Beispiele kritischer Proben aus dem untersuchten Patientengut werden im Rahmen der Diskussion dargestellt.

Die Anwendung der automatisierten Blutbildanalytik leistet in der heutigen Zeit einen großen Beitrag zur kostengünstigeren, schnelleren Diagnose und stellt gleichzeitig einen unverzichtbaren Beitrag zur Qualitätssicherung dar.

2.2.2 Evaluation von Hämatologiesystemen

Unterschiedliche Laborstandards ließen den Ruf nach Standardisierung in der Hämatologie immer lauter werden (KOEPEKE und ROSS, 1985). Entsprechende Richtlinien zur wissenschaftlichen Standardisierung, die Planung und Durchführung von Evaluationen automatisierter Analysesysteme sollen im folgenden Abschnitt besprochen werden.

2.2.2.1 Qualitätssicherung

Die Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien hat mittlerweile eine lange Geschichte. Erste Veröffentlichungen von Richtlinien der Bundesärztekammer über Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien reichen zurück in das Jahr 1971 (REINAUER und H., 1988). Die amerikanische Initiative im Bereich der Zytometrie stellte das „National Committee for clinical Laboratory Standards (NCCLS)“ dar. Es handelt sich hier um eine Expertenkommission aus Wissenschaft, Verwaltung und Industrie, die aufgrund ihrer fundierten Kenntnisse Standards und entsprechende Richtlinien erstellen (KOEPEKE, 1988).

2.2.2.2 Standardisierung der Evaluation von Zellzähl- und Zelldifferenzierungsgeräten

Parallel zu den oben genannten Komitees bestand das „International Committee for Standardization in Haematology“ (ICSH) bereits seit 1963. Ziel dieser Organisation sollte es sein, die Präzision und Richtigkeit von Laborergebnissen und die Vergleichbarkeit von wissenschaftlichen Untersuchungen zwischen verschiedenen Untersuchungslaboratorien zu gewährleisten. Ausarbeitungen zur Vereinheitlichung von Methoden und Standards und die Funktion als Diskussionsforum sollen grundlegend zur Qualitätssicherung beitragen. Sie beinhalten:

1. Standardisierung des Materials
2. Standardisierung der Methode
3. Ringversuche
4. Organisation von Qualitätssicherungsprogrammen

Eine erste Empfehlung zur Standardisierung der Evaluation von Hämatologiegeräten erscheint im Jahr 1978. Sie wird nach entsprechenden Ringversuchen von SHINTON et al. (1982) und dem ICSH (1994) als Richtlinie bzw. Protokoll für die Evaluation von automatischen Blutzellzählgeräten herausgegeben. SHIBATA et al. (ICSH) befassen sich 1985 mit der Frage der Standardisierung der zytochemischen Methoden für die Zelldifferenzierung. In einer Novellierung des 1984er Protokolls wird 1994 noch zusätzlich die Retikulozytenzählung berücksichtigt.

In einem Evaluationsprotokoll sollte, neben einer **Einleitung** mit Angaben über Gerät und Technik, die **Planung der Durchführung** der Geräteanpassung festgelegt sein. Grundlegende Voraussetzung für **Betriebssicherheit** während der Evaluation und entsprechende Einweisung des Laborpersonals werden gefordert. Der für die Beurteilung des Gerätes wohl wichtigste Abschnitt, die **technische Bewertung**, beinhaltet die Untersuchungsschritte zu *Verdünnungseffekt (linearity)*, *Verschleppung (carry-over)*, *Präzision (precision)*, *Vergleichbarkeit*, *Richtigkeit (accuracy)* und *Probenalterung*. Dies mündet dann in der **Beurteilung** der Leistungsfähigkeit, Effektivität und Rentabilität und letztlich der Einsetzbarkeit des untersuchten Gerätes.

Die im Vorfeld der Untersuchungen erfolgte **Kalibration** zur entsprechenden Justierung des Gerätes erfordert geeignete Referenzmethoden mit der die Richtigkeit der Messung beurteilt werden kann.

International und national anerkannte Referenzmethoden, empfohlene Methoden und Kontrollmaterialien für die Blutzellzählung und -differenzierung finden sich bei ICSH (1994) und von RÜCKER et al. (1994); ebenfalls dargestellt bei BEDDIES (1999).

Als Kalibrationsmaterial wird, außer für Hämoglobin (hier liegt entsprechendes Standardmaterial vor) humanes Frischblut eingesetzt. Im Anschluss an die Kalibration s.o. kommt für die tägliche Routine entsprechendes **Kontrollmaterial** vor Arbeitsbeginn und bei unklaren Messergebnissen zum Einsatz. Kontrollblutmessungen dienen zur Überprüfung der Messergebnisse. **Reagentien** sind in der Regel vom Hersteller zu beziehen und werden entsprechend der Herstellerangaben eingesetzt. Die für die Evaluation verwendeten **Blutproben** sollen frisch sein. Per definitionem muss eine Frischblutprobe hierfür nicht später als 4 Stunden nach Entnahme verarbeitet sein.

Nicht festgelegt sind klare Kriterien zur Vergleichbarkeit der einzelnen Evaluationen. Bei Festlegung einer Referenzmethode sollte auch bestimmt werden, bei welchen

Korrelationskoeffizienten ein Vergleich als sehr gut, als gut und als akzeptabel bezeichnet werden kann. PASTOR et al. (1998) geben für die Beurteilung des Sysmex F-800 in Tabelle 11 dargestellte Kriterien an.

Tabelle 11: Beurteilungskriterien für Korrelationskoeffizienten

$\geq 0,9$	Sehr gute Korrelation
$\geq 0,8$	Gute Korrelation
$\geq 0,7$	Akzeptable Korrelation

modifiziert nach PASTOR et al. (1998)

2.2.3 Einsatz von Hämatologiesystemen bei Pferd und Schwein

Zur automatischen Durchführung der Blutzellzählung und -differenzierung bei Pferd und Schwein ist es notwendig die für die Humanmedizin entwickelten Hämatologiesysteme tierartspezifisch anzupassen. Um eine korrekte Interpretation der Untersuchungsergebnisse zu gewährleisten, muss die klinische Verwendbarkeit der Systeme für jede Spezies überprüft werden. (SPANGFORS et al., 1990; LAVIN et al., 1991; PASTOR et al., 1998)

Im Folgenden sind die Autoren chronologisch aufgeführt, die bei den Tierarten Pferd und Schwein Untersuchungen durchgeführt bzw. entsprechende Geräte verglichen haben. Während für die Tierart Pferd zahlreiche Geräte bereits evaluiert worden sind, liegen im Vergleich hierzu für die automatisierte Blutzellzählung beim Schwein nur wenige Untersuchungen vor. Daher wird für das Pferd nur Literatur ab dem Jahr 1985 berücksichtigt, während beim Schwein auch ältere Literaturstellen zitiert werden.

2.2.3.1 Impedanzmethode bei den Tierarten Pferd und Schwein

2.2.3.1.1 Blutzellzählung

Bei Betrachtung der von den verschiedenen Autoren untersuchten Geräte und Parameter fällt auf, dass Methoden und die Anzahl der verarbeiteten Blutproben stark variieren. Einige Untersucher beschränken sich auf die Evaluierung eines ausgewählten Parameters z.B. Thrombozyten (GREENE, 1985), andere beschreiben mehrere Parameter, jedoch zum Teil mit einer geringen Probenanzahl z.B. SPÄTH und WEBER (1992) mit $n = 12$ pro Tierart.

Bereits 1963 untersuchten WISECUP und CROUCH den Coulter Counter A an 12 verschiedenen Tierarten u.a. beim Duroc-**Schwein**. Die entsprechenden Schwellenwerte wurden visuell mit Hilfe des Oszilloskops geändert. Auf diese Weise erreichten sie eine brauchbare Adaptation der Erythrozytenzählung für die verschiedenen Tierarten im Vergleich zur Hämozytometerzählung. Nach Aufbereitung der heparinisierten Blutprobe, entsprechender Verdünnung, Schwellenwertkorrektur für die einzelnen Tierarten, entsprechender Zellyse (in modifiziertem Coulter Saponin) wurden nach Abzug der Backgroundcounts (3 Vorläufe zur Ermittlung des Mittelwertes von Verunreinigungen) der "wahre" Zählwert ermittelt. Vergleichsmessungen zweier Geräte zeigen gute Ergebnisse für diese Standardeinstellung.

Die Verwendbarkeit des Coulter Counter Modell D für die Zählung von Erythrozyten und Leukozyten beim **Schwein** überprüfte MÜLLER-PRASUHN (1971) anhand von 34 Schweineblutproben. Die automatisierte Zählung liefert im Vergleich zur Kammerzählung bei der Erythrozytenzählung im Mittel um 3,6% höhere Werte, der Unterschied der beiden Methoden ist für Erythrozyten hochsignifikant. Die Leukozytenzählung ergab nur geringe Mittelwertabweichung, der Unterschied im Vergleich zur Zählkammer war nicht signifikant. Nach Angabe der Autoren liefert die automatisierte Methode im Gegensatz zur Kammerzählung für die Erythrozyten (Entmischungseffekt bei Kammerfüllung) genauere Ergebnisse.

GRENN et al. (1976) untersuchten den Einfluss der Blutalterung durch den Transport in das Labor für verschiedene Blutparameter mit dem Coulter Model ZF unter anderem auch bei **Pferd** und **Schwein** ($n = 12$). Im Ergebnis erhielten sie deutliche

speziesabhängige Veränderungen für die untersuchten Parameter (WBC, RBC, HGB, HCT). Sie stellen vor allem einen signifikanten Anstieg des Hämatokrits für alle untersuchten Tierarten heraus.

In einer Studie zur alters- und geschlechtsabhängigen Veränderungen der hämatologischen Parameter von jeweils 60 weiblichen und männlichen **Sinclair-Miniaturschweinen**, verwendet BURKS (1977) den Coulter Model B.

GREENE et. al. (1985) untersuchten die elektronische Thrombozytenzählung mit dem Coulter Counter Model ZBI u.a. bei jeweils 20 gesunden und kranken **Pferden** und **Schweinen**. Sie erhielten gegenüber der manuellen Zählung Korrelationskoeffizienten von $r = 0,936$ beim Pferd und $r = 0,985$ beim Schwein. Der CV (Variationskoeffizient) lag mit automatischer Zählung bei 3,6% (Pferd), 4,1% (Schwein) und visuell bei 7,7% (Pferd) und 6,8% (Schwein).

Im Rahmen von Untersuchungen zu hämatologischen Werten des Yucatan Miniatur **Schweines** ($n=30$) bescheinigten RADIN et al. (1986) dem Coulter Counter Model S eine insgesamt gute Brauchbarkeit für die Erfassung der Zellzählung und der Erythrozytenindizes.

WEISER (1987) ermittelte bei der Untersuchung von 100 **Pferde**blutproben mit dem Coulter Counter Model S 550 die Parameter WBC, HGB, RBC, MCV und den berechneten HCT. Durch entsprechende Modifikation (Schwellenwerterniedrigung) des Gerätes konnten kleine Erythrozyten bis 35 fl gemessen werden. Auf diese Weise wurden für die untersuchten Parameter die nachfolgend aufgezählten, guten bis sehr guten Korrelationen zu den Referenzmethoden erreicht: WBC: $r = 0,977$; MCV: $r = 0,875$; RBC: $r = 0,995$; HCT: $r = 0,990$.

TVEDTEN und WILKINS (1988) untersuchten in einer Studie den Coulter S-Plus IV, Ortho ELT-8/DS, Ortho ELT-8/WS, Technicon H-1 und den Sysmex E-5000 für verschiedene Tierarten. **Pferde**blut wurde an drei der genannten Geräte gemessen (Coulter S-Plus IV, Ortho ELT-8/Ds und Technicon H*1). Die Anzahl der untersuchten Proben lag zwischen $n = 6$ und $n = 10$. Im Ergebniss lagen die Korrelationen gegenüber dem Referenzgerät Coulter Model S-Senior für die Parameter WBC, RBC, HGB, HCT und MCV um $r = 0,99$.

SPÄTH und WEBER (1992) überprüften das vollautomatische Hämatologiesystem Celltrak 11 für die Blutzellzählung bei 9 Tierarten. Die Untersuchung an je 12 **Pferden** und **Schweinen** wurden nach Einstellung von speziesspezifischen Schwellenwerten für die einzelnen Zellpopulationen durchgeführt. Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse für die Parameter WBC, RBC, HGB und HCT sind für die beiden Tierarten in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Mit dem Celltrak 11 ermittelte Korrelationskoeffizienten bei Pferd und Schwein

Parameter	Korrelationskoeffizient r	
	Pferd (n = 12)	Schwein (n = 12)
WBC 10 ⁹ /l	0,956*	0,942*
RBC 10 ¹² /l	0,96*	0,943*
HGB mmol/l	0,995**	0,977**
HCT l/l	0,97***	0,91***

Vergleichsmethode: *visuelle Zählung in Neubauer-Zählkammer, **HB-bestimmung nach DAB 7, ***Mikrohämatokritzentrifuge

BIENZLE et al. (1994) untersuchte u.a. 24 **Pferde**blutproben ebenfalls mit dem Coulter S-Plus IV. Als Vergleichsgerät diente der Baker 9000. Eine Aussage über die Präzision der Geräte für die einzelnen Tierarten kann nicht gemacht werden, da die Daten von vier Tierarten gepoolt wurden. Die Korrelation zwischen beiden Hämatologiesystemen lagen mit Ausnahme des MCHC für alle untersuchten Parameter (WBC, RBC, HGB, HCT, MCH, MCV, MCHC und PLT) über $r = 0,95$. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass die Korrelationsanalyse aus den gemittelten Doppelbestimmungen ermittelt wurden. Bei allen vier untersuchten Tierarten lagen die Werte für die Hämoglobinkonzentrationen im Mittel beim Coulter S-Plus IV höher als beim Baker 9000. Der hohe Variationskoeffizient beim berechneten MCHC begründet sich möglicherweise in der niedrigeren Schwellenwerteinstellung für die Erythrozytengröße. Abweichungen von bis zu 30 fl wurden bei den Tierarten Katze, Pferd und Rind festgestellt.

Nach MOHR (1995) lagen bei einer Evaluierung des Sysmex E-2500 (Impedanzmessprinzip) für die Zählung equiner Leukozyten die ermittelten

Korrelationen gegenüber der Kammerzählung bei $r = 0,70$ und für die Erythrozytenzählung bei $r = 0,328$ und damit auffallend unter den bisher für Impedanzgeräte ermittelten Werten. Da die Übereinstimmung für die Tierarten Hund (WBC $r = 0,89$; RBC $r = 0,88$) und Katze (WBC $r = 0,89$; RBC $r = 0,75$) deutlich höher ausfielen, konnte für die Erythrozytenzählung beim **Pferd** mit der gewählten Kalibrierung und Schwellenwerteinstellung kein akzeptables Ergebnis erzielt werden.

MÄDE und WUJANZ (1997) verwendeten für ihre Analysen zum roten Blutbild von 147 **Muttersauen** der Kreuzung Deutsches Landschwein x Edelschwein x Leicoma den AL Zellcounter Modell 871 (Firma AL Karlsruhe). Zur Erythrozytenzählung erwies sich das Gerät als sicher und gut einsetzbar, ebenso für die Ermittlung der Hämoglobinkonzentration. Die automatisch bestimmten Hämatokritwerte lagen niedriger als die durch Ultrazentrifugation ermittelten Werte. Der Variationskoeffizienten (CV%) für Erythrozyten betrug 3%.

Das halbautomatische Hämatologiesystem Sysmex F-800, ein in der vorliegenden Arbeit verwendetes Vergleichsgerät, wurde von SEEGERS (1997) anhand von 100 **Pferde**blutproben untersucht. Die ermittelten Variationskoeffizienten (CV) lagen für die Parameter WBC, RBC, HB und HCT bei $CV \leq 2,5$ %, für die Erythrozytenindizes (MCV, MCH, MCHC) unterhalb 0,9 %. Etwas höher zeigt sich die Variation bei den Thrombozyten mit 4,4 %. Auf die Korrelationen des Methodenvergleichs wird im Zusammenhang mit der Evaluierung des Technicon H*1 im Kap. 2.2.3.2 noch einmal eingegangen. Hingewiesen sei jedoch auf die Problematik der Thrombozytenzählung beim Pferd. Laut SEEGERS (1997) finden sich bei 16% der untersuchten Pferde ein "Platelet overflow", welches auf ein Mitzählen kleiner Erythrozyten zurückzuführen ist. Eine klare Abgrenzung und ein exaktes Plazieren des Schwellenwertes erschien nicht möglich, da sich in diesem Bereich große Thrombozyten und kleine Erythrozyten überschneiden. Im Endeffekt konnten für diese Pferde keine korrekten Thrombozytenzahlen angegeben werden.

Eine Evaluation des Sysmex F-800 von PASTOR (1998) erfolgte in Anlehnung an die ICSH Richtlinien (1984). Blutproben (in K_3 -EDTA) von 100 gesunden und kranken **Pferden** wurden jeweils innerhalb 6 Std verarbeitet. Untersuchungen zur Präzision innerhalb und über verschiedene Serien hinweg ergaben Variationskoeffizienten unterhalb 6,5% für alle untersuchten Parameter, mit Ausnahme der Thrombozyten. Hier lag der CV für die Präzision deutlich höher bei 18,8% (innerhalb der Serie = within batch), 21,7% (über verschiedene Serien = between batch) bzw. 26,76%

(overall reproducibility = Wiederholbarkeit über den gesamten Zeitraum von 6 Stunden). Der Vergleich des Sysmex F-800 mit der manuellen Methode ergab eine sehr gute Korrelation ($r > 0,9$) für den HCT, eine gute Korrelation ($r > 0,8$) für den WBC, RBC und HGB, eine akzeptable Korrelation ($r > 0,7$) für PLT und eine schlechte Korrelation ($r < 0,7$) für den MCV.

NEUERER und HIRSCHBERGER (1999) ermittelten mit dem Vet ABC/8P (Fa. ABX, Montpellier) unter anderem für das **Pferd** ($n = 24$) eine hohe Präzision (between batch) und große Zuverlässigkeit ($CV \leq 1,0\%$) für Leukozyten und Erythrozyten, Hämoglobin und Hämatokrit, für Thrombozyten lag der CV bei 4,6%.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die verschiedenen für die Humanmedizin entwickelten Impedanzgeräte im Vergleich für die Zählung der Erythrozyten und Leukozyten überwiegend einen guten Zusammenhang der Messergebnisse und eine hohe Messpräzision erkennen lassen (WEISER, 1987; SEEGERS, 1997). Die Veränderung der Schwellenwerte und Diskriminatoren führt zu Einsetzbarkeit für Pferde- und Schweineblut, lässt aber in vielen Fällen bezüglich der Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus verschiedenen Laboratorien keine genaue Interpretation zu. Für die Thrombozytenzählung und die Erythrozytenindizes sind ebenfalls deutliche Einschränkungen hinzunehmen (GREENE et al., 1985; SEEGERS, 1997; PASTOR et al., 1998; NEURER und HIRSCHBERGER, 1999).

Bei Vergleichsmessung mit Hilfe von manuellen Referenzmethoden müssen Abstriche in der Präzision gemacht werden. Es waren jedoch auch hier bei Verwendung verbesserter Zählkammerverfahren gute Ergebnisse zu erzielen. (SPÄTH und WEBER, 1992; PASTOR et al., 1998)

2.2.3.1.2 Blutzellendifferenzierung

Zur Unterscheidung der Leukozytenpopulationen mittels Impedanzmethode finden sich in der Literatur nur wenige Angaben zu den Tierarten Pferd und Schwein. Die einzelnen Zelltypen können im elektronischen Zellcounter nur anhand ihrer Größe unterschieden werden. Nach Schrumpfung der Zellen auf Zellkerngröße werden lymphoide Zellen aufgrund ihres geringen Zellkernvolumens von den sog. nichtlymphoiden (myeloiden) Zellen abgegrenzt (ORNSTEIN et al., 1976).

Entsprechende Untersuchungen für das **Pferd** findet man bei LUBAS (1991) und Lubas et al. (1995). Mit dem Analysegerät Hemacomp 10 (der Fa. SEAC, Italien) wurden 526 Pferdeblutproben im Hinblick auf Blutzellzählung und Bestimmung der Lymphozytenzahl ausgewertet. Im Methodenvergleich (n=50) von automatischer Lymphozytenbestimmung und manueller Differenzierung mit 200 ausgezählten Zellen, konnte nur eine mäßige Korrelation von $r=0,71$ ermittelt werden.

Im Gegensatz hierzu finden Seegers (1997) und Pastor (1998) am Sysmex F-800, wie bereits ALLEN (1981) mit dem Coulter ZBI/Channelyzer-System beim **Pferd** gute bis sehr gute Korrelationen ($r \geq 0,855$; $r > 0,8$ bzw. $r > 0,91$) zwischen der relativen Zahl kleiner Leukozyten (white small cell ratio, W-SCR) bzw. großer Leukozyten (white large cell ratio, W-LCR) und den manuell gezählten Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten (Granulozyten/Monozyten) bei geringen Mittelwertabweichungen. Eine Abgrenzung der Monozyten ist aufgrund von Koinzidenzen mit Granulozyten nicht möglich (ALLEN, 1982).

RADIN und WEISER (1986) bestätigten dies für das **Schwein** unter Verwendung des Coulter Counter Model S. Die Aussage des Systems über lymphozytäre und nichtlymphozytäre Zellfraktionen ergab keine großen Abweichungen gegenüber der manuellen Zelldifferenzierung (100er Zelldiff.). Allerdings zeigten die porcinen Granulozyten eine größere Variabilität in absoluter Zellgröße, Kerngröße und Grad der Schrumpfung im Vergleich zu humanen Leukozyten, so dass auch hier für Monozyten kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden konnte.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Unterscheidung und Zählung kleiner und großer Leukozyten unter Umständen möglich wird, jedoch für die Bestimmung der fünf einzelnen Leukozytenpopulationen (neutroph., eosinoph., basophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten) eine Kombination der Impedanzmessung mit anderen Messprinzipien (Streulicht- oder Fluorometrie) oder einer manuellen Differenzierung unabdingbar erscheint (ALLEN, 1982; ZELMANOVIC et al., 1992a).

Aufgrund der tatsächlichen Überlegenheit des optoelektrischen Messprinzips (in Kombination mit Zytochemie) gegenüber der Impedanzmessung im Bezug auf die Zelldifferenzierung, soll die Auswertung der Parameter W-SCR und W-LCR des Sysmex F-800 nicht Gegenstand dieser Arbeit sein.

2.2.3.2 Optoelektrisches Messprinzip beim Pferd und Schwein

2.2.3.2.1 Blutzellzählung

Die meisten in der Literatur angegebenen Einsätze des optoelektrischen Messprinzips basierten auf der Nutzung des Hämatologiesystems H*1, welches dieser Arbeit als Referenz- bzw. Vergleichsgerät zur Verfügung stand. Eine Anpassung an tierartspezifische Besonderheiten der Blutzellen erfolgt über die Verwendung einer Multi-Spezies Software (Version 3.0 Technicon, 1992). Eine entsprechende Einstellung für das Pferd ist hier bereits vorhanden, für die Tierart Schwein existiert keine Voreinstellung. Vorhandene Untersuchungen wurden unter der Einstellung "Ratte" gemessen.

TVEDTEN und WILKINS (1988) untersuchten die Geräte Ortho ELT-8DS (Streulichtmethode, der Fa. Ortho Diagnostics) und den Technicon H*1 (Streulicht/Absorbtionsmethode, der Fa. Miles Diagnostics) für verschiedene Tierarten. Im Methodenvergleich korrelierten sie die Messergebnisse mit dem bereits etablierten, nach Impedanzmethode arbeitenden Coulter S-Senior. Die Auswertung der Resultate von 8 analysierten **Pferde**blutproben ergab für die Parameter WBC, RBC, HGB und MCV einen guten Zusammenhang der Messergebnisse ($r \geq 0,93$). Für den MCV konnte mit Hilfe des Ortho ELT-8DS nur eine Korrelation von $r = 0,78$ erreicht werden.

Eine Studie von SPANGFORS et al. (1990) am Technicon H*1 erbrachte anhand von 126 Blutproben gesunder und kranker Pferde die in der folgenden Tabelle 13 dargestellten Variationskoeffizienten. Die gezeigten Werte stammen aus einer Präzision innerhalb der Serie. Hierbei liegt der CV für den WBC, RBC, HGB und MCV unter 2%, die Thrombozyten variieren deutlicher mit 7,3 %.

Tabelle 13: Mit H*1 ermittelte Variations-und Korrelationskoeffizienten für das Pferd

Autor	Spezies	Parameter	CV %	r
SPANGFORS et al. (1990)	Pferd	WBC	2,0	-
		RBC	1,0	-
		HGB	1,2	-
		MCV	1,1	-
		PLT	7,3	-
SEEGERS (1997)	Pferd	WBC	2,5	0,985 ³
		RBC	1,3	0,943 ³
		HGB	0,8	0,979 ³
		MCV	0,5	0,942 ³
		PLT	5,9	0,609 ³

CV = Variationskoeffizient

r = Korrelationskoeffizient

³Vergleichsgerät Sysmex F-800

Ein ähnlich gutes Ergebnis (ebenfalls in Tabelle 13 dargestellt) erhielt SEEGERS (1997) mit 100 ausgewerteten **Pferde**blutproben in einer Präzision über verschiedene Serien hinweg. Die gezeigten Korrelationskoeffizienten lagen für die aufgeführten Parameter bei $r \geq 0,942$, mit Ausnahme der Thrombozytenzahl, für die nur eine sehr mäßige Korrelation von $r = 0,609$ zwischen Sysmex F-800 und H*1 erreicht werden konnte.

Für die Blutzellzählung beim **Schwein** mit optoelektrischem Messprinzip liegt bislang in der Literatur nur eine Untersuchungen von EGELI (1998) (Technicon H*1) vor. Sie untersuchten 20 Ferkelblutproben 12 - 24 Stunden und 14 Tage nach der Geburt. Aufgrund der fehlenden Softwareeinstellung für die Tierart Schwein wurde die Voreinstellung für die Tierart Ratte verwendet. Die ermittelte „within-batch“ Präzision ergab jeweils Variationskoeffizienten (CV) um 1% für die Parameter RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW und HDW. Für die Leukozytenzahl lag der CV unter 5 %.

2.2.3.2.2 Blutzellendifferenzierung

Im Rahmen der vergleichenden Studie von TVEDTEN et al. (1988) wurde die Leukozytendifferenzierung mittels Technicon H*1 im Vergleich zur manuellen Differenzierung beurteilt. Im Ergebnis erhielten sie einen schlechten Zusammenhang für die 10 ausgewerteten Pferdeblutproben. Im Vergleich zur manuellen Zellendifferenzierung mit 100 ausgezählten Zellen betrug der Korrelationskoeffizient für Neutrophile $r = 0,52$, für Lymphozyten $r = 0,74$ und für Eosinophile $r = 0,55$. Für Monozyten konnte kein Zusammenhang ermittelt werden. In zwei Fällen wurden mit dem H*1 fälschlicherweise viel zu hohe Monozytenwerte ermittelt. Neuere Untersuchungen von TVEDTEN et al. (1996) an 129 Pferden zeigen deutlich verbesserte Ergebnisse am H*1E für Pferdeblut. Hierbei lagen die Korrelationskoeffizienten von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten zwischen $r = 0,87$ und $0,89$, Eosinophile erreichten $r = 0,62$ und für Monozyten konnte ein Wert von $r = 0,58$ ermittelt werden.

SPANGFORS et al. (1990) geben für die Bestimmung der einzelnen Leukozytenpopulationen beim **Pferd** am H*1 folgende Variationskoeffizienten an: Neutrophile Granulozyten und Lymphozyten $CV \leq 3,7$, eosinophile Granulozyten $CV = 10 \%$, Monozyten und basophile Granulozyten jeweils einen CV von $16,6\%$ bzw. 15% .

EGELI (1998) ermittelte bei der Leukozytendifferenzierung von **Ferkel**blutproben am H*1 gute bis sehr gute Zusammenhänge gegenüber der manuellen Differenzierung (100-200 Zelldiff.) für Neutrophile ($r=0,92$) und Lymphozyten ($r=0,85$), während die drei weiteren Zellpopulationen (Monozyten, Eosinophile und Basophile) sehr schlecht bzw. gar nicht ($r \leq 0,41$) korrelierten.

Bemerkenswert ist neben den Evaluationsergebnissen der Bericht der Autoren, dass bei Ferkeln sich das zunächst neutrophile Blutbild innerhalb der ersten zwei Lebenswochen in ein lymphozytäres Blutbild wandelt. Untersuchungen von EIKMEIER (1965) ergaben bei 19 gesunden Schlachtschweinen ebenfalls ein lymphozytäres Blutbild, welches jedoch aufgrund von Transportstress wieder eine neutrophile Gewichtung annimmt.

FICKENSCHER (2001), HOLSTEG (2002), MEYER und PÜSCH (2002) untersuchten in einer parallel verlaufenden Studie den ADVIA 120 für die Tierarten

Hund, Rind, Katze, Schaf und Ziege. Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 14 dargestellt. Referenzmethode für die Leukozytendifferenzierung war für die gezeigten Werte die panoptische Färbung nach Pappenheim, außerdem Spezialfärbungen wie die Peroxidase (POX) und die Alpha-Naphtyl-Acetat-Esterase (ANAE) mit jeweils 200 ausgezählten Zellen.

Tabelle 14: Mit ADVIA 120 ermittelte Variations- und Korrelationskoeffizienten für die relativen Werte der Leukozytendifferenzierung bei verschiedenen Tierarten

Parameter	Autor	Spezies	CV _{in} %	r		
				PAN	POX	ANAE
Neutrophile	FICKENSCHER	Hund	3,2	0,970	0,983	0,975
	MEYER	Katze	12,1	0,839	0,830	0,844
	HOLSTEG	Rind	5,3	0,945	0,925	0,962
	PÜSCH	Schaf	4,4	0,853	0,873	0,828
		Ziege	5,0	0,827	0,801	0,811
Lymphozyten	FICKENSCHER	Hund	30,5	0,799	0,835	0,728
	MEYER	Katze	2,6	0,824	0,808	0,868
	HOLSTEG	Rind	21,3	0,895	0,916	0,938
	PÜSCH	Schaf	2,1	0,843	0,861	0,807
		Ziege	6,2	0,856	0,833	0,840
Monozyten	FICKENSCHER	Hund	5,7	0,436	0,436	0,458
	MEYER	Katze	7,7	0,419	0,408	0,394
	HOLSTEG	Rind	29,1	0,395	0,410	0,509
	PÜSCH	Schaf	31,7	0,258	-0,141	0,249
		Ziege	28,4	0,181	0,203	0,258

CV_{in} = Variationskoeffizient innerhalb der Serie

r = Korrelationskoeffizient

Fortsetzung Tabelle 14

Parameter	Autor	Spezies	CV _{in} %	r		
				PAN	POX	ANAE
Eosinophile	FICKENSCHER	Hund	24,2	0,785	0,786	0,763
	MEYER	Katze	23,2	0,622	0,536	0,664
	HOLSTEG	Rind	41,3	0,798	0,770	0,657
	PÜSCH	Schaf	10,3	0,827	0,714	0,735
		Ziege	8,5	0,715	0,818	0,711
LUC	FICKENSCHER	Hund	22,2	-	-	-
	MEYER	Katze	41,5	-	-	-
	HOLSTEG	Rind	82,8	-	-	-
	PÜSCH	Schaf	37,2	-	-	-
		Ziege	45,8	-	-	-
Basophile	FICKENSCHER	Hund	45,7	0,051	-	-
	MEYER	Katze	33,8	0,037	-	0,320
	HOLSTEG	Rind	12,4	0,152	-	0,317
	PÜSCH	Schaf	23,9	0,269	-	-
		Ziege	16,8	0,234	-	-

CV_{in} = Variationskoeffizient innerhalb der Serie

r = Korrelationskoeffizient

2.2.3.3 QBC-System bei den Tierarten Pferd und Schwein

Eine weitere Möglichkeit der Blutbildanalyse bietet das Quantitative Buffy Coat System. Im Folgenden werden die bisherigen Evaluationsergebnisse von QBC-Analysegeräten bei Pferden erläutert. LEVINE et al. (1986) konnten in ihren Untersuchungen an 70 **Pferden** dem QBC A eine gute Einsetzbarkeit für Pferdeblut bescheinigen. Die Variationskoeffizienten für die Präzision betrugen für den WBC 4,2%, für den HCT 1,4% und die PLT bei 7,2%. Granulozyten wurden mit einer Variation von 6,5% und die Lymphozyten/Monozytenfraktion mit 10,5% ermittelt. Im Durchschnitt um 2 % besser (ausgenommen HCT) lagen die Präzisionsergebnisse von BROWN und BARSANTI (1988) bei 125 **Pferden**. Sie verglichen den QBC mit dem Coulter ZBI. Mehrere Autoren bestätigten, dass das QBCV-System den Anforderungen für die Blutzellzählung bezüglich Pferdeblut bei einfacher und schneller Handhabung gerecht wird (FISCHER et al., 1989; MEISTER, 1990; WENSING, 1992; GUELFU und TRUMEL, 1995). Methodenbedingt kann jedoch auf einen Blutaussstrich für die Zelldifferenzierung in vielen Fällen nicht verzichtet werden. Zu kritisieren sei außerdem ein doch deutlicher Anteil von nicht interpretierbaren Proben von 4,5% (FISCHER et al., 1989) bis hin zu 15,5% (MEISTER, 1990) z. B. bei hämolytischen Proben und Leukopenien (HOFMANN-LEHMANN et al., 1998).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Tiere

Im Rahmen der Geräteevaluierung und Softwareadaptation des Hämatologiesystems ADVIA 120 kamen in der vorliegenden Arbeit frische Blutproben von insgesamt 221 Pferden verschiedener Rassen und 242 Schweinen (Deutsche Hybriden) zum Einsatz. Bei den Pferden handelt es sich überwiegend um Patienten und eigene Tiere der Kliniken und Institute des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus Liebig Universität Gießen. Außerdem um Tiere, die im Rahmen von Routineblutuntersuchungen aus tierärztlichen Praxen in die Auswertung gelangten. Auswahlkriterium war die Anforderung eines großen Blutbildes mit Differenzierung. Die Schweineblutproben entstammen dem Schlachtgut des Schlachthofes Gießen.

Das Durchschnittsalter der untersuchten Pferde betrug 8,4 Jahre, die Altersspannweite lag zwischen 1 Monat und 27 Jahren. Die Schweine waren zwischen 6 und 24 Monaten alt. Hier betrug das Durchschnittsalter 6,2 Monate. Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Pferden lag ausgeglichen bei 53,8% zu 46,2%. Beim Schwein wurde keine Geschlechtsbestimmung vorgenommen.

In Abbildung 04 ist die Altersverteilung von Pferden und Schweinen gegenübergestellt.

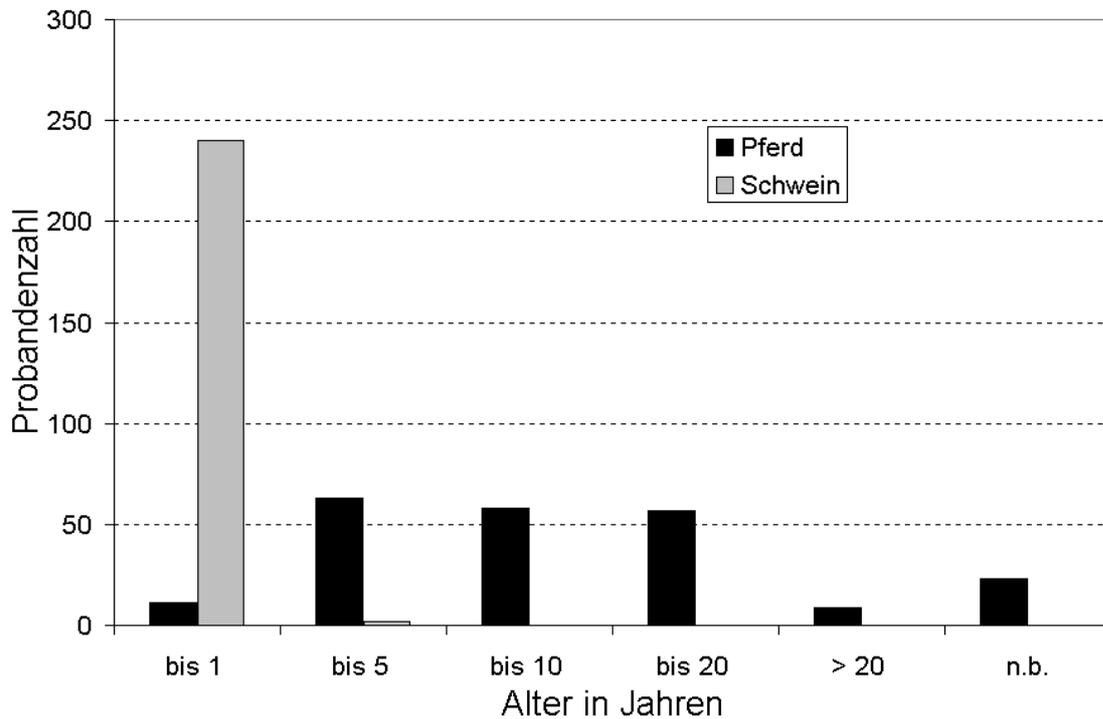


Abbildung 04: Altersverteilung der untersuchten Pferde (n=221) und Schweine (n=242)

Abbildung 05 stellt die Rasseverteilung der Pferdeprobanden in einem Kreisdiagramm dar. Mit 58,4 % stellen die Warmblutrassen den größten Anteil der Patienten.

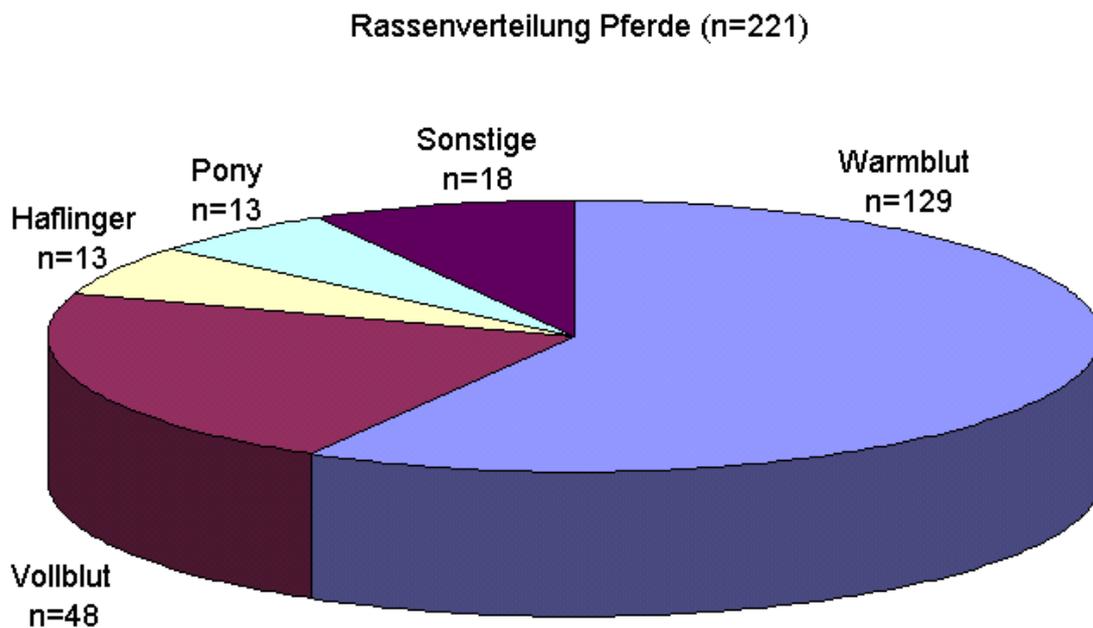


Abbildung 05: Rasseverteilung der Pferdeprobanden

3.1.2 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte beim Pferd nach Punktion der Vena jugularis unter Verwendung von sterilen Einmalkanülen (18 G, Fa. Becton-Dickinson, Dun Laoghaire), beim Schwein im Rahmen der Schlachtung nach Schnitteröffnung der Vena jugularis durch freies Abfließen entlang der Röhrenwand in das zur Antikoagulation mit K_3 -EDTA beschichteten Probengefäß. Als weitere Gerinnungshemmer für den Antikoagulanzvergleich dienten Li-Heparin und Na-Citrat. Jedes Probenröhrchen wurde sofort nach Blutentnahme verschlossen und 4 bis 5 mal geschwenkt.

3.1.3 Hämatologiesystem ADVIA 120

Das Hämatologiesystem ADVIA 120 ist eine Weiterentwicklung der bereits erfolgreich eingesetzten H*Systeme (Firma Bayer Diagnostics, München), welche durch ihre Multi-Spezies-Software die Voraussetzungen zur Untersuchung verschiedener Tierarten (exclusive Schwein) bereits erfüllt. Neben dem kleinen und großen Blutbild, können (gegenüber dem H*1) zusätzlich auch Retikulozyten bestimmt werden. Der Probendurchsatz beträgt 120 bzw. 74 (bei Retikulozytenanforderung) pro Stunde. Es handelt sich hierbei um ein vollautomatisiertes Durchflusszytometer, das nach dem optoelektrischem Messprinzip die Absorption und das Streulicht einer Einzelzelle erfasst. Mit Hilfe des Mantelstromprinzips, der sog. hydrodynamischen Zellfokussierung (Abb. 01) werden die Blutzellen hintereinander, einzeln durch einen Messkanal geleitet. Ein auf Partikelgröße fokussierter Laserstrahl verursacht je nach Partikelbeschaffenheit ein charakteristisches Streulicht, welches in bestimmten Winkeln von Detektoren aufgefangen wird. Man unterscheidet *Großwinkelstreulicht*, das eine Aussage über die intrazelluläre Beschaffenheit erlaubt und *Kleinwinkelstreulicht*, welches Information über Zellgröße bzw. Volumen liefert. (vgl. Kap. 3.1.1.1)



Abbildung 06: Hämatologiesystem ADVIA 120

Das System beinhaltet einen PC mit Bildschirm und Drucker, die Benutzeroberfläche basiert auf Windows-NT. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt graphisch und numerisch, der Untersucher kann die Bildschirmoberfläche frei nach seinen Auswahlkriterien gestalten. Die folgende Abbildung zeigt eine mögliche Bildschirmkonfiguration (Run Screen).

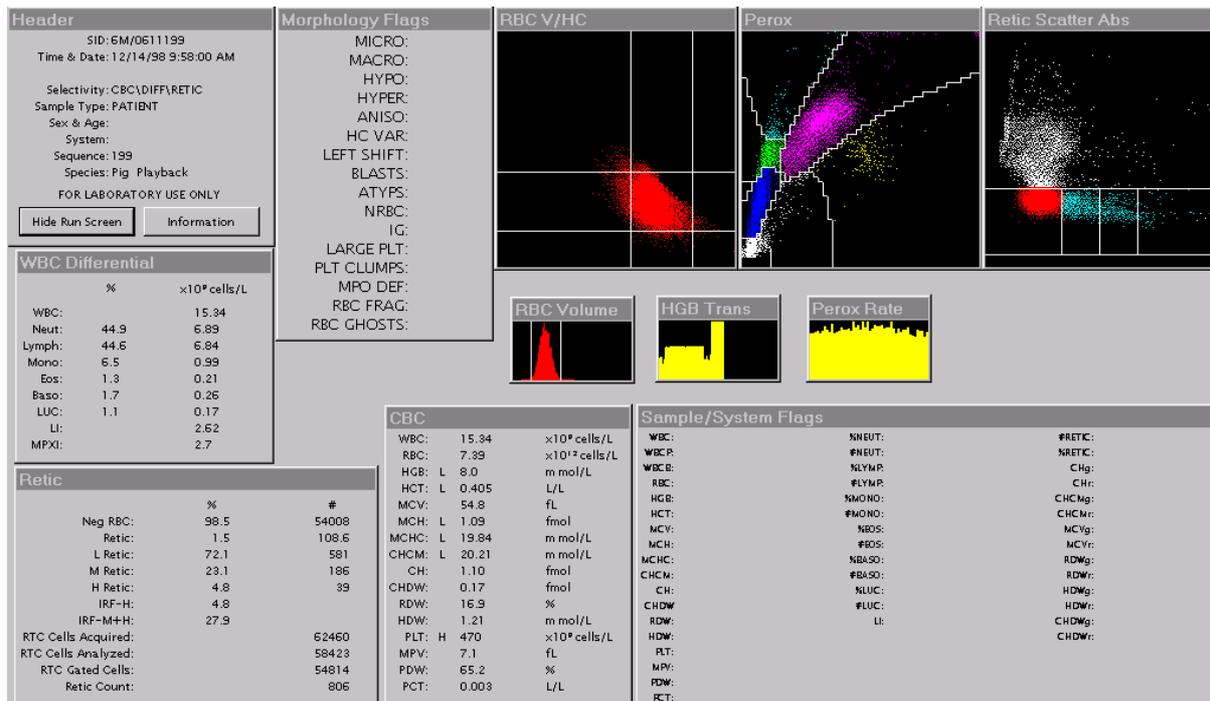


Abbildung 07: Ergebnisdarstellung Hämatologiesystem ADVIA 120, Schwein (Tier-Nr. 199)

Die analytische Einheit enthält den UFC-Block (Unifluidics Circuits), einen Acryl-Block, in dem mit den entsprechenden Reagenzien die Zellpräparationen vor der Messung durchgeführt werden. Dieser abgeschlossene Kreislauf beinhaltet alle Reaktionskammern (s. Abb. 08), im Gegensatz zu den H*Systemen, wo die einzelnen Kammern mit abnehmbaren Schläuchen verbunden sind.

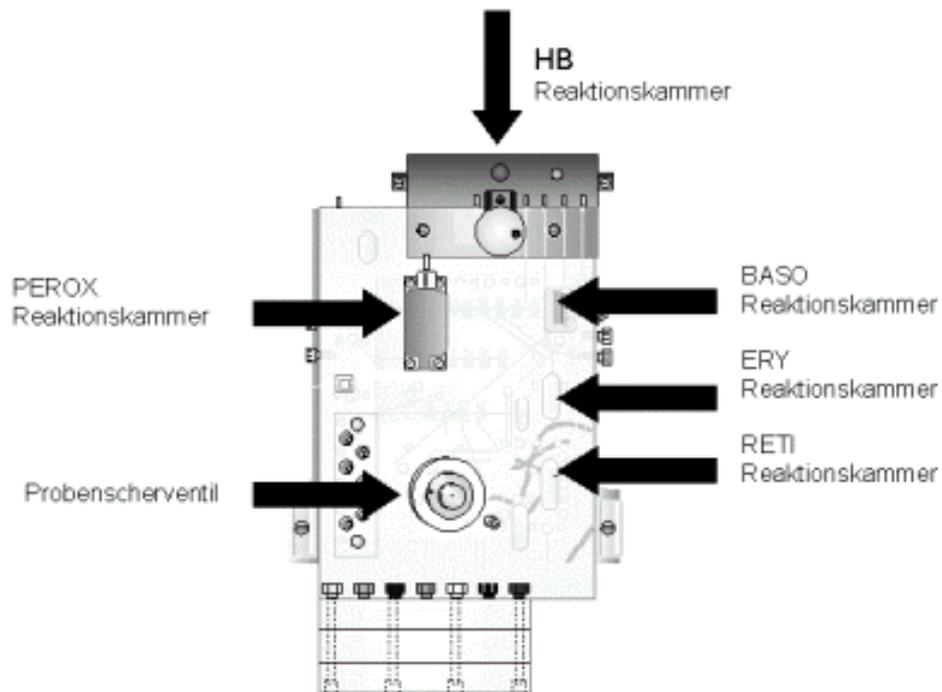


Abbildung 08: UFC-Einheit, Unifluidics™-Technologie, Reaktionskammern
(modifiziert nach ADVIA 120 Hematology System Benutzerhandbuch)

Das Analysesystem verfügt über verschiedene Ansaugmodi, die jeweils ein Probenvolumen von 155 µl EDTA-Vollblut erfordern.

1. Open tube (offenes Röhrchen), (Abb. 09)
2. Closed tube (geschlossenes Röhrchen), (Abb. 09)
3. Autosampler / Rack-System (automatischer Probennehmer; geschlossen), (nicht abgebildet)

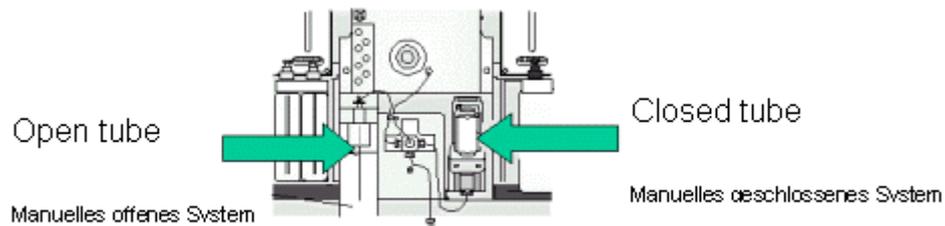


Abbildung 09: Probennehmer, Ansaugmodi Open tube und Closed tube

Mit dem automatischen Probennehmer (Autosampler/Racksystem, ACTS) ist das Hämatologiesystem in der Lage bis zu 120 Blutproben pro Stunde zu analysieren. Die Proben werden im geschlossenen System automatisch transportiert, gemischt und mittels Barcode identifiziert. Anschließend wird eine Blutprobe entnommen und (wie auch bei den anderen Ansaugmodi) nach den im Folgenden beschriebenen Methoden analysiert.

3.1.3.1 Erythrozyten- und Thrombozytenkanal

Im Erythrozyten-bzw. Thrombozytenkanal werden die Zellen des roten Blutbildes, sowie die Indizes MCV, MCH, MCHC, MPV bestimmt. Nach *isovolumetrischer Aufkuglung* oder sog. „Sphering“ der Erythrozyten bzw. Thrombozyten (s. Abb. 02) erfolgt eine Zweiwinkelstreulichtmessung im Laserstrahl und so eine direkte Messung des individuellen Zellvolumens und der intrazellulären Hämoglobinkonzentration. Der Winkelbereich des Kleinwinkelstreulichtsignals liegt hier bei 2-3°, der des Großwinkelstreulichts bei 5-15°.

Die folgende Abbildung 10 zeigt eine schematische Darstellung der Laseroptik und deren Streulichtverlauf. Die aufgekugelten Erythrozyten durchlaufen im Probenstrom den Laserstrahl und brechen das Licht in unterschiedlichen Winkeln, die auf zwei Detektoren aufgefangen werden (2-3° und 5-15°). Ein weiterer dritter Detektor ermittelt die Absorption der die Flusszelle passierenden Zellen.

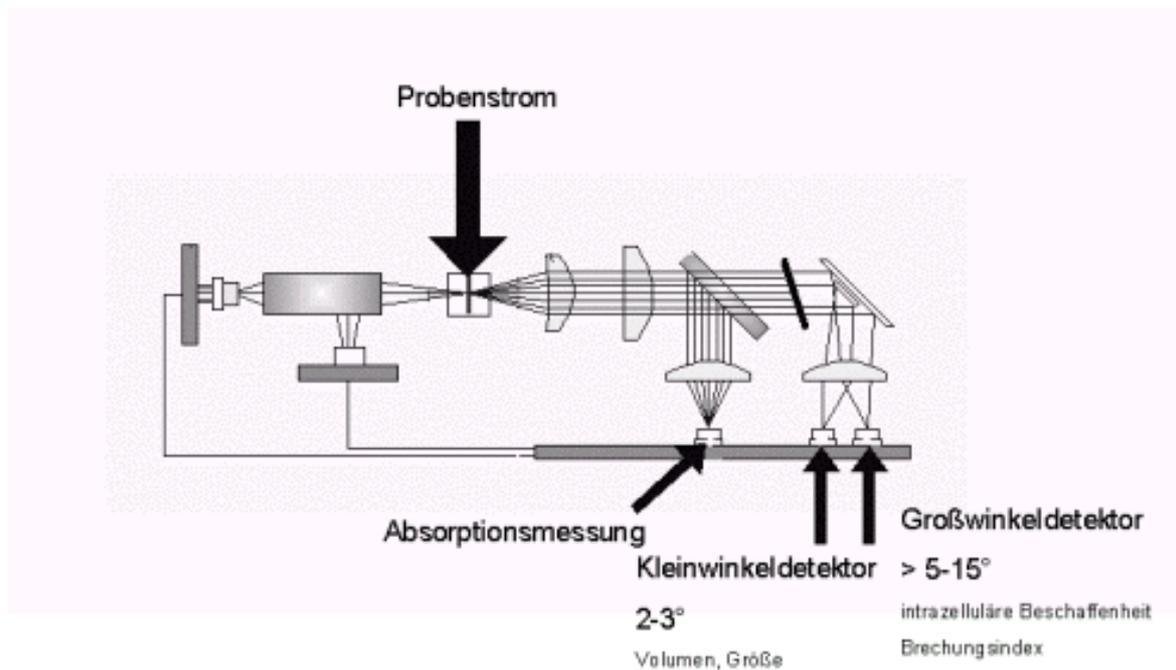


Abbildung 10: Laseroptik, Laserstreulicht (modifiziert nach ADVIA 120 Hematology System Benutzerhandbuch)

Das ermittelte Zellvolumen, die Zellgröße und ihre intrazelluläre Beschaffenheit werden auf dem Bildschirm graphisch und numerisch dargestellt. Neben der Zählung der Erythrozyten, werden Größe und Hämoglobingehalt des einzelnen Erythrozyten bestimmt. Aus gemessenem Erythrozytenvolumen und der gemessenen mittleren Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (CHCM) werden der Hämatokritwert, das mittlere Erythrozytenvolumen (MCV), die Erythrozytenverteilungsbreite (RDW), die Hämoglobinverteilungsbreite (HDW) und die mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC) berechnet. Hieraus wird es möglich den gemessenen und errechneten Wert miteinander zu vergleichen. Bei Abweichungen von mehr als 1,2 mmol werden entsprechende Fehlermeldungen angezeigt. Weitere Abweichungen der Größe und Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten werden als morphologische Signale angezeigt.

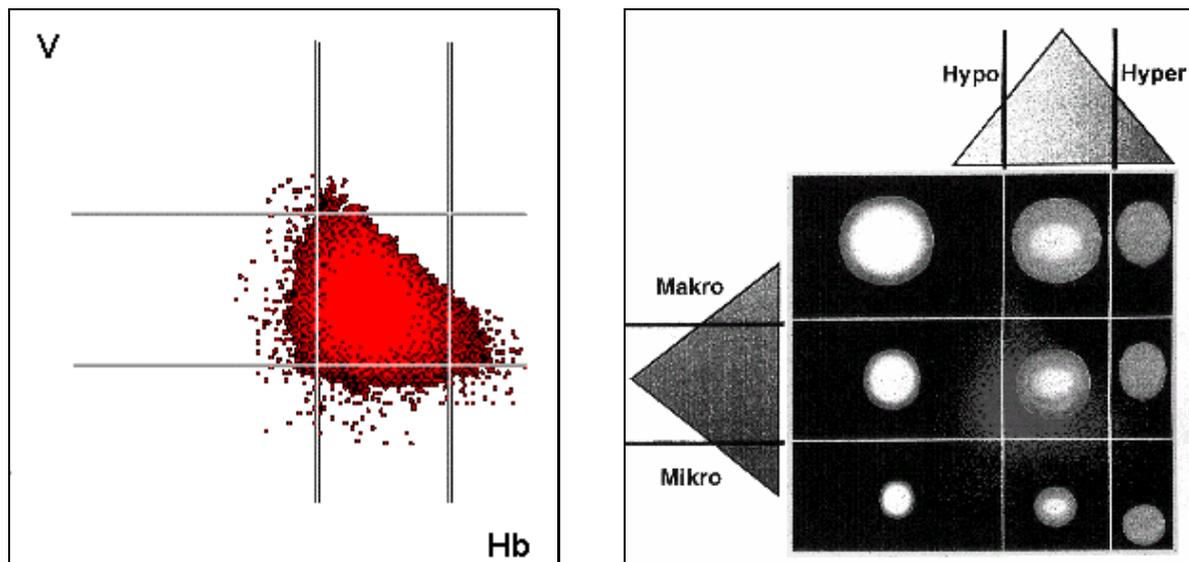


Abbildung 11: Erythrogramm; Tic-Tac-Toe oder RBC Matrix

Abbildung 11 zeigt Erythrogramme bei dem die Hämoglobinkonzentration gegen das Volumen aufgetragen ist. Diese Art der graphischen Darstellung, das sog. „Tic-Tac-Toe“, ermöglicht eine schnelle Erfassung der Erythrozytenmorphologie.

Die Erweiterung der Thrombozytenanalytik von bisher einer Großwinkelstreulichtmessung auf Zweiwinkelstreulichtmessung gegenüber der H*-Reihe, ermöglicht eine genaue Abtrennung von Zell- und Erythrozytenfragmenten, großen Thrombozyten (aktivierte Thrombozyten > 20fl) und Mikro/Fragmentozyten von wahren Thrombozyten. Der Messbereich reicht für Humanblut von 2000 bis $4000 \times 10^9/l$. (KLINGLER, 1997) Die 2-dimensionale Thrombozytenanalyse (2D-THROMBO-Methode) basiert auf der integrierten Analyse der Messungen von Erythrozyten und Thrombozyten. Das Thrombo-Streulicht-Zytogramm wird gebildet, indem das Kleinwinkel-Streulicht (verstärkt) und Großwinkel-Streulicht (verstärkt) kombiniert und in Volumen- und Brechungsindexwerte umgerechnet werden. Das THROMBO-Streulicht-Zytogramm zeigt Zellen mit einem Volumen zwischen 0 fl und 30 fl an. Die Identifizierung und Zählung von Zellen mit größeren Volumina als 30 fl wird über das ERY-Streulicht-Zytogramm vorgenommen.

In Abbildung 12 wird jeweils ein Thrombozytogramm von Mensch, Pferd und Schwein dargestellt.

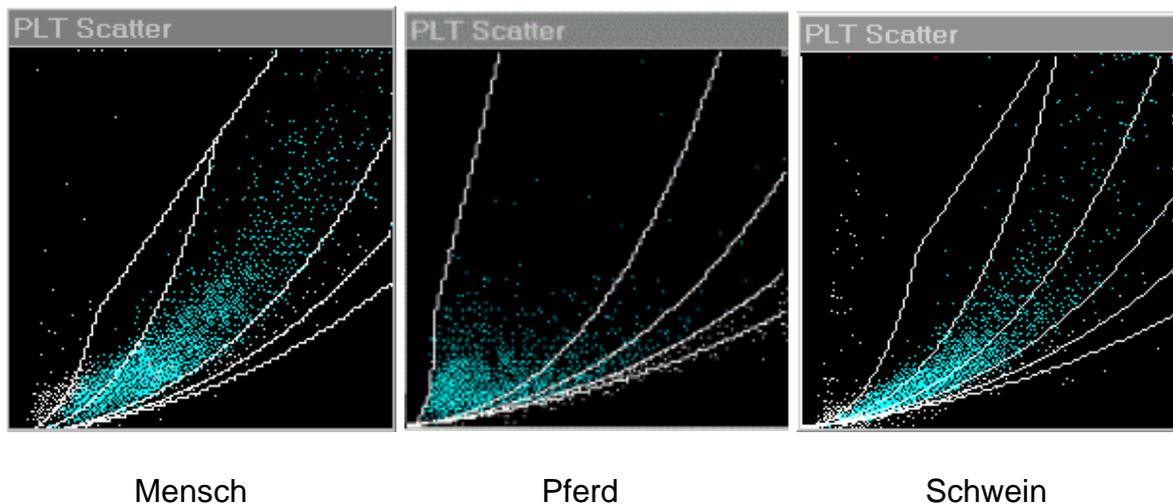


Abbildung 12: Thrombozytogramm; PLT-Scatter Mensch, Pferd-Nr.134 (PLT $208 \times 10^9/l$), Schwein-Nr.182 (PLT $432 \times 10^9/l$); x-Achse Brechungsindex, y-Achse Zellvolumen

3.1.3.2 Retikulozytenanalytik

Die Methode zur Retikulozytenzählung des ADVIA 120 dient zur Bestimmung der Parameter Retikulozytenkonzentration, relativer Anteil an Retikulozyten und ihr Hämoglobingehalt. Die Untersuchung der Retikulozyten erfolgte bisher in manuellen, mikroskopischen Verfahren durch Anfärbung der RNS mit Brilliantkresylblau. Bei der Retikulozytenmethode des ADVIA 120 werden vorhandene Retikulozyten entsprechend ihres RNS-Gehaltes durch einen Abkömmling des Neu-Methylenblau, das Oxazin 750 haltige ADVIA 120 autoRETI Reagenz, angefärbt. Durch Zweiwinkelstreulichtmessung erfolgt Größenbestimmung der Zellen und anhand der Absorption die Klassifizierung nach RNS-Gehalt in verschiedene Retikulozytenreifegrade oder Erythrozyten.

Abbildung 13 stellt die Absorptions- und Streulicht-Messungen graphisch dar. Die hoch verstärkten Absorptionsdaten, sie entsprechen der Zellreifung, verlaufen entlang der x-Achse und die niedrig verstärkten Großwinkelstreulichtdaten, diese entsprechen der Zellgröße, entlang der y-Achse. Je stärker die Färbung und somit die Absorption des Laserlichtes durch die Zelle, desto unreifer ist der Retikulozyt. Die Subklassifikation der Retikulozyten erfolgt demnach in high, middle und low absorbierenden Zellen.

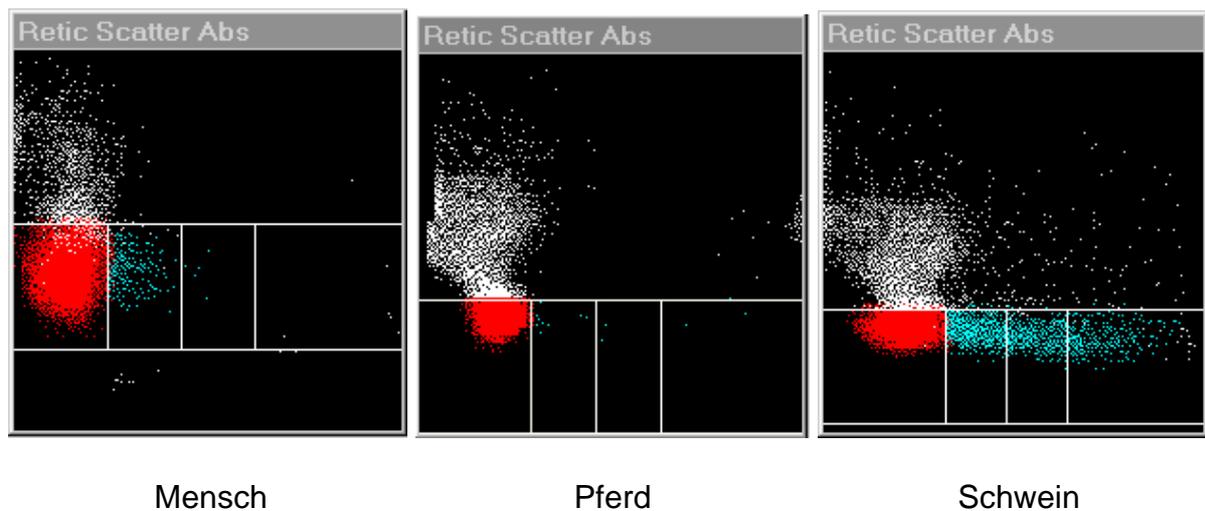


Abbildung 13: Retizytogramm; Retiscattergramm Mensch (Reti $26,8 \times 10^9/l$), Pferd-Nr. 206 (Reti $2,5 \times 10^9/l$), Schwein-Nr.218 (Reti $186 \times 10^9/l$), x-Achse Brechungsindex, y-Achse Zellvolumen

3.1.3.3 Hämoglobinkanal

Zur Bestimmung der Gesamthämoglobinkonzentration entsprechend den Anforderungen des ICSH kommt eine modifizierte Cyanhämoglobinmethode zum Einsatz. Die Messung erfolgt in einer Durchflusskolorimeterküvette photometrisch bei einer Wellenlänge von 546 nm. Eine graphische Darstellung der Messwerte erfolgt anhand des unten in Abb. 14 gezeigten Hämoglobin Rate-Diagramms, wobei die x-Achse die Zeit in Sekunden und die y-Achse die Lichttransmission in Prozent anzeigt. Dies ermöglicht dem Benutzer eine direkte optische Qualitätskontrolle.

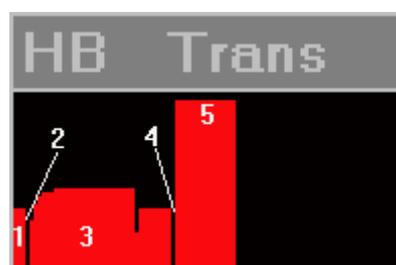


Abbildung 14: HB Trans Histogramm; 1 = Wert der Spüllösung, 2 = Leeren der Spüllösung, 3 = Werte der Probe, 4 = Leeren der Probenlösung, 5 = Werte der Spüllösung

3.1.3.4 Peroxidase-Differenzierungsmethode

In einer zytochemische Peroxidase-reaktion erfolgt nach Lyse der Erythrozyten und Peroxidasefärbung, Zählung (LeukoP) und Differenzierung der Leukozyten entsprechend ihrer Absorption im Halogenstrahl. Die Identifikation der Leukozyten erfolgt aufgrund ihrer Größe und der unterschiedlich starken Peroxidase-Reaktion (Anfärben der Granula). Neutrophile, Eosinophile und Monozyten zeigen bei Pferd und Schwein unterschiedliche Peroxidaseaktivitäten. Die Zuordnung der leukozytären Zellen erfolgt tierartsspezifisch mittels Clusteranalyse.

In der folgenden Abbildung 15 sind Peroxidase-Zytogramme von Mensch, Pferd und Schwein dargestellt. Sie verdeutlichen die individuelle Clusterung für die einzelnen Spezies.

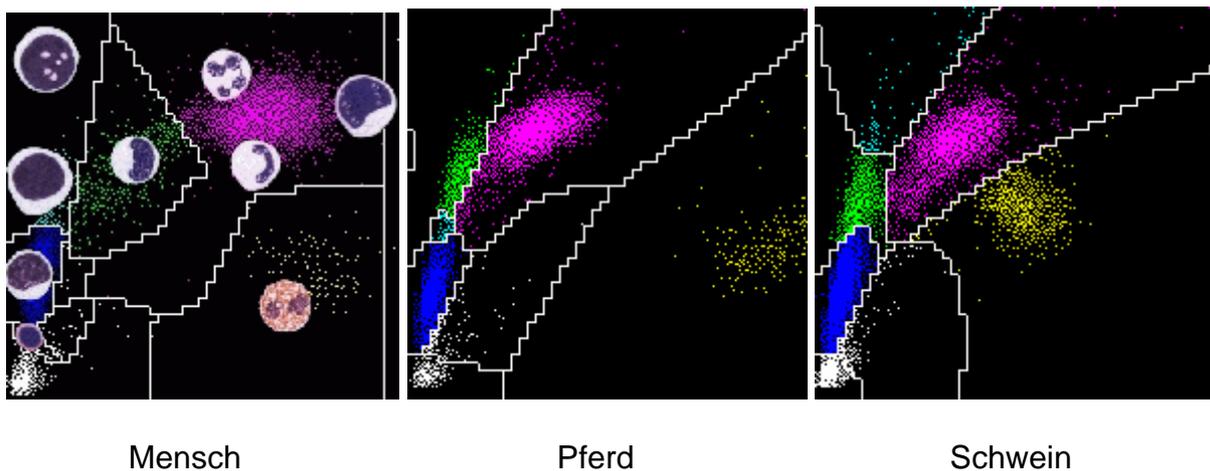


Abbildung 15: Leukogramme; Peroxidase-Scattergramm des ADVIA 120;
 Spezies Mensch: Darstellung mit Zellmorphologie; Pferd-Nr. 180
 (WBC $11,61 \times 10^9/l$) physiologisches Differentialblutbild; Schwein-Nr.
 204 (WBC $18,27 \times 10^9/l$) Lympho- und Monozytose

Das Leukogramm des Menschen zeigt die unterschiedlichen Zellpopulationen in den einzelnen Clustersegmenten (von links unten): Rauschen (weiß), Normoblasten (zwischen Rauschen und Lymphozyten, weiß), Lymphozyten (blau) und Basophile Granulozyten (blau), LUC (large unstained cells, hellblau), Monozyten (beim Mensch ein klar abgegrenzter großer grüner dreieckiger Bereich), Neutrophile Granulozyten (Myelozytäre Vorstufen, Stabkernige Granulozyten, pink), Eosinophile Granulozyten

(rechts, gelb). Auf der dargestellten Abbildung zeigt sich z.B. für das Pferd die Besonderheit, dass die Monozytenpopulation oberhalb der LUCs lokalisiert ist.

Das auf beiden Achsen in 100 Kanäle unterteilte Peroxidase-Zytogramm liefert auf der x-Achse die Peroxidaseaktivität mittels Absorbimetrie der einzelnen Zellen und auf der y-Achse das Zellvolumen mittels Streulichtanalyse. Durch die graphische Darstellung dieser Daten ergeben sich deutlich voneinander abzugrenzende charakteristische Zellwolken (dot-plots). Die Clusteranalyse identifiziert jede Zellpopulation unter Berücksichtigung von Position und Dichte. Nach der Identifikation erfolgt die Ermittlung der Gesamtleukozytenzahl sowie der absoluten und relativen Zellzahl der einzelnen Leukozytenpopulationen. Die Berechnung erfolgt durch die tierartenspezifische Software. Im LUC-Cluster sammeln sich große ungefärbte Zellen z.B. Blasten. Abnorme Zellen und Zellfragmente (z.B. alternde, toxische Granulozyten) lokalisieren sich im Peroxidase-Zytogramm in Abhängigkeit ihrer Größe und Peroxidaseaktivität. Sogenannter Zelldebris bildet den Bereich Rauschen. Eventuell vorhandene Normoblasten erscheinen aufgrund ihrer geringen Größe und mangelnden Peroxidaseaktivität ebenfalls in diesem Bereich. Thrombozytenaggregate (PLT Clumps) erscheinen etwa im 45° Winkel in einem separaten Cluster.

3.1.3.5 Basophilenmethode/Kernsegmentierungskanal

Eine Trennung basophiler Granulozyten von Lymphozyten ist im Peroxidasekanal nicht gewährleistet, weshalb der Einsatz einer weiteren Methode zur Zelldifferenzierung nötig ist. Nach Zerstörung der Zellmembran der Leukozyten (Zytoplasmastripping) und Lyse der Erythrozyten werden Basophile Granulozyten als lyseresistente Zellen im Doppelwinkellaserstreulicht gezählt (LeukoB). Im Nukleogramm sind Niedrigwinkel- und Hochwinkelstreulichtmessung kombiniert und es werden drei Zellpopulationen mittels Clusteranalyse getrennt voneinander dargestellt (s. Abb. 16).

Differierende Messergebnisse der Gesamtleukozytenzählung im Basophilen-/Kernsegmentierungskanal (LeukoB) und dem Peroxidasekanal (LeukoP) von mehr als 10% werden durch sog. Flags (*) angezeigt. Grundsätzlich wird beim ADVIA 120 (im Gegensatz zum H*1) das Messergebnis des LeukoB reportiert. Die Basophilen

Granulozyten werden nach Ermittlung im Basokanal, unter Korrektur der Lymphozyten des Peroxidasekanals, dem Gesamtdifferentialblutbild hinzugefügt.

$$\text{Gesamtlymphozytenzahl} = \text{Lymphozyten}_{\text{Perox}} - \text{Basophile}$$

Die Abbildung 16 zeigt, neben Pferd und Schwein ein differenziertes Nukleogramm des Menschen. Die Aufteilung der Punktwolken erfolgt in mononukleäre (MN, blau), polymorphnukleäre (PMN, pink) Zellkerne und Basophile Granulozyten (gelb). Im hochdifferenzierten Nukleogramm des Menschen sind MN und PMN durch ein Tal (Pfeil) voneinander getrennt. Hier wird ein sog. Segmentierungsindex (Lobularitätsindex) gesetzt. Ein Verschwinden dieses Tals und somit eine Verschiebung des LI deutet auf eine Linksverschiebung (Vermehrung von stabkernigen neutrophilen Granulozyten) hin und löst im System das Linksverschiebungssignal aus (dieses Signal ist in der aktuellen Softwareversion unterdrückt). Für die einzelnen Tierarten wird eine entsprechende detaillierte Auftrennung angestrebt.

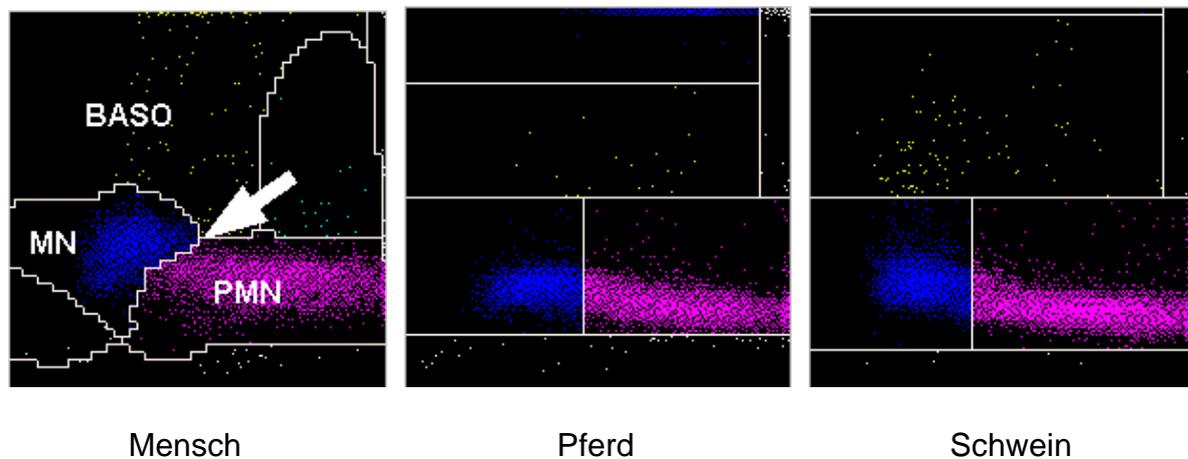


Abbildung 16: Nukleogramme; Basophilenkanal des ADVIA 120;

Spezies: Mensch, Pferd-Nr. 178 (WBC $9,5 \times 10^9/l$), Schwein-Nr. 213 ($13,51 \times 10^9/l$); MN = mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten, blau), PMN = polymorphkernige Zellen (segmentkernige neutrophile und eosinophile Granulozyten, pink), BASO = Basophile Granulozyten (gelb)

3.1.3.6 Qualitätskontrolle und Kalibration

Die durch das Evaluationsprotokoll vorgeschriebene Qualitätskontrolle wird anhand von Kontrollblut der Firma Bayer Diagnostics vor den Messungen und bei Bedarf zur Sicherung der Untersuchungen auch zwischen den Probenanalysen durchgeführt. Die Kalibration des ADVIA 120 wird vom technischen Personal der Firma Bayer Diagnostics, Fernwald, jeweils zu Beginn der einzelnen Evaluationsabschnitte durchgeführt. Hierbei kommt entsprechendes optisches Testmaterial (ADVIA TESTpoint), Kalibrator (ADVIA OPTIpoint) und frische humane Vollblutproben zum Einsatz.

3.1.4 Hämatologiesystem Technicon H*1

Der Technicon H*1 der Firma Bayer Diagnostics zählt zu den Vorläufermodellen des ADVIA 120. Er wird in dieser Arbeit für die Pferde als Referenzgerät und für Schweine als Vergleichsgerät eingesetzt.

Es handelt sich hierbei ebenfalls um ein Durchflusszytometer, das nach dem optoelektrischen Messprinzip arbeitet. Mit dem H*1 können 80 kleine bzw. 60 große Blutbilder in der Stunde erstellt werden. Die erforderliche Blutmenge beträgt 100 µl EDTA-antikoaguliertes Vollblut.

Mittels einer Multi-Spezies-Software (Version 3.0, Technicon 1992) ist das computergesteuerte System in der Lage, neben der Spezies Mensch auch Blut von Hund, Katze, **Pferd**, Ratte, Kaninchen und Maus zu analysieren. Für die Tierart Schwein existiert zur Zeit noch keine tierartspezifische Softwareeinstellung. Die Schweineblutproben werden aufgrund entsprechender Voruntersuchungen und Erfahrungen anderer Autoren (EGELI, 1998) unter der Softwareeinstellung Ratte gemessen.

3.1.4.1 Ergebnisdarstellung Technicon H*1

Die folgenden Abbildungen 17 und 18 zeigen die Ergebnisdarstellung für die Tierarten Pferd und Schwein in den Analysemodi Report 1 und Report 3.

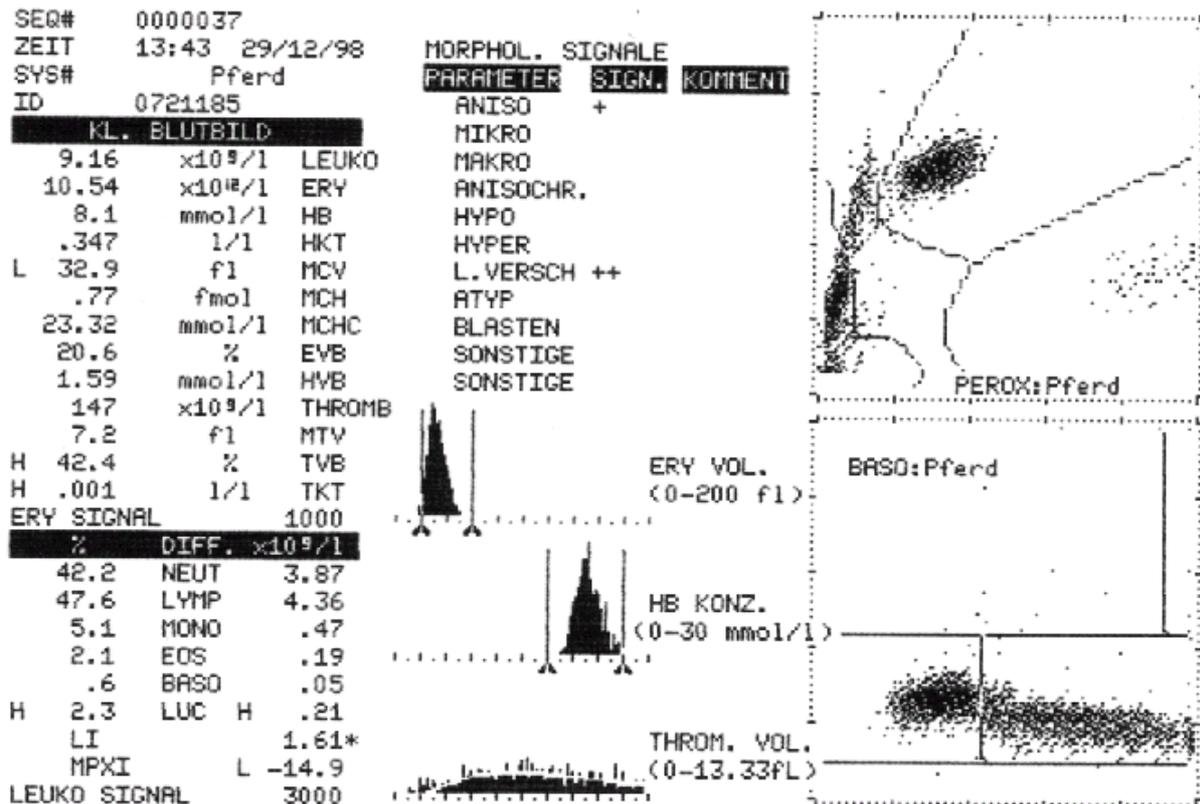


Abbildung 17: Ergebnisdarstellung Technicon H*1, Pferd Nr. 185, Report 1

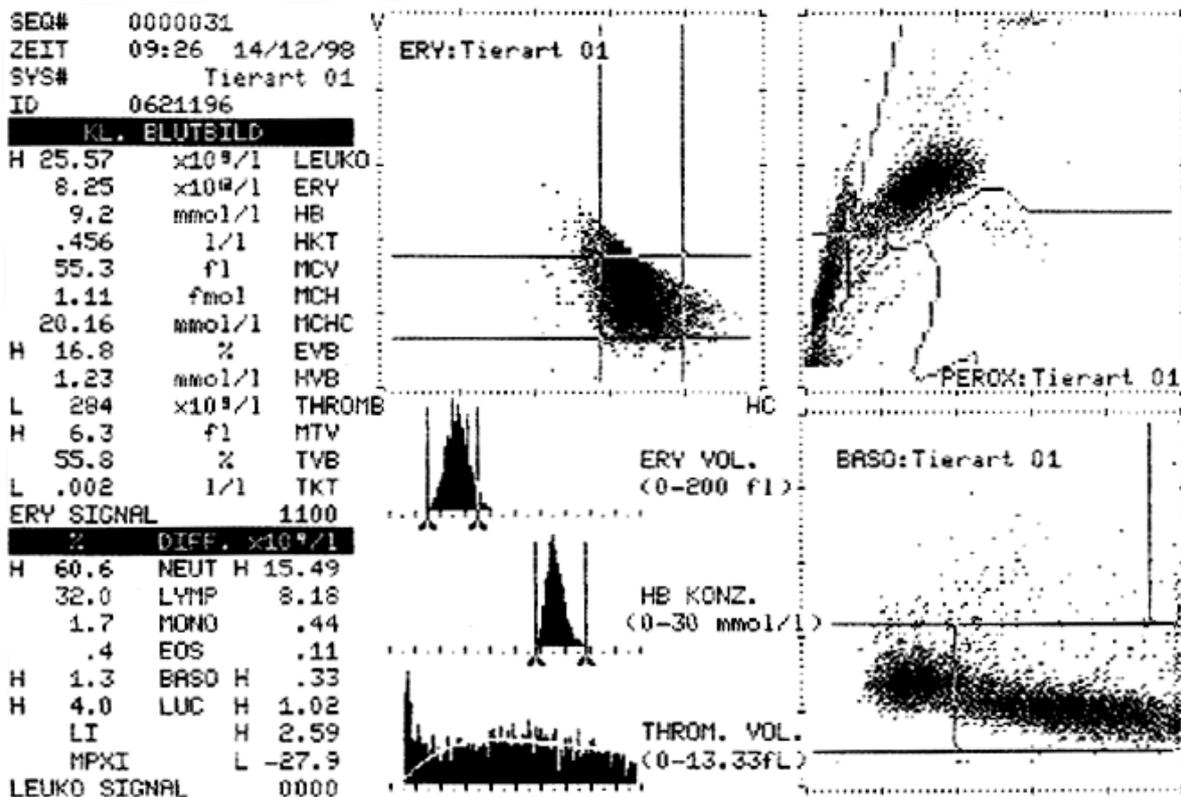


Abbildung 18: Ergebnisdarstellung Technicon H*1, Schwein Nr. 196, Report 3

3.1.4.2 Qualitätskontrolle und Kalibration

Die Qualitätskontrolle und Kalibration erfolgte, ebenfalls wie im Evaluationsprotokoll bzw. in den Herstellerangaben vorgeschrieben, anhand von Kontrollblut der Firma Bayer Diagnostics vor den Messungen und bei Bedarf zur Sicherung der Untersuchungen auch zwischen den Probenanalysen. Die Kalibration des Technicon H*1 wird vom technischen Personal der Firma Bayer Diagnostics, München, jeweils zu Beginn der einzelnen Evaluationsabschnitte durchgeführt. Hierbei kommt entsprechendes optisches Testmaterial (TESTpoint), Kalibrator (OPTpoint) und frische humane Vollblutproben zum Einsatz.

3.1.5 Sysmex F 800

Der Sysmex F-800 (TOA Medical Electronics), ein halbautomatisches Hämatologiesystem, arbeitet mittels Impedanzmessprinzip (s. Kap. 2.2.1.1.1). Neben der Hämoglobinkonzentration werden Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenzahl und ihre Indizes bestimmt. Anhand der unterschiedlichen Zellkernmorphologie der verbleibenden Leukozytenkerne (nach Schrumpfung/Zerstörung der Zellmembran) wird eine Vordifferenzierung in große und kleine Leukozyten vorgenommen.

3.1.5.1 Ergebnisdarstellung Sysmex F-800

Abbildung 19 zeigt exemplarisch die Ergebnissausdrucke des Sysmex F-800 für je eine Pferde- und eine Schweineblutprobe mit physiologischen Werten.

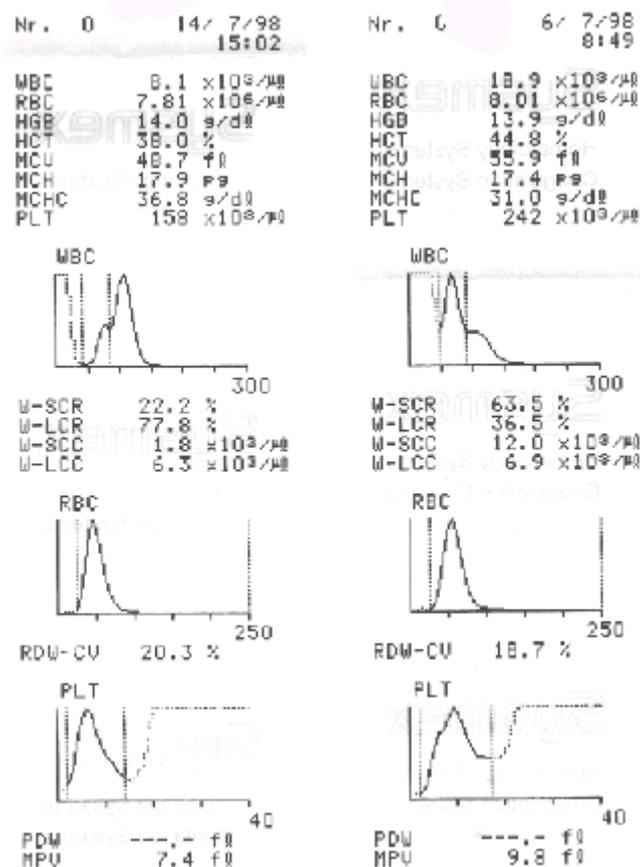


Abbildung 19: Ergebnissausdruck Sysmex F-800 Pferd-Nr. 70 und Schwein-Nr. 77

3.1.5.2 Qualitätskontrolle und Kalibration

Qualitätskontrolle und Wartung des Sysmex F-800 erfolgte entsprechend den Herstellerangaben unter Verwendung von kommerziellem Kontrollmaterial. Für die Hämoglobinkonzentration und den Hämatokritwert wurde eine manuelle Kalibration durchgeführt. Hierbei wurde Hämoglobin-Standardlösung (Histan, Firma TOA Medical Electronics) verwendet. Die Hämatokritkalibration erfolgte durch vergleichende Bestimmung von 5 frischen Vollblutproben mit der Mikrohämatokritmethode gemäß der Sysmex F-800 Bedienungsanleitung.

3.1.6 Mikrohämatokritzentrifuge

Als Referenzmethode zum Hämatokritwert wurden Doppelbestimmungen mittels Hämatokritzentrifuge HämoFuge A (Fa. Heraeus Sepatech GmbH, Osterode) vorgenommen. Sie gilt als international anerkannte Standardmethode (*'Golden Standard'*) zur Ermittlung des Hämatokritwertes nach DIN 58933. Für die Tierarten Pferd und Schwein wurden die Blutproben bei 5000 g (12000 U/Min) 5 Minuten zentrifugiert.

3.1.7 Manuelle Differenzierung

Für die Tierarten Pferd und Schwein wurden zur Evaluierung des ADVIA 120 pro Färbung jeweils 200 Zellen (200-M-Diff.) bzw. 1000 Zellen (RETI) in 1000-facher Vergrößerung mit Ölimmersion mikroskopisch differenziert. Das manuelle Differenzierungsergebnis wurde in Prozent angegeben.

3.1.7.1 Färbereagezien

Zur Beurteilung der Richtigkeit des automatisch erstellten Differenzialblutbildes (A-Diff.) bei ADVIA 120 und H*1 bzw. der Retikulozytenzählung beim ADVIA 120 wurden Blutausstriche unter Verwendung der folgenden Färbungen manuell differenziert (M-Diff.).

Für die Untersuchungen wurden nachfolgend aufgeführte Reagenzien benötigt:

Panoptische Färbung nach Pappenheim (PAN)

- May-Grünwald-Lösung Nr. 1424 (Firma Merck, Darmstadt)
- Giemsa-Lösung Nr. 9204 (Firma Merck, Darmstadt)
- Deckmittel Entelan (Firma Merck, Darmstadt)

Alpha-Naphtyl-Acetat-Esterase Färbung (ANAE)

- LeukoGnost EST Nr. 16301 (Firma Merck, Darmstadt)
- LeukoGnost-Fixiergemisch (Firma Merck, Darmstadt)
- Mayers Häkalaunlösung Nr. 9249 (Firma Merck, Darmstadt)
- Deckmittel Aquatex Nr. 8562 (Firma Merck, Darmstadt)

Peroxidase Färbung (POX)

- LeukoGnost POX Nr. 16303 (Firma Merck, Darmstadt)
- LeukoGnost-Fixiergemisch (Firma Merck, Darmstadt)
- Mayers Häkalaunlösung Nr. 9249 (Firma Merck, Darmstadt)
- Deckmittel Aquatex Nr. 8562 (Firma Merck, Darmstadt)

Retikulozytenfärbung (RETI)

- Supravitalfärbung Brillantkresylblau-Lösung
- Deckmittel Entelan (Firma Merck, Darmstadt)

3.1.7.2 Färbetechnik

Die Erstellung der 10 Blutausstriche pro Patient aus K-EDTA Vollblut erfolgte maximal 4-8 Stunden nach Blutentnahme. Nach Lufttrocknung (mind. 30 Min.) auf dem Objektträger wurden die entsprechenden Färbungen vorgenommen.

3.1.7.2.1 Panoptische Färbung nach Pappenheim (PAN)

Für die PAN-Färbung wurden die Blutausstriche 3 Minuten in unverdünnter May-Grünwald-Lösung (Nr. 1424, Fa. Merck, Darmstadt) gefärbt, anschließend in Aqua destillata 1 Minute gespült und mit Giemsa-Lösung (Nr. 9204, Fa. Merck, Darmstadt) in Verdünnung 1:20 gegengefärbt. Nach nochmaligem Spülen mit gepuffertem Aqua destillata wurde die Objektträgerrückseite gereinigt und die Ausstriche getrocknet. Im

Anschluss daran erfolgte eine Abdeckung der gefärbten Blutausstriche mittels Entelan (Nr. 1866, Fa. Merck Darmstadt) und Deckgläschen.

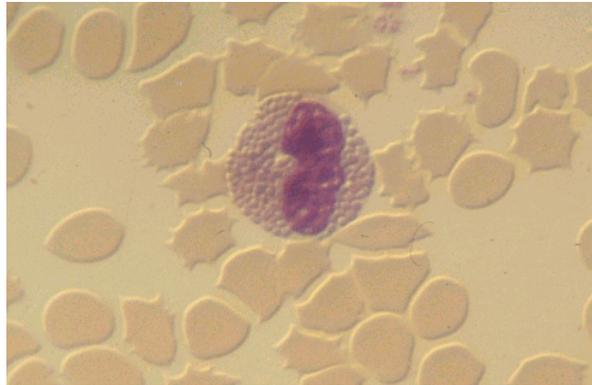


Abbildung 20: Zellbild PAN-Färbung Schwein-Nr. 214, eosinophiler Granulozyt

Zur weiteren Zelldifferenzierung kamen die folgenden zytochemischen Spezialfärbungen zum Einsatz.

3.1.7.2.2 Alpha-Naphtyl-Acetat-Esterase (ANAE)

Zur Erstellung einer ANAE-Färbung erfolgte zunächst eine Fixation der luftgetrockneten Blutausstriche in LeucoGnost[®]-Fixiergemisch. Nach einer Einwirkzeit von einer Minute wurden die Objektträger mit Leitungswasser abgespült (1 Min.) und in einer nach Herstellerangaben vorbereiteten Färbelösung im Dunkeln für zwei Stunden inkubiert. Die entsprechende Gegenfärbung erfolgte mit Mayers Hämalaunlösung für 30 Minuten. Das Abdecken der Objektträger mittels Deckglas und Aquatex geschah nach Trocknung, max. 5 Tage nach Färbung.

Beim Differenzieren erkennt man die Pferde- und Schweinemonozyten (Abb. 21) an einer roströtlichen, körnigen Färbung, während die Lymphozyten nur eine geringe punktuelle Anfärbung aufweisen.

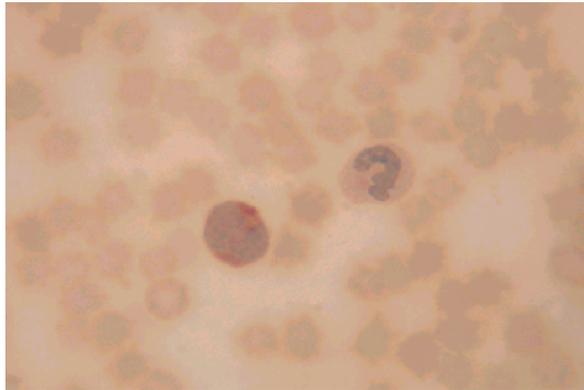


Abbildung 21: Zellbild ANAE-Färbung Schwein-Nr. 42, Monozyt und neutrophiler Granulozyt

3.1.7.2.3 Peroxidasefärbung (POX)

Nach Fixation des luftgetrockneten Blutausstriches, Spülen mit Leitungswasser (10 sec) werden die Objektträger für 10 Minuten in der nach Herstellerangaben bereiteten Färbelösung inkubiert. Es folgt nochmaliges Abspülen mit Aqua dest. (10 sec) und nach Lufttrocknung die Gegenfärbung mit Mayers Hämalaunlösung (3 Min).

Die Peroxidase-Reaktion, speziell die zytochemisch signifikante Myeloperoxidase-Reaktion, dient dem Nachweis myeloischer Zellpopulationen. Schwarz-braun gefärbte Granula der neutrophilen und der eosinophilen Population zeigen sich eindeutig peroxidase-positiv. Monozyten von Pferd und Schwein sind nur als selten schwach positiv zu erkennen, während lymphozytäre und erythropoetische Zellen immer peroxidase-negativ sind.

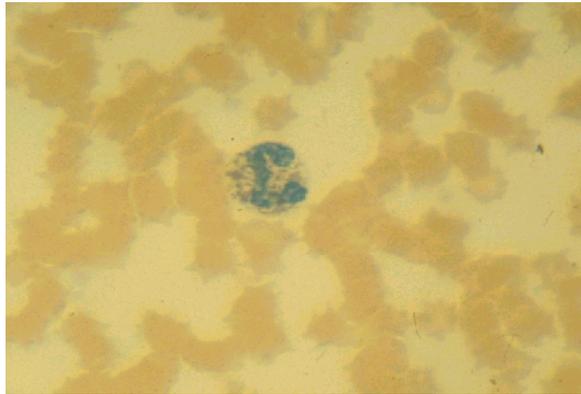


Abbildung 22: Zellbild POX-Färbung Pferd, neutrophiler Granulozyt

3.1.7.2.4 Retikulozytenfärbung (RETI)

Bei der Retikulozytenfärbung erfolgt das Ausstreichen der gefärbten unfixierten Zellen direkt auf dem Objektträger. Bei dieser sog. Vitalfärbung wird die "Substantia granulofilamentosa" als vereinzelte Körnchen oder spinnennetzartig angefärbt. Hierzu werden 100 µl EDTA-Vollblut in einem Reaktionsgefäß mit Brillantkresylblau-Lösung 20 Min. inkubiert danach auf einem Objektträger dünn ausgestrichen, getrocknet und abgedeckt.

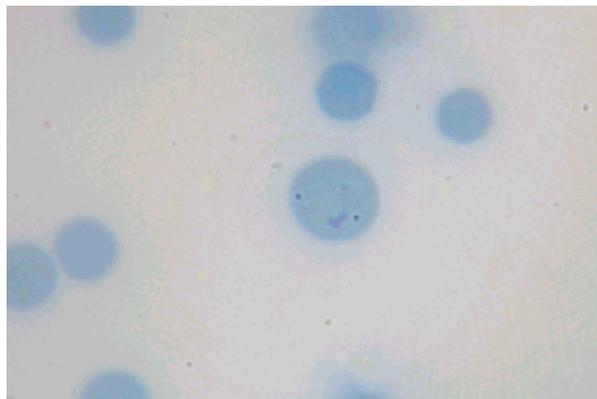


Abbildung 23: Zellbild Retikulozytenfärbung Brillantkresylblau Pferd-Nr. 139, makrozytärer Retikulozyt

Die nachfolgende Tabelle 15 zeigt eine Übersicht über die Anfärbbarkeit der verschiedenen Zellpopulationen bei Pferd und Schwein.

Tabelle 15: Übersicht der verwendeten manuellen Methoden zur Blutzelldifferenzierung bei Pferd und Schwein (modifiziert nach Schalm's Veterinary Hematology, 2000 Kapitel 51)

Zellpopulation	Färbeverfahren		
	Panoptische	Zytochemische	
	May-Grünwald	POX	ANAE
Neutrophile G.	+++	+++	--
Eosinophile G.	+++	+++	--
Basophile G.	+++	--	--
Lymphozyten	+++	--	+
Monozyten	+/-	--	+++

+++ = *sehr gute*; + = *gute*; +/- = *ungenau*; -- = *schlechte Färbeeigenschaften*

3.1.8 Softwareadaptation und Geräteevaluierung

Wie oben bereits erwähnt, ist aufgrund unterschiedlicher Morphologie der einzelnen Blutzellen von Tierpatienten eine speziesspezifische Anpassung automatisierter Hämatologiesysteme erforderlich.

Die Softwareadaptation des Hämatologiesystems ADVIA 120 erfolgte durch Herrn Dr. Zelmanovic (BAYER Co.), die begleitende Evaluation der neu erstellten Multi-Spezies Software gemäß der "Guidelines for the Evaluation of Blood Cell Analysers Including Those Used for Differential Leucocyte and Reticulocyte Counting and Cell Marker Applications" und des "Evaluationsprotokolls für hämatologische Zellzähl- und Zelldifferenzierungsgeräte".

Um eine Überprüfung der Einsatzfähigkeit der Softwareeinstellung des ADVIA 120 für die Tierarten Pferd und Schwein durchzuführen, wurde eine Voreinstellung für die

einzelnen Tierarten vorgenommen. Anhand von zunächst 100 Tieren pro Tierart wurde eine sog. Alpha-Site durchgeführt. Weitere Untersuchungsblöcke von rund 30 Tieren pro Softwareanpassungsperiode folgten. Die Entwicklungen aus diesen Untersuchungsblöcken sind im Ergebnisteil in Kap. 3.2 dargestellt. Die Gerätetechnische Hardware blieb nach einer ersten Überprüfung und Justierung während der Anpassung unverändert, lediglich die Software des computergesteuerten Systems wurde adaptiert.

Für die Tierarten Pferd und Schwein wurden die im Folgenden erläuterten Untersuchungen durchgeführt.

3.1.8.1 Präzision innerhalb der Serie und über verschiedene Serien hinweg

Die Präzision der Geräte ADVIA 120, H*1 und Sysmex F-800 wurde bei je 100 Pferden und Schweinen über verschiedene Serien hinweg anhand von Dreifach- (ADVIA 120) bzw. Doppelbestimmungen (H*1 und Sysmex F-800) ermittelt und daraus Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient (CV) berechnet. Beim Hämatologiesystem ADVIA 120 wurde weiterhin die Präzision für alle entnommenen Blutproben der einzelnen Softwareadaptationsblöcke zusätzlich bestimmt und außerdem eine Präzision innerhalb der Serie durch 25fache Wiederholungsmessung je einer Blutprobe von Pferd und Schwein durchgeführt.

3.1.8.2 Methodenvergleich

Im Methodenvergleich kamen insgesamt jeweils 200 K₃EDTA antikoagulierte Pferde- und Schweinevollblutproben zum Einsatz. Es erfolgte eine Gegenüberstellung der Messergebnisse für die Blutzellzählung und –differenzierung von ADVIA 120 mit den Referenz- und Vergleichsgeräten bzw. -methoden.

Blutzellzählung Pferd

Für die Parameter der Blutzellzählung beim Pferd dienten der Technicon H*1, der Sysmex F-800 und die Mikrohämatokritzentrifuge als Referenzgeräte.

Blutzellzählung Schwein

Für die Parameter der Blutzellzählung beim Schwein dienten der Sysmex F-800 und die Mikrohämatokritzentrifuge als Referenzgeräte. Der Technicon H*1 wurde als Vergleichsgerät eingesetzt.

Blutzelldifferenzierung Pferd und Schwein

Als Referenzmethode für die Parameter der Blutzelldifferenzierung diene die manuelle Differenzierung von luftgetrockneten Blutaussstrichen, die panoptisch (PAN), zytochemisch (ANAE, POX) und für die Retikulozytenzählung supraavital mit Brilliantkresylblau angefärbt wurden.

3.1.8.3 Linearität und Verschleppung

Für eine Beurteilung der gerätespezifischen Linearität und der Verschleppung (carry-over) am ADVIA 120 war eine besondere Präparation der Vollblutproben nötig.

Im ersten Schritt zur Linearitätsprüfung des roten Blutbildes (RBC/HGB) wurde eine Anreicherung von Erythrozyten (RBC) vorgenommen. Vier 10 ml K₃EDTA antikoagulierte Blutprobenröhrchen wurden bei 4°C für 25 Minuten mit einer Geschwindigkeit von 750 g (2300 U/Min) zentrifugiert. Das abpipettierte plättchenfreie Blutplasma wurde als 0%-Pool bezeichnet. Durch Vermischung eines Anteils des Sediments mit dem 0%-Pool wurde ein 100%-Pool mit einer Konzentration von ca. $12.0 \times 10^{12}/l$ RBC und die weiteren Verdünnungsstufen (je 1ml) 10%, 20%, 40%, 60% und 80% hergestellt.

Im zweiten Schritt zur Linearitätsprüfung des weißen Blutbildes und der Thrombozytenzählung (WBC/PLT) wurde für die K₃EDTA antikoagulierten Pferdeblutproben (80 ml) eine Zentrifugation mit 100 g (830 U/Min) bei Zimmertemperatur vorgenommen. Aufgrund der niedrigeren Blutsenkungsgeschwindigkeit beim Schwein, musste eine höhere Geschwindigkeit (15 Minuten bei 2000 U/Min) gewählt werden. Im Anschluss daran wurde das WBC und PLT-reiche Blutplasma abpipettiert und nochmals 10 Minuten bei 830 U/Min (Pferd) bzw. 3 Minuten bei 2500 U/Min (Schwein) zentrifugiert. Als Überstand erhielt man den 0%-Pool (zellarmes-freies Blutplasma) und aus dem Sediment wurden

durch Resuspension der 100%-Pool (Zellgehalt WBC mind. $100 \times 10^9/l$) und die Verdünnungsstufen 10%, 20%, 40%, 60% und 80% hergestellt.

Linearität und Verschleppung wurden in einem Arbeitsgang ermittelt. Es erfolgte zunächst die Bestimmung der Linearität durch direkt aufeinanderfolgende Doppelmessungen der einzelnen Verdünnungsstufen aufsteigend. Direkt im Anschluss erbrachte die Untersuchung des „carry over“ eine Aussage über den Anteil der Verschleppung einzelner Probenbestandteile. Hierbei folgten 7-mal jeweils einer 100%-Pool-Messung zwei 0%-Pool-Messungen.

3.1.8.4 Antikoagulanzenvergleich

Ein Vergleich der Antikoagulanzen K_3 EDTA, Na- Citrat und Li-Heparin wurde für 7 Pferde- (Tier-Nr. 205 - 211) bzw. 10 Schweinevollblutproben (Tier-Nr. 222 - 231) durchgeführt. In aufeinanderfolgenden Messungen sollte ihr Einfluss auf die Messergebnisse der beiden Hämatologiesysteme ADVIA 120 und H*1 überprüft werden.

3.1.8.5 Blutalterung und Lagerungstemperatur

Zur Ermittlung der Stabilität der einzelnen Zellpopulationen über einen bestimmten Zeitraum und dem Einfluss der Lagerungstemperatur wurden Verlaufsuntersuchungen über 72 Stunden mit je 10 Probanden pro Tierart durchgeführt. Hierbei erfolgte die Messung der Pferdeblutproben zum Zeitpunkt 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 Stunden, die Ermittlung der Blutalterung für Schweineblutproben an den Messzeitpunkten 0, 3, 9, 12, 24, 36, 48 und 72 Stunden. Die Proben wurden zu gleichen Teilen bei Zimmertemperatur (22°C) und im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt. „Warme“ und „Kalte“ Proben wurden im Block direkt hintereinander gemessen.

3.1.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Messergebnisse erfolgte unter Verwendung des Statistikprogramms BMDP/Dynamic Release 7.0 (DIXON 1993) am Institut für Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der

Justus-Liebig-Universität Gießen (Leitung: Dr. K. Failing). Ein Teil der Auswertungen wurden mit Microsoft Excel 97 erstellt.

Für Parameter die nicht in einer Normalverteilung vorlagen, wurde eine *Logarithmierung* der Werte durchgeführt.

Unter Verwendung der *einfaktoriellen Varianzanalyse* (BMDP2V) erfolgte die statistische Prüfung der Wiederholungsmessungen (Präzision). Hierbei wurden der arithmetische Mittelwert (\bar{x}), die Standardabweichung (SD), der Variationskoeffizient (CV) bzw. bei schiefverteilten, logarithmierten Werten der Streufaktor (SF) ermittelt. Beide Faktoren (CV und SF) stellen ein Maß für die Streuung der Messwerte vom Mittelwert dar und werden in Prozent angegeben.

Für den Methodenvergleich wurde eine *Korrelationsanalyse* (BMDP6D) nach Pearson erstellt, die unter Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) und der Hauptkomponentengleichung ($y = mx + b$) eine Beurteilung der Nähe des Zusammenhangs zwischen Blutanalysen des ADVIA 120 und den Referenzmethoden erlaubt. Mit dem *t-test für verbundene Stichproben* (BMDP3D) wurden die Mittelwertunterschiede auf signifikante Abweichungen überprüft. Für Parameter mit nicht-normalverteilten Differenzen kam der Wilcoxon-Test zum Einsatz.

Die p-Werte (Signifikanzen) wurden wie folgt interpretiert:

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

Die statistische Beurteilung der Linearität konnte aufgrund der äußerst geringen Varianz zwischen den Wiederholungsmessungen der einzelnen Verdünnungsstufen nicht anhand des Varianzquotiententestes (F-Testes) durchgeführt werden. Alternativ hierzu wurden deshalb die Korrelationskoeffizienten (r) und die Hauptkomponentengleichung ($y=mx+b$) berechnet. Die Kalkulation der

Verschleppung (%) erfolgte mittels der folgenden Formel (WATSON und DAVIS, 1987):

$$(\bar{X}_{n_1} - \bar{X}_{n_2} / \bar{X}_H) * 100$$

\bar{X}_{n_1} = arithmetischer Mittelwert 0%-Pool 1; \bar{X}_{n_2} = arithmetischer Mittelwert 0%-Pool 2;
 \bar{X}_H = arithmetischer Mittelwert 100%-Pool

Die Ermittlung des Einflusses der einzelnen Antikoagulanzen erfolgte mittels *einfaktorieller Varianzanalyse* mit Messwiederholungen im Faktor Antikoagulanz (BMDP2V) und einem paarweisem Vergleich anhand des *t-tests für verbundene Stichproben* unter Anwendung des vergleichsbezogenen Signifikanzniveaus (*Bonferroni-Adjustierung*).

Eine *zweifaktorielle Varianzanalyse* mit Messwiederholungen in den Faktoren Temperatur und Zeit (BMDP2V) diente zur Darstellung der Einflüsse von Blotalterung und Temperatur auf die Parameter der Blutzellzählung und Blutzelldifferenzierung. Berechnet wurden Mittelwert (\bar{x}) mit Standardabweichung (SD) und die absolute und prozentuale Abweichung vom Ausgangswert.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Evaluierung des Hämatologiesystems ADVIA 120

Die Evaluierung des ADVIA 120 für Pferde- und Schweineblut wurde in vier Schritten vorgenommen. Es erfolgte eine Anpassung der gerätespezifischen Multi-Spezies-Software. Im Folgenden sind diese Abschnitte in Softwareversion I bis IV eingeteilt.

3.2.1.1 Präzision

3.2.1.1.1 Präzision Advia 120

Die Überprüfung der Messpräzision der eingesetzten Geräte (ADVIA 120, H*1 und F-800) mittels Pferde- und Schweineblut erfolgte gemäß dem Evaluationsprotokoll als Präzision innerhalb (nur ADVIA 120) und als Präzision über verschiedene Serien hinweg (ADVIA 120, H*1 und F-800).

Im folgenden Abschnitt sind zunächst die Ergebnisse der Präzision innerhalb der Serie dargestellt. Um eine bessere Übersicht zu gewährleisten, werden Blutzellzählung und Blutzelldifferenzierung nacheinander abgehandelt.

3.2.1.1.1.1 Präzision innerhalb der Serie

Parameter der Blutzellzählung

In Tabelle 16 sind die Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse für die Blutzellzählung der Tierarten Pferd und Schwein am ADVIA 120 dargestellt. Angeben werden der arithmetische Mittelwert \bar{x} , die Streuung (Standardabweichung) innerhalb einer Probe (SD_{in}) und der Variationskoeffizient (Streuung um den Mittelwert) in %.

Tabelle 16: Präzision des ADVIA 120 innerhalb der Serie für die Parameter der Blutzellzählung bei den Tierarten Pferd und Schwein; $n = 1$; $\bar{x} \pm SD_{in}$ = Mittelwert \pm Standardabweichung innerhalb einer Probe bei 25fach Messung, CV = Variationskoeffizient in %

Parameter	Pferd			Schwein		
	$\bar{x} \pm SD_{in}$	CV %		$\bar{x} \pm SD_{in}$	CV %	
WBC $10^9/l$	9,13 \pm 0,16	1,7		14,98 \pm 0,51	3,40	
RBC $10^{12}/l$	10,89 \pm 0,19	1,77		6,73 \pm 0,06	0,94	
HGB mmol/l	10,39 \pm 0,11	1,03		7,13 \pm 0,08	1,11	
HCT l/l	0,45 \pm 0,01	1,38		0,35 \pm 0,00	1,10	
MCV fl	41,14 \pm 0,52	1,27		52,10 \pm 0,37	0,71	
MCH fmol	0,95 \pm 0,01	1,05		1,06 \pm 0,02	1,52	
MCHC mmol/l	23,20 \pm 0,21	0,91		20,30 \pm 0,32	1,59	
CHCM mmol/l	24,93 \pm 0,46	1,85		20,50 \pm 0,21	1,05	
RDW %	19,25 \pm 0,07	0,36		16,54 \pm 0,08	0,47	
HDW mmol/l	1,58 \pm 0,04	2,38		1,10 \pm 0,01	1,23	
PLT $10^9/l$	103,40 \pm 5,57	5,38		438,08 \pm 12,50	2,85	
MPV fl	7,30 \pm 0,41	5,6		5,64 \pm 0,15	2,61	
PDW %	41,73 \pm 9,81	23,51		123,88 \pm 4,24	3,42	
Retikulozyten %	0,06 \pm 0,05	92,8		0,79 \pm 0,08	9,8	
Retikulozyten $10^9/l$	6,58 \pm 3,01	45,8		53,23 \pm 4,17	7,83	

Die in Tabelle 16 dargestellten Variationskoeffizienten für die gemessenen Parameter des roten Blutbildes ergeben eine sehr gute Präzision für beide untersuchten Tierarten (Pferd $CV \leq 2,38\%$, Schwein $CV \leq 1,59\%$). Sehr gut liegen die Streuwerte beim WBC des Pferdes mit $CV = 1,77\%$ und gut beim Schwein mit $CV = 3,40\%$. Für die Thrombozytenzählung wird beim Pferd mit $CV = 5,38\%$ eine für

diese Zellpopulation sehr gute und für das Schwein mit $CV = 2,85\%$ ein herausragende Präzision innerhalb einer Probe erreicht.

Erhebliche Unterschiede der Streubreite sind für die Retikulozytenzählung zu erkennen. Während die beim Pferd im Mittel mit $6,58 \cdot 10^9/l$ deutlich weniger vertretene (eher selten bis gar nicht vorkommende) Retikulozytenpopulation einen CV von $45,8\%$ aufweist, kann für das Schwein eine Variation von $CV = 7,83\%$ bescheinigt werden. Im Vergleich hierzu ergaben Untersuchungen mit humanen Blutproben am ADVIA 120 Variationskoeffizienten von $CV = 13,3\%$ (ADVIA 120 Benutzerhandbuch).

Parameter der Blutzelldifferenzierung

Die folgende Tabelle 17 zeigt die Auswertung der Präzision des ADVIA 120 für die relativen und absoluten Werte der Leukozytendifferenzierung. Zunächst ist festzustellen, dass die Streuung der absoluten Werte geringgradig über denen der relativen Werte liegt. Insgesamt zeigt sich eine gute bis sehr gute (Pferd $CV \leq 2,0\%$) Reproduzierbarkeit der Messwerte für die Parameter neutrophile Granulozyten und Lymphozyten. Akzeptabel erscheinen die Variationskoeffizienten der eosinophilen Granulozyten (Pferd $CV = 7,7\%$; Schwein $CV = 9,8\%$), mit einem Mittelwert von $0,30 \cdot 10^9/l$. Erwartungsgemäß mäßig bis schlecht erscheint die Präzision für Monozyten (Schwein $CV = 14,2\%$), basophile Granulozyten (Pferd $CV = 20,2\%$) und LUC (Pferd $CV = 26,6\%$).

Tabelle 17: Präzision des ADVIA 120 innerhalb der Serie für die Parameter der Blutzellendifferenzierung bei den Tierarten Pferd und Schwein;
 $n = 1$; $\bar{x} \pm SD_{in}$ = Mittelwert \pm Standardabweichung innerhalb einer Probe bei 25fach-Messung, CV = Variationskoeffizient in %

Parameter	Pferd			Schwein		
	$\bar{x} \pm SD_{in}$		CV %	$\bar{x} \pm SD_{in}$		CV %
Neutrophile G. %	45,08	\pm 0,62	1,37	46,48	\pm 2,29	4,93
Lymphozyten %	46,45	\pm 0,82	1,76	44,13	\pm 2,73	6,20
Monozyten %	4,06	\pm 0,55	13,52	4,41	\pm 0,56	12,58
Eosinophile G. %	3,16	\pm 0,23	7,22	2,03	\pm 0,20	9,80
Basophile G. %	0,63	\pm 0,14	21,95	1,00	\pm 0,15	14,95
LUC %	0,63	\pm 0,12	19,34	1,96	\pm 0,53	27,31
Neutrophile G. $10^9/l$	4,11	\pm 0,08	2,06	6,96	\pm 0,38	5,49
Lymphozyten $10^9/l$	4,24	\pm 0,08	1,95	6,61	\pm 0,51	7,75
Monozyten $10^9/l$	0,37	\pm 0,05	14,24	0,66	\pm 0,08	12,47
Eosinophile G. $10^9/l$	0,29	\pm 0,02	7,69	0,30	\pm 0,03	9,81
Basophile G. $10^9/l$	0,06	\pm 0,01	20,24	0,15	\pm 0,02	15,83
LUC $10^9/l$	0,06	\pm 0,01	17,33	0,29	\pm 0,08	26,57

3.2.1.1.1.2 Präzision über verschiedene Serien hinweg

Zur Veranschaulichung der Softwareanpassung des ADVIA 120 wurde die Messpräzision über verschiedene Serien hinweg für jede untersuchte Softwareversion (I bis IV) separat berechnet. Im Folgenden sind der Variationskoeffizient (CV) bzw. analog dazu bei log-normalverteilten Werten der Streufaktor (SF) der Versionen I, II, III und IV in Prozent angegeben. Es erfolgt zunächst die Darstellung der Softwareanpassung (Adaptation), der Vergleich der eingesetzten Geräte und im Anschluss daran der Vergleich der beiden Tierarten.

Parameter der Blutzellzählung

In den nachfolgenden Abbildungen 24 und 25 werden die Veränderungen der Präzision von Software I und IV für Pferde- und Schweineblut gegenübergestellt. Alle dargestellten Parameter des roten Blutbildes sowie der des WBC bewegen sich nach Softwareanpassung unterhalb von $CV \leq 1,9\%$. Die kleinste Streubreite erreicht der MCV mit $CV = 0,2\%$ für beiden Tierarten. Ein sehr gutes Anpassungsergebnis der Präzision kann für die Thrombozytenzählung und -Indizes beschrieben werden. Hierbei reduziert sich die Variation um mehr als 50% auf Werte von $CV \leq 4,6\%$ (Schwein) für PLT und für das MPV (mittleres Thrombozytenvolumen) auf Werte um $CV \leq 2,4\%$. Die mittlere Thrombozytenverteilungsbreite (PDW) ist mit $CV = 6,5\%$ (Pferd) und $CV = 4,5\%$ (Schwein) auf einen akzeptablen Streubereich gesunken.

Präzision Pferd Software I / IV

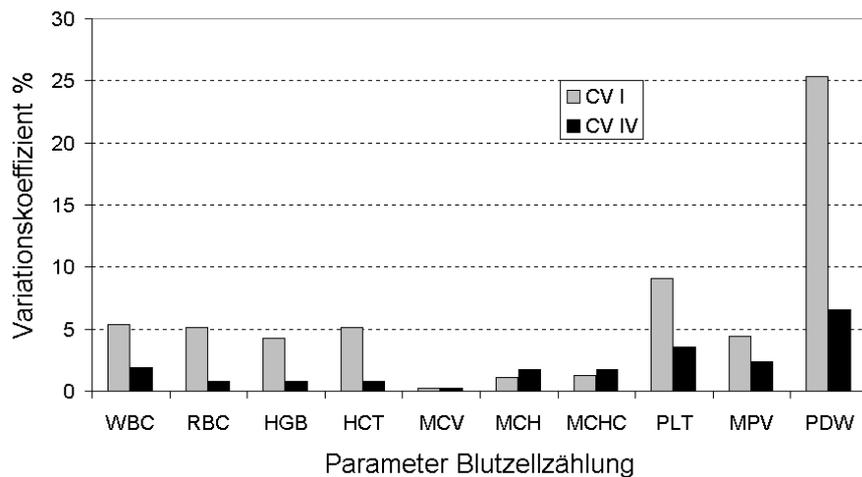


Abbildung 24: Vergleich der Präzision der Softwareversionen I und IV des ADVIA 120 für Parameter der Blutzellzählung beim Pferd (Dreifachmessung); Version I (n=100), Version IV (n=30); CV = Variationskoeffizient in %

Präzision Schwein Software I / IV

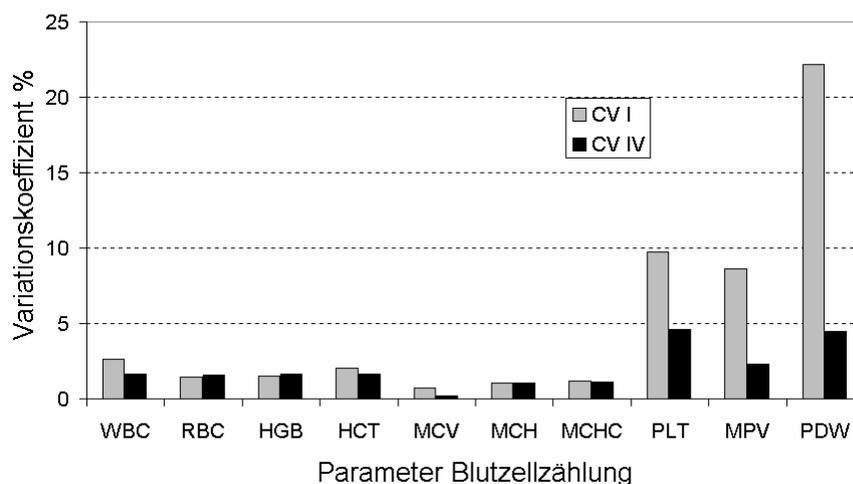


Abbildung 25: Vergleich der Präzision der Softwareversionen I und IV des ADVIA 120 für Parameter der Blutzellzählung beim Schwein (Dreifachmessung); Version I (n=100), Version IV (n=30); CV = Variationskoeffizient in %

Tabelle 18 ergänzt die oben dargestellten Diagramme mit einer Übersicht der Variationskoeffizienten der Softwareversionen I, II, III und IV.

Tabelle 18: Präzisionen der Softwareversion I bis IV des **ADVIA 120** über verschiedene Serien hinweg für die Parameter der Blutzellzählung bei den Tierarten Pferd und Schwein; n = 30; $\bar{x} \pm SD_{in}$ = Mittelwert \pm Standardabweichung innerhalb einer Probe bei Dreifachmessung, CV = Variationskoeffizient in %

Parameter	Pferd				Schwein			
	CV (%), Softwareversion I-IV				CV (%), Softwareversion I-IV			
	I n=105	II n=36	III n=31	IV n=30	I n=100	II n=39	III n=32	IV n=30
WBC 10 ⁹ /l	5,4	2,6	1,8	1,9	2,7	1,6	5,2	1,7
RBC 10 ¹² /l	5,1	4,2	2,0	0,8	1,4	1,5	**	1,6
HGB mmol/l	4,3	3,6	2,1	0,8	1,5	0,9	**	1,7
HCT l/l	5,1	4,4	1,9	0,8	2,0	1,5	**	1,7
MCV fl	0,3	0,4	0,3	0,2	0,7	0,2	0,3	0,2
MCH fmol	1,1	1,0	1,4	1,7	1,1	1,3	1,8	1,1
MCHC mmol/l	1,2	1,1	1,3	1,8	1,2	1,2	1,9	1,1
CHCM mmol/l	0,3	0,4	0,3	0,3	0,8	0,3	0,3	0,3
RDW %	0,6	0,7	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,6
HDW mmol/l	0,9	4,7	0,7	0,7	1,1	0,9	0,9	0,8
PLT 10 ⁹ /l	9,1	4,7	5,6	3,6	9,8	7,5	11,4	4,6
MPV fl	4,4	4,2	3,1	2,4	8,6	4,7	6,7	2,3
PDW %	25,3	25,0	10,4	6,5	22,2	10,3	6,9	4,5
IReti %	27,7	42,6	34,1	41,9	6,1	5,6	7,0	9,1
IReti 10 ⁹ /l	28,9	49,3	57,8	75,5	6,1	5,9	7,8	9,4

** nicht durchgeführt

Tabelle 19: Präzision der Softwareversion IV des **ADVIA 120** über verschiedene Serien hinweg für die Parameter der Blutzellzählung bei den Tierarten Pferd und Schwein; $n = 30$; $\bar{x} \pm SD_{in}$ = Mittelwert \pm Standardabweichung innerhalb einer Probe bei Dreifachmessung; CV = Variationskoeffizient in %.

Parameter	Pferd			Schwein		
	$\bar{x} \pm SD_{in}$		CV IV %	$\bar{x} \pm SD_{in}$		CV IV %
WBC $10^9/l$	8,01	$\pm 0,15$	1,9	17,17	$\pm 0,28$	1,7
RBC $10^{12}/l$	8,36	$\pm 0,07$	0,8	7,97	$\pm 0,13$	1,6
HGB mmol/l	8,21	$\pm 0,07$	0,8	8,59	$\pm 0,14$	1,7
HCT l/l	0,35	$\pm 0,003$	0,8	0,43	$\pm 0,01$	1,7
MCV fl	42,05	$\pm 0,09$	0,2	54,56	$\pm 0,12$	0,2
MCH fmol	0,99	$\pm 0,02$	1,7	1,08	$\pm 0,01$	1,1
MCHC mmol/l	23,56	$\pm 0,42$	1,8	19,85	$\pm 0,23$	1,1
CHCM mmol/l	25,06	$\pm 0,07$	0,3	20,38	$\pm 0,06$	0,3
RDW %	18,86	$\pm 0,09$	0,5	17,39	$\pm 0,10$	0,6
HDW mmol/l	1,44	$\pm 0,01$	0,7	1,18	$\pm 0,01$	0,8
PLT $10^9/l$	148,9	$\pm 5,28$	3,6	365,9	$\pm 16,93$	4,6
MPV fl	7,33	$\pm 0,18$	2,4	8,07	$\pm 0,19$	2,3

In Tabelle 19 werden die im Endergebnis (Software IV) vorliegenden Variationskoeffizienten von Pferd und Schwein gegenübergestellt. Angegeben sind außerdem der Mittelwert der Messgröße (\bar{x}) und die Streuung (Standardabweichung SD_{in}) um den Mittelwert. Im Mittel zeigen die Ergebnisse der Tierart Pferd mit einem WBC von $8,01 \times 10^9/l$ einen deutlich niedrigeren Messbereich als diejenigen der Tierart Schwein mit einem WBC von $17,17 \times 10^9/l$. Das mittlere Volumen der Pferderythrozyten liegt hier bei 42,05 fl, das der Schweineerythrozyten bei 54,56 fl.

Die gemessenen Schweineblutproben ergeben im Mittel eine Thrombozytenzahl von $365,9 \cdot 10^9/l$ während die untersuchten Pferde im Mittel $148,9 \cdot 10^9/l$ besitzen.

Für alle angegebenen Parameter zeigt der ADVIA 120 eine ausgezeichnete Messpräzision für beide Tierarten.

Parameter der Blutzelldifferenzierung

Nachfolgende Diagramme in Abbildung 26 und 27 zeigen die Anpassung der Software für die Blutzelldifferenzierung bei Pferd und Schwein. Zu erkennen ist eine deutliche Abnahme des Streufaktors in der Softwareversion IV (nach Adaptation) für alle Leukozytenpopulationen mit Ausnahme des LUC, deren Streuung etwa gleichbleibt und der basophilen Granulozyten, die beim Pferd eine Streubreite von knapp über 30% zeigen. Für basophile Granulozyten wurde in der ersten Softwareversion eine zu hohe Zellzahl (Pseudobasophilie von im Mittel 11,3%) für Pferdeblut ermittelt. Aufgrund der Einstellung der Software zur letztlich "wahren" Basophilenzahl erhält man in der End-Softwareversion IV eine größere Streuung, die auf geringeres Zellaufkommen zurückzuführen ist. Der Mittelwert liegt bei einer Zellzahl von $0,03 \cdot 10^9/l$.

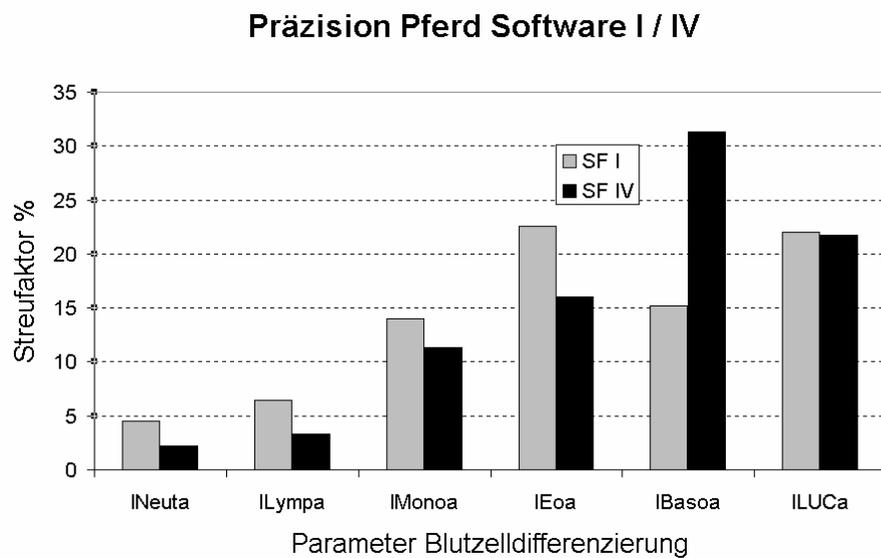


Abbildung 26: Vergleich der Präzision der Softwareversionen I und IV des ADVIA 120 für die absoluten Zahlen der Blutzellendifferenzierung beim Pferd (Dreifachmessung); Version I (n=100), Version IV (n=30); SF = Streufaktor in %

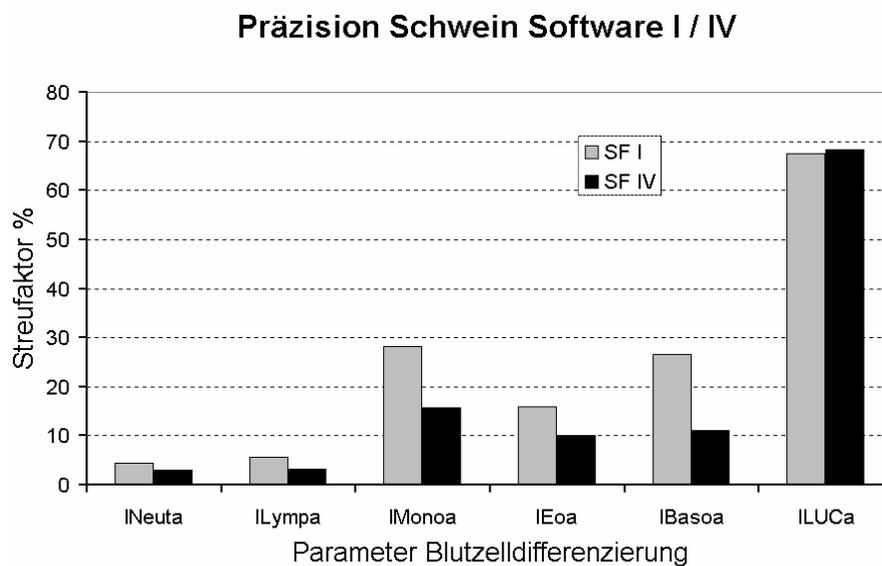


Abbildung 27: Vergleich der Präzision der Softwareversionen I und IV des ADVIA 120 für die absoluten Zahlen der Blutzellendifferenzierung beim Schwein (Dreifachmessung); Version I (n=100), Version IV (n=30); SF = Streufaktor in %

Tabelle 20: Präzision der Softwareversion IV des **ADVIA 120** über verschiedene Serien hinweg für die Parameter der Blutzelldifferenzierung bei den Tierarten Pferd und Schwein; $n = 30$; $\bar{x} \pm SD_{in}$ = Mittelwert \pm Standardabweichung innerhalb einer Probe bei Zweifachmessung; CV = Variationskoeffizient in %; \bar{x}_g = geometrischer Mittelwert; SF = Streufaktor (für log-normalverteilte Parameter)

Parameter	Pferd			Schwein		
	$\bar{x} \pm SD_{in}$	\bar{x}_g	CV IV %	$\bar{x} \pm SD_{in}$	\bar{x}_g	CV IV %
Neutrophile G. %	59,27 \pm 0,74		1,25	37,57 \pm 0,94		2,5
Lymphozyten %	33,47 \pm 0,61		1,81	51,88 \pm 1,17		2,3
Monozyten* %	4,62		10,67	4,61		15,5
Eosinophile G.* %	1,03		16,83	2,00		10,4
Basophile G.* %	0,38		29,55	0,96		11,4
LUC* %	0,59		23,7	0,91		68,3
Neutrophile G.* $10^9/l$	4,50		2,21	5,73		3,0
Lymphozyten* $10^9/l$	2,35		3,3	8,42		3,2
Monozyten* $10^9/l$	0,36		11,34	0,78		15,6
Eosinophile G.* $10^9/l$	0,08		16,03	0,34		10,0
Basophile G.* $10^9/l$	0,03		31,28	0,16		11,1
LUC* $10^9/l$	0,05		21,7	0,15		68,2

* Parameter ist log-normalverteilt; Angabe \bar{x}_g = geometrischer Mittelwert und Streufaktor in %

Im folgenden Abschnitt soll die Messpräzision der Vergleichgeräte aufgezeigt werden.

3.2.1.1.2 Präzision Technicon H*1

Die Überprüfung der Messpräzision des Technicon H*1 für Pferde- und Schweineblut erfolgte anhand von Zweifachmessungen. Pferdeblut wurde in der Softwareeinstellung "Pferd", Schweineblut (wegen fehlender Software) in der Voreinstellung für die Tierart "Ratte" gemessen.

Parameter der Blutzellzählung

Beim Vergleich der Ergebnisse der Varianzanalyse (Tabelle 21) ist festzustellen, dass sich der **H*1** ebenfalls durch eine gute bis sehr gute Messpräzision für beide Tierarten auszeichnet. Die Messergebnisse liegen mit $CV = 2,5\%$ (Pferd) und $CV = 3,0\%$ (Schwein) für den WBC ebenso, wie die Parameter des roten Blutbildes mit $CV \leq 1,5\%$ (Pferd) und $CV \leq 1,8\%$ (Schwein), in einem sehr guten Bereich. Für die Thrombozytenzählung werden diese Werte nicht erreicht, sie liegen hier aufgrund der begrenzten Messtechnik bei $CV = 4,7\%$ für Pferdeblut und $CV = 5,8\%$ für Schweineblut.

Tabelle 21: Präzision des H*1 über verschiedene Serien hinweg für die Parameter der Blutzellzählung bei den Tierarten Pferd und Schwein; n = 100; $\bar{x} \pm SD_{in}$ = Mittelwert \pm Standardabweichung innerhalb einer Probe bei Zweifachmessung; CV = Variationskoeffizient in %.

Parameter	Pferd			Schwein		
	$\bar{x} \pm SD_{in}$		CV %	$\bar{x} \pm SD_{in}$		CV %
WBC 10 ⁹ /l	8,36	\pm 0,21	2,5	15,08	\pm 0,45	3,0
RBC 10 ¹² /l	8,19	\pm 0,10	1,3	7,48	\pm 0,12	1,6
HGB mmol/l	8,41	\pm 0,13	1,5	8,46	\pm 0,1	1,2
HCT l/l	0,362	\pm 0,01	1,5	0,44	\pm 0,01	1,8
MCV fl	44,43	\pm 0,19	0,4	58,62	\pm 0,25	0,4
MCH fmol	1,03	\pm 0,01	0,8	1,13	\pm 0,01	0,9
MCHC mmol/l	23,24	\pm 0,20	0,9	19,34	\pm 0,2	1,1
RDW %	17,77	\pm 0,23	1,3	16,67	\pm 0,19	1,1
HDW mmol/l	1,27	\pm 0,02	1,5	1,11	\pm 0,01	1,2
PLT 10 ⁹ /l	145,46	\pm 6,78	4,7	239,45	\pm 13,9	5,8
MPV fl	5,80	\pm 0,25	4,4	6,55	\pm 0,17	2,6
PDW %	53,43	\pm 1,73	3,2	47,28	\pm 1,58	3,3

Parameter der Blutzelldifferenzierung

In gleicher Weise sind die Ergebnisse der Präzision für die Blutzelldifferenzierung am H*1 in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: Präzision des **H*1** über verschiedene Serien hinweg für die Parameter der Blutzellendifferenzierung bei den Tierarten Pferd und Schwein; $n = 100$; $\bar{x} \pm SD_{in}$ = Mittelwert \pm Standardabweichung innerhalb einer Probe bei Zweifachmessung; CV = Variationskoeffizient in %; \bar{x}_g = geometrischer Mittelwert; SF = Streufaktor (für log-normalverteilte Parameter)

Parameter	Pferd			Schwein		
	$\bar{x} \pm SD_{in}$; \bar{x}_g	CV %		$\bar{x} \pm SD_{in}$; \bar{x}_g	CV %	
Neutrophile G. %	59,90 \pm 1,43	2,4		43,41 \pm 3,14	7,2*	
Lymphozyten %	30,50 \pm 1,81	5,9		48,69 \pm 3,82	7,8*	
Monozyten* %	4,89*	17,2*		2,24*	26,4*	
Eosinophile G.* %	1,22*	20,4*		1,32*	38,7*	
Basophile G.* %	0,36*	31,2*		0,60*	16,8*	
LUC* %	1,78*	44,6*		2,32*	18,4*	
Neutrophile G.* $10^9/l$	4,76*	2,8*		-	-	
Lymphozyten* $10^9/l$	2,32*	7,7*		6,78*	14,1*	
Monozyten* $10^9/l$	0,40*	17,7*		0,33*	26,3*	
Eosinophile G.* $10^9/l$	0,10*	19,8*		0,19*	36,8*	
Basophile G.* $10^9/l$	0,03*	31,2*		0,09*	16,3*	
LUC* $10^9/l$	0,15*	51,2*		0,34*	19,8*	

* Parameter ist log-normalverteilt; Angabe \bar{x}_g = geometrischer Mittelwert und Streufaktor in %

3.2.1.1.3 Präzision Sysmex F-800

Die Präzision des Sysmex F-800 (Tab. 23) wurde anhand von Doppelbestimmungen der Pferde- und Schweineblutproben überprüft.

Tabelle 23: Präzision des **Sysmex F-800** über verschiedene Serien hinweg für die Parameter der Blutzellzählung bei den Tierarten Pferd (n = 36) und Schwein (n = 100); $\bar{x} \pm SD_{in}$ = Mittelwert \pm Standardabweichung innerhalb einer Probe bei Zweifachmessung, CV = Variationskoeffizient in %.

Parameter	Pferd			Schwein		
	$\bar{x} \pm SD_{in}$		CV %	$\bar{x} \pm SD_{in}$		CV %
WBC 10 ⁹ /l	8,37	\pm 0,13	1,6	16,17	\pm 0,43	2,7
RBC 10 ¹² /l	6,93	\pm 0,06	0,9	7,4	\pm 0,06	0,8
HGB mmol/l	7,70	\pm 0,05	0,6	8,75	\pm 0,04	0,5
HCT l/l	0,33	\pm 0,00	1,2	0,45	\pm 0,01	1,2
MCV fl	47,43	\pm 0,52	1,1	60,98	\pm 0,53	0,9
MCH fmol	1,12	\pm 0,02	2,0	1,186	\pm 0,01	1,0
MCHC mmol/l	23,53	\pm 0,51	2,2	19,47	\pm 0,21	1,1
RDW %	19,75	\pm 0,23	1,1	17,50	\pm 0,20	1,2
PLT 10 ⁹ /l	183,54	\pm 8,33	4,5	250,52	\pm 7,65	3,1
MPV fl	7,81	\pm 0,13	1,7	9,75	\pm 0,16	1,6

3.2.1.2 Methodenvergleich

Die Überprüfung der Richtigkeit (accuracy) von Messergebnissen des ADVIA 120 gegenüber den Vergleichs- und Referenzgeräten stellt den nächsten Schritt der Softwareanpassung und Evaluierung dar. Zuerst werden wieder die Parameter der Blutzellzählung abgehandelt. In der Darstellung folgen Pferd und Schwein vergleichend hintereinander. Im Anschluss folgen die Parameter der Blutzelldifferenzierung nach dem gleichen Schema. Aus Gründen zur Wahrung der Übersichtlichkeit werden hauptsächlich ausgesuchte Diagramme der I. und IV. Softwareversion dargestellt.

3.2.1.2.1 Parameter der Blutzellzählung

3.2.1.2.1.1 Softwareadaptation ADVIA 120

Im Rahmen des Methodenvergleichs erfolgt zunächst die Darstellung der Softwareadaptation anhand von Balkendiagrammen für Pferd und Schwein. Gezeigt werden die Resultate der Korrelationsanalyse für die ausgewählten Parameter WBC, RBC, HGB, HCT, MCV und PLT der Vergleichsmessungen zwischen ADVIA 120 und H*1 und ADVIA 120 und Sysmex F-800.

Die in folgenden Diagrammen (Abb. 28 und 29) gezeigten Korrelationskoeffizienten für den Gerätevergleich ADVIA 120 / H*1 deuten bereits in der ersten Softwareversion für beide Tierarten (mit Ausnahme des PLT beim Schwein) auf einen guten Zusammenhang der Ergebnisse hin. Nach Anpassung der Software können diese sogar noch verbessert werden und liegen mit $r \geq 0,96$ für die dargestellten Parameter in einem excellenten Bereich. Auffällig ist die deutliche Steigerung der Korrelation für Schweinethrombozyten.

Ebenso deutlich zeigt sich der relativ schlechte Zusammenhang und die Reduzierung der Korrelation gegenüber dem Sysmex F-800 bezüglich der Thrombozyten beider Tierarten.

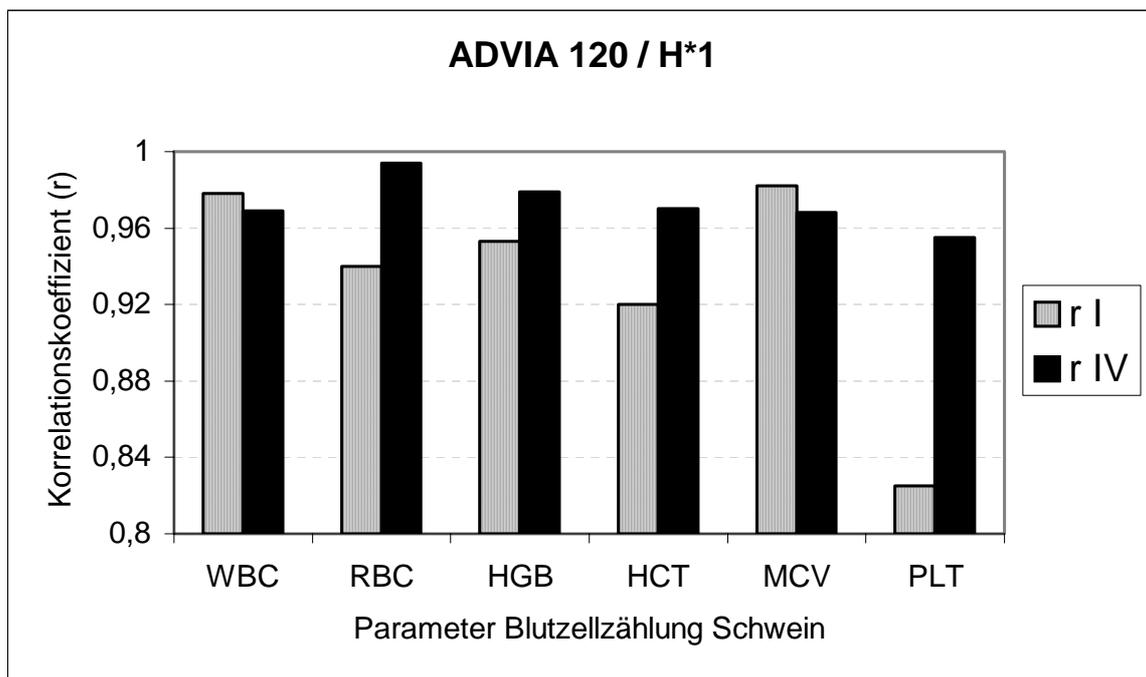
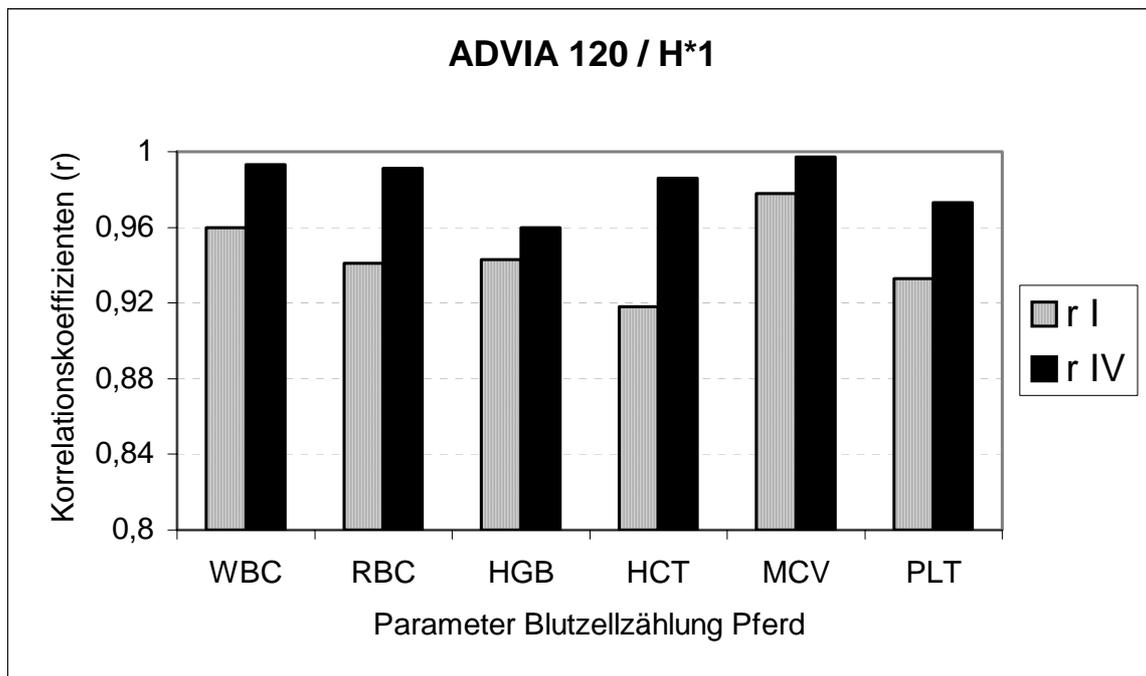


Abbildung 28: Vergleich der Korrelationen **Software I / Software IV** von ADVIA 120 und H*1 für die Blutzellzählung bei Pferd und Schwein

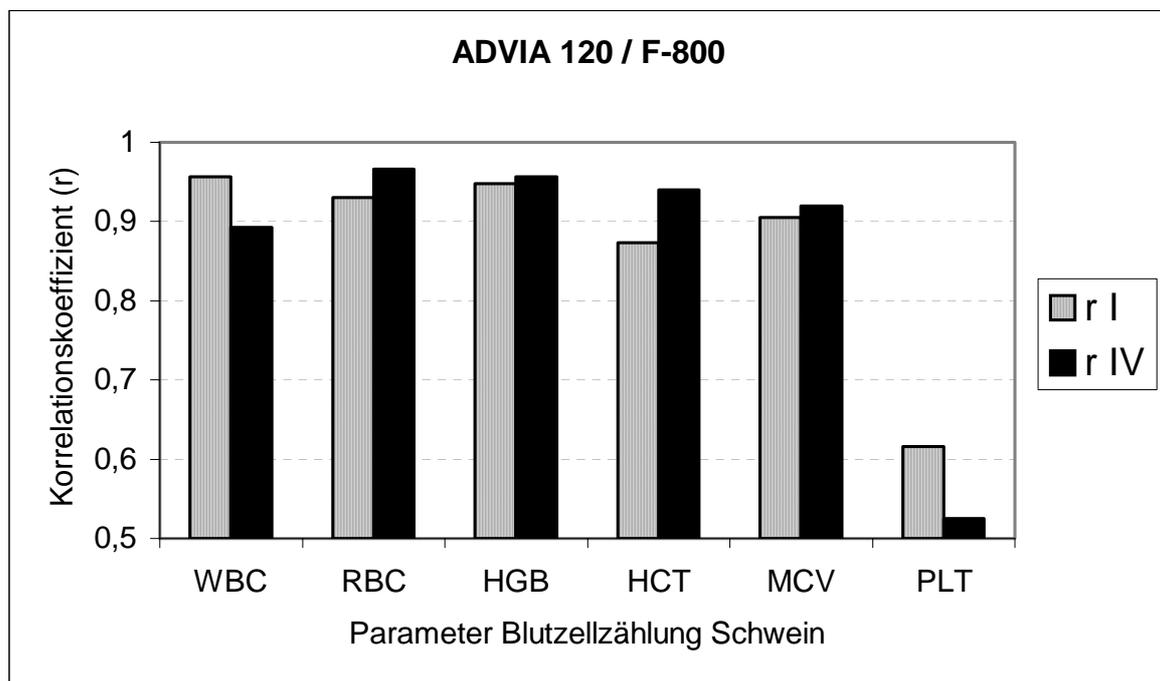
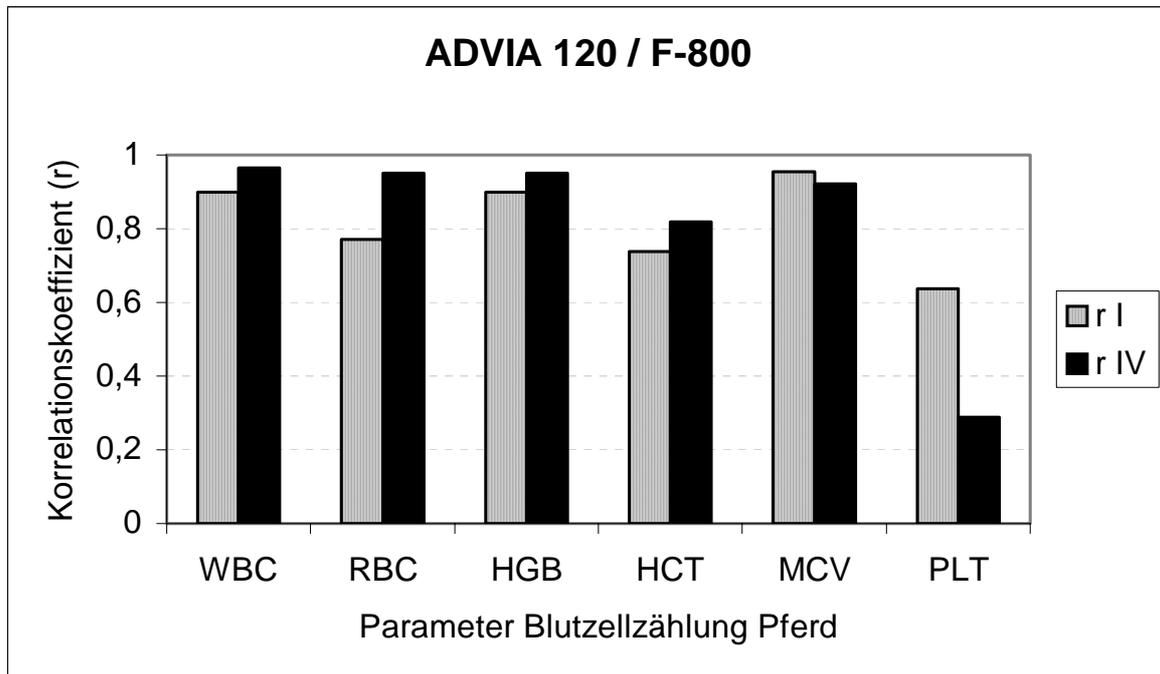


Abbildung 29: Vergleich der Korrelationen **Software I / Software IV** von ADVIA 120 und F-800 für die Blutzellzählung bei den Tierarten Pferd und Schwein

Die Tabellen 24 bis 27 geben eine Übersicht der Korrelationskoeffizienten des ADVIA 120 mit den einzelnen Vergleichsmethoden aller vier Softwareversionen im Verlauf der Evaluation.

Tabelle 24: Korrelationen des Methodenvergleichs ADVIA 120/ H*1 **SW-Version I-IV** für die Parameter der Blutzellzählung bei den Tierarten Pferd und Schwein

Parameter	ADVIA120 / H*1 Korrelationskoeffizient (r)							
	Pferd				Schwein			
	I n=105	II n=36	III n=31	IV n=30	I n=100	II n=39	III n=32	IV n=30
WBC 10 ⁹ /l	0,96	0,993	0,968	0,993	0,978	0,97	0,93	0,969
RBC 10 ¹² /l	0,941	0,965	0,974	0,991	0,94	0,976	0,37**	0,994 ¹
HGB mmol/l	0,943	0,969	0,961	0,96	0,953	0,986	0,247**	0,979 ¹
HCT l/l	0,918	0,953	0,971	0,986	0,92	0,924	0,32**	0,97 ¹
MCV fl	0,978	0,972	0,982	0,997	0,982	0,766**	0,987	0,968
MCH fmol	0,961	0,964	0,91	0,943	0,921	0,94	0,905	0,936
MCHC mmol/l	0,241	0,401	0,141	0,187	0,734	0,161	0,619	0,631
RDW %	0,103	0,958	0,799	0,893	0,911	0,967	0,975	0,902
HDW mmol/l	0,719	0,152	0,964	0,92	0,812	0,438	0,75	0,929
PLT 10 ⁹ /l	0,933	0,755	0,963	0,973	0,825	0,948	0,606	0,955

* Korrelation in Version III beinhaltet Anämiepatienten; ** Geräte Kalibration RBC bei den Messungen verstellt; ¹ n = 10

Tabelle 25: Korrelationen des Methodenvergleichs ADVIA 120 / F-800

SW-Version I - IV für die Parameter der Blutzellzählung bei den Tierarten Pferd und Schwein

Parameter	ADVIA120 / F-800 Korrelationskoeffizient (r)							
	Pferd				Schwein			
	I n=105	II n=36	III n=31	IV n=30	I n=100	II n=39	III n=32	IV n=30
WBC 10 ⁹ /l	0,898	0,993	0,995	0,964	0,956	0,938	0,909	0,893
RBC 10 ¹² /l	0,771	0,945	0,972	0,95	0,93	0,878	-0,258	0,966
HGB mmol/l	0,899	0,953	0,98	0,95	0,948	0,891	-0,22	0,956
HCT l/l	0,738	0,926	0,964	0,819	0,873	0,681	-0,109	0,94
MCV fl	0,955	0,977	0,94	0,921	0,905	0,73	0,88	0,92
MCH fmol	0,74	0,954	0,958	0,896	0,907	0,897	0,804	0,954
MCHC mmol/l	0,221	0,156	-0,122	0,089	0,431	-0,057	0,21	0,428
RDW %	-0,287	-0,653	-0,351	0,803	0,685	0,71	0,897	0,696
PLT 10 ⁹ /l	0,638	0,188	0,815	0,289	0,616	0,546	0,663	0,525

Tabelle 26: Korrelationen des Methodenvergleichs ADVIA 120/ H*1 **SW-Version I - IV** für die den Hämatokritwert bei den Tierarten Pferd und Schwein

Parameter	ADVIA120 / Zentrifuge Korrelationskoeffizient (r)							
	Pferd				Schwein			
	I n=105	II n=36	III n=31	IV n=30	I n=100	II n=39	III n=32	IV n=30
HCT I/I	0,911	0,976	0,975	0,959	0,866	0,876	0,376*	0,921

* RBC-Kanal verstellt

Tabelle 27: Korrelationen des Methodenvergleichs ADVIA 120/ H*1 **SW-Version I - IV** für die Retikulozytenzählung bei den Tierarten Pferd und Schwein

Parameter	ADVIA120 / Retikulozytenzählung Korrelationskoeffizient (r)							
	Pferd				Schwein			
	I n=105	II n=36	III n=31	IV n=30	I n=100	II n=39	III n=32	IV n=30
RETI %	0,252	0,444	0,731**	*	0,079	0,47	0,489	*

* nicht durchgeführt; ** Korrelation in Version III beinhaltet Anämiepatienten!!!!

Nach der tabellarischen Darstellung der Korrelationskoeffizienten in den einzelnen Softwareversionen werden nun wichtige ausgewählte Parameter anhand ihrer Korrelationsdiagramme aufgeführt. Die Darstellung der Untersuchungsergebnisse erfolgt als Punktwolke im x/y - Diagramm. Die Ergebnisse des ADVIA 120 finden sich auf der x-Achse, während die Referenz- oder Vergleichsmethode jeweils auf der y-Achse aufgetragen sind. Daneben erfolgt die Ermittlung der Hauptkomponentengerade (HKG; fettgedruckte Linie) mit der entsprechenden Hauptkomponentengleichung und die Angabe des Korrelationskoeffizienten und dessen Signifikanz. Die Winkelhalbierende ist als gestrichelte Linie eingezeichnet.

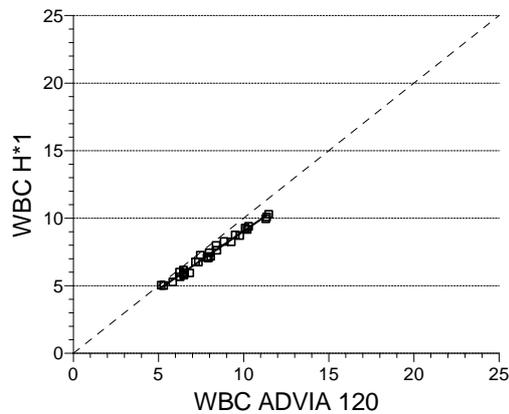
3.2.1.2.1.2 Korrelationsdiagramme Blutzellzählung

Die nachfolgende Abbildungen 30, 31 und 32 zeigen die Korrelationsdiagramme für die Leukozytenzahl (WBC), die Erythrozytenzahl (RBC) und die Hämoglobinkonzentration (HGB) des ADVIA 120 im Vergleich mit dem H*1 und dem Sysmex F-800 für das Pferd (quadratische Symbole) und der Vergleich von ADVIA 120 und Sysmex F-800 für das Schwein (dreieckige Symbole).

Die Korrelationen für die Leukozytenzahl sind für beide Tierarten hochsignifikant ($p < 0,001$). Die höchste Übereinstimmung der Methoden wird bei Pferdeblut mit $r = 0,964$ (ADVIA 120/F-800) und $r = 0,993$ (ADVIA 120/H*1) erreicht. Die Punktwolke für Schweineblut zeigt eine etwas breitere Streuung um die Hauptkomponentengerade und liegt bei $r = 0,893$ (ADVIA 120/F-800).

Die dargestellten Korrelationen für die Erythrozytenzahl (RBC) erweisen sich für beide Tierarten als hochsignifikant ($p < 0,001$). Die hohen Korrelationskoeffizienten belegen mit $r = 0,991$ und $r = 0,95$ für das Pferd, sowie mit $r = 0,966$ für das Schwein höchste Übereinstimmungen.

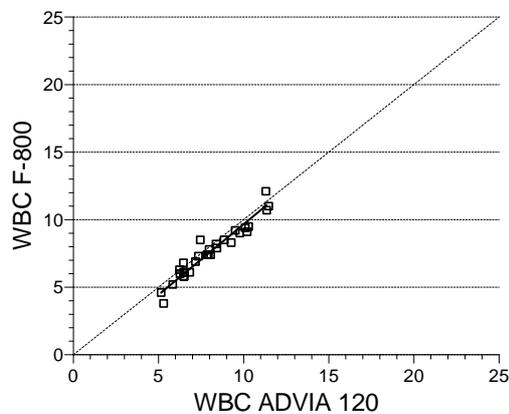
Dies gilt ebenfalls für die Untersuchungsergebnisse der Hämoglobinkonzentration (HGB), die in Abbildung 32 deutlich gemacht werden.



$$y = 0,863x + 0,402$$

$$r = 0,993$$

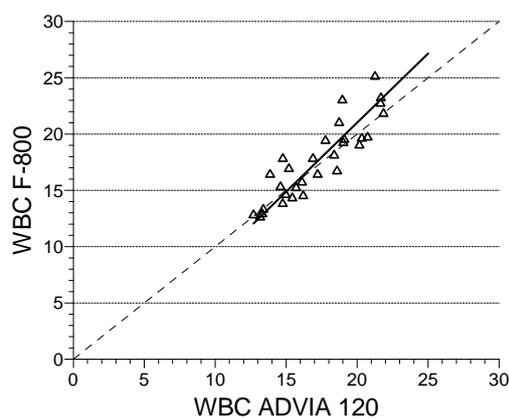
$$p < 0,001$$



$$y = 1,044x - 0,781$$

$$r = 0,964$$

$$p < 0,001$$

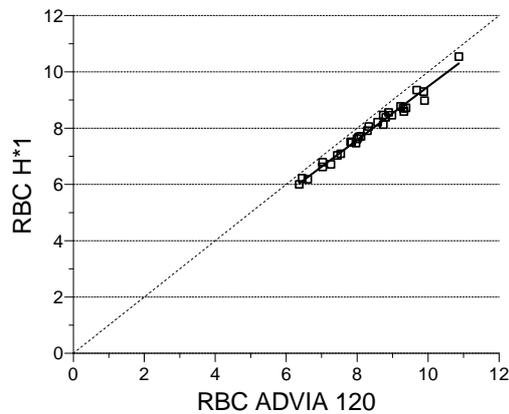


$$y = 1,228x - 3,542$$

$$r = 0,893$$

$$p < 0,001$$

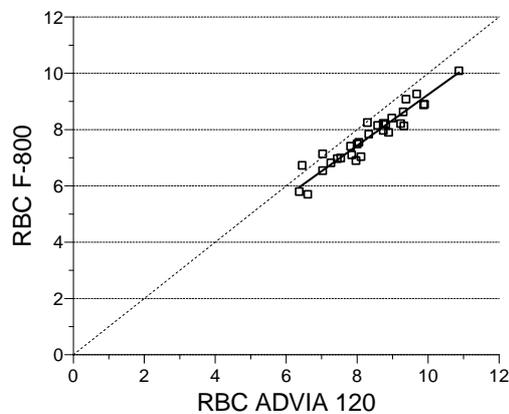
Abbildung 30: Korrelationsdiagramme des Methodenvergleichs ADVIA 120 / H*1, ADVIA 120 / F-800 für die Leukozytenzahl WBC ($10^9/l$) beim Pferd (Symbol = \square) und ADVIA 120/F-800 beim Schwein (Symbol Δ) in **SW-Version IV**; n = 30; fettgedruckte Linie: HKG mit der Hauptkomponentengleichung y, gestrichelte Linie: WH, r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanz



$$y = 0,949x - 0,015$$

$$r = 0,991$$

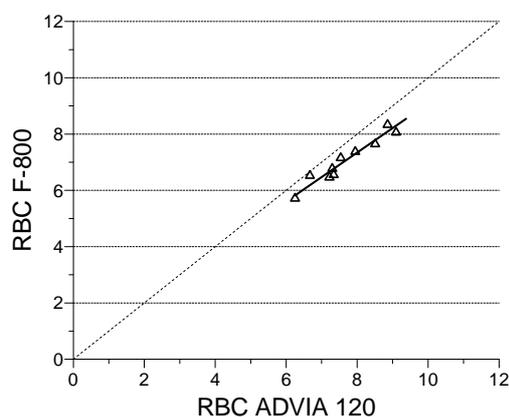
$$p < 0,001$$



$$y = 0,906 x + 0,176$$

$$r = 0,95$$

$$p < 0,001$$

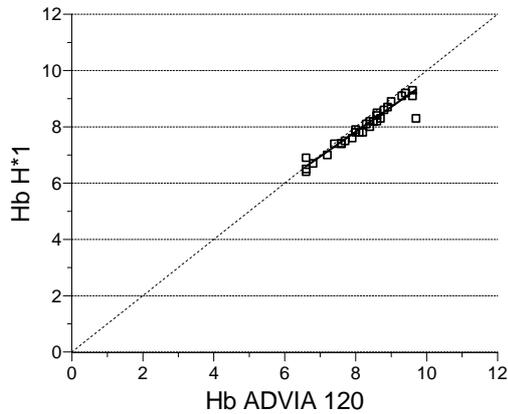


$$y = 0,866x + 0,398$$

$$r = 0,966$$

$$p < 0,001$$

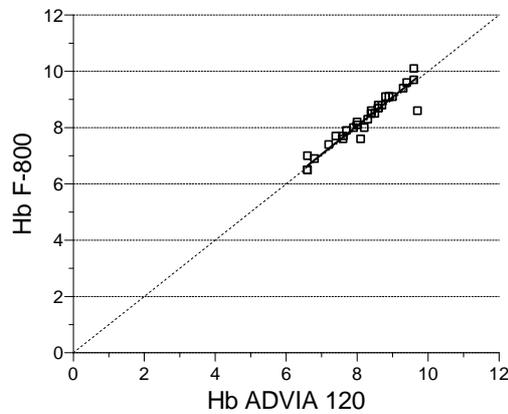
Abbildung 31: Korrelationsdiagramme des Methodenvergleichs ADVIA 120 / H*1, ADVIA 120 / F-800 für die Erythrozytenzahl RBC ($10^{12}/l$) beim Pferd $n = 30$ (Symbol = \square) und ADVIA 120/F-800 beim Schwein; $n = 10$ (Symbol Δ) in **SW-Version IV**; fettgedruckte Linie: HKG mit der Hauptkomponentengleichung y , gestrichelte Linie: WH, r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanz



$$y = 0,879x + 0,788$$

$$r = 0,96$$

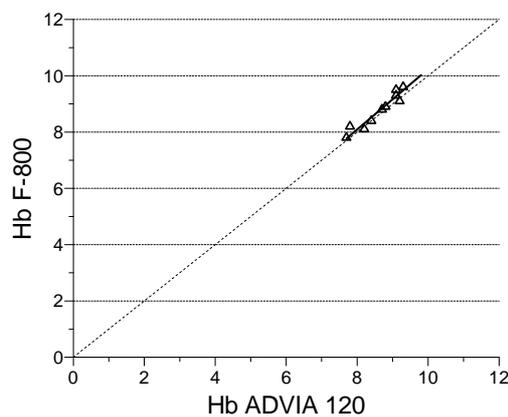
$$p < 0,001$$



$$y = 1,011 x - 0,023$$

$$r = 0,95$$

$$p < 0,001$$

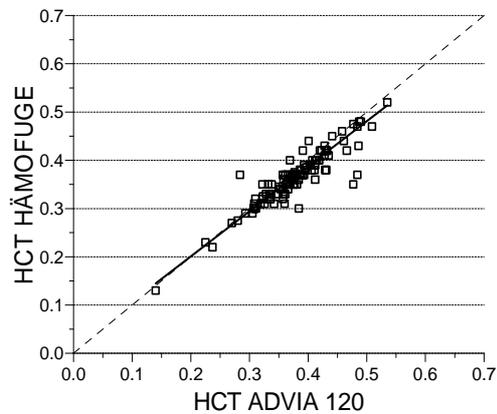


$$y = 1,073x - 0,492$$

$$r = 0,956$$

$$p < 0,001$$

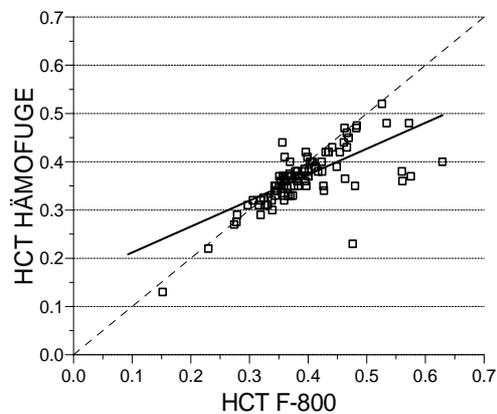
Abbildung 32: Korrelationsdiagramme des Methodenvergleichs ADVIA 120 / H*1, ADVIA 120 / F-800 für die Hämoglobinkonzentration (mmol/l) beim Pferd; n = 30 (Symbol = □) und ADVIA 120/F-800 beim Schwein; n = 10 (Symbol Δ) in **SW-Version IV**; fettgedruckte Linie: HKG mit der Hauptkomponentengleichung y, gestrichelte Linie: WH, r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanz



$$y = 0,924x + 0,015$$

$$r = 0,911$$

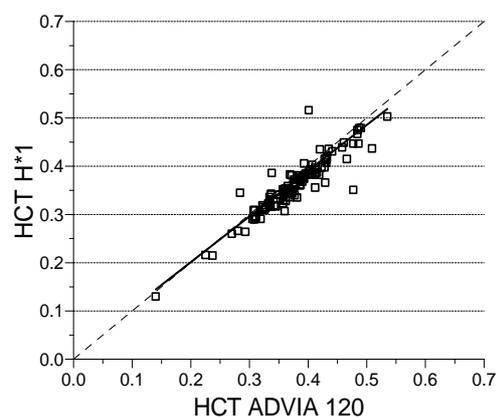
$$p < 0,001$$



$$y = 0,549x + 0,151$$

$$r = 0,70$$

$$p < 0,001$$



$$y = 0,913x + 0,017$$

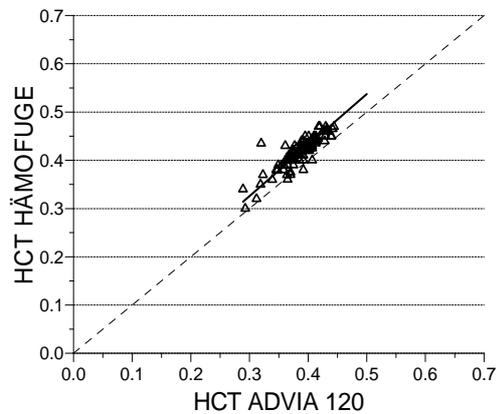
$$r = 0,918$$

$$p < 0,001$$

Abbildung 33: Korrelationsdiagramme des Methodenvergleichs ADVIA 120/ Hämofuge, F-800/Hämofuge und ADVIA 120/H*1 für den Hämatokritwert (H) beim Pferd in **SW-Version I**; n =105; fettgedruckte Linie: HKG mit der Hauptkomponentengleichung y, gestrichelte Linie: WH, r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanz

Abbildung 33 und 34 zeigen die Übereinstimmungen des Hämatokritwertes vor und nach Evaluation in den Softwareversionen I und IV. Die dargestellten Ergebnisse für die Tierart Pferd (Abb. 33) weisen in Softwareversion I eine größere Streuung der Punktwolken um die Hauptkomponentengerade auf. Während der ADVIA 120 sowohl mit der Hämatokritzentrifuge, als auch mit dem H*1 schon eine recht gute Übereinstimmung ($r = 0,911$) zeigt, weist der Sysmex F-800 im Vergleich zur Hämatokritzentrifuge nur eine mäßige Korrelation von $r = 0,70$ auf. Dies zeigt sich auch in der starken Neigung der Hauptkomponentengerade (HKG).

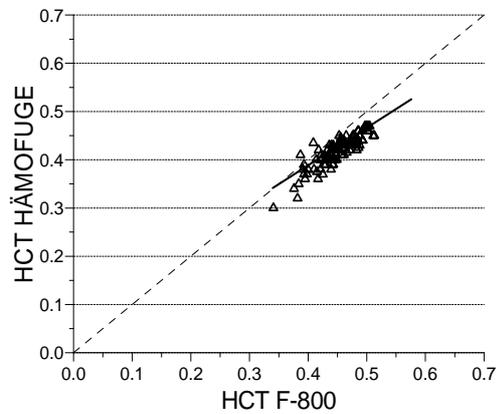
Bei den in Abbildung 34 dargestellten Ergebnissen für die Tierart Schwein liegen die Korrelationskoeffizienten des Vergleichs zwischen ADVIA 120 und Hämatokritzentrifuge der Softwareversion I sogar nur bei $r = 0,866$. Auch für den Vergleich mit dem F-800 wird nur eine Korrelation von $r = 0,873$ erreicht. Der Vergleichswert des Sysmex F-800 mit der Referenzmethode Hämatokritzentrifuge erreicht mit $r = 0,873$ ein deutlich besseres Ergebnis als die Tierart Pferd, aber auch hier liegen die Messergebnisse des F-800 durchweg zu hoch.



$$y = 1,059x + 0,008$$

$$r = 0,866$$

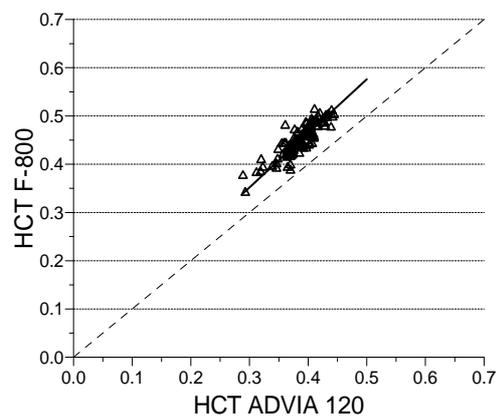
$$p < 0,001$$



$$y = 0,828x + 0,045$$

$$r = 0,873$$

$$p < 0,001$$

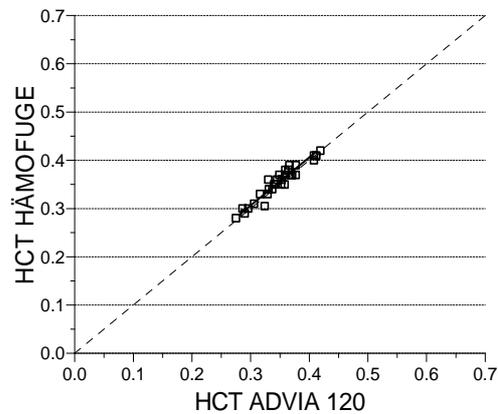


$$y = 1,12x + 0,016$$

$$r = 0,873$$

$$p < 0,001$$

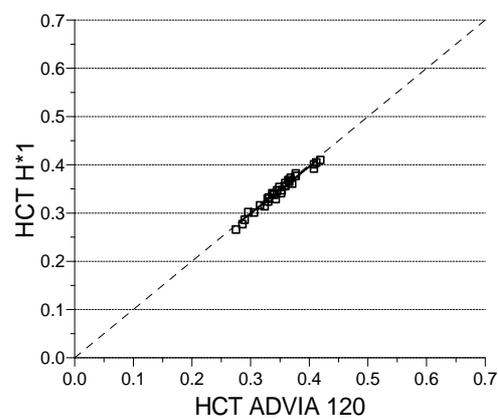
Abbildung 34: Korrelationsdiagramme des Methodenvergleichs ADVIA 120/ Hämofuge, F-800/Hämofuge und ADVIA 120/F-800 für den Hämatokritwert (l/l) beim Schwein in **SW-Version I**; n =105; fettgedruckte Linie: HKG mit der Hauptkomponentengleichung y, gestrichelte Linie: WH, r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanz



$$y = 0,996x + 0,007$$

$$r = 0,959$$

$$p < 0,001$$



$$y = 0,994x - 0,001$$

$$r = 0,986$$

$$p < 0,001$$

Abbildung 35: Korrelationsdiagramme des Methodenvergleichs ADVIA 120/ Hämofuge und ADVIA 120/H*1 für den Hämatokritwert (l/l) beim Pferd in **SW-Version IV**; n =30; fettgedruckte Linie: HKG mit der Hauptkomponentengleichung y, gestrichelte Linie: WH, r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanz

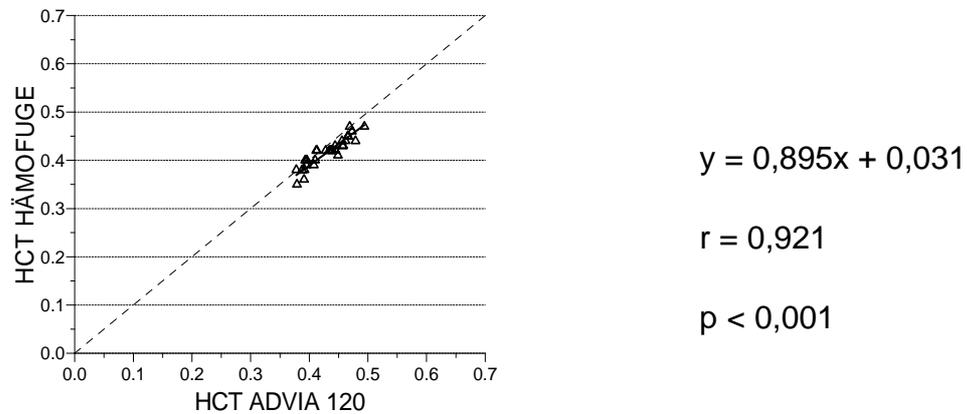
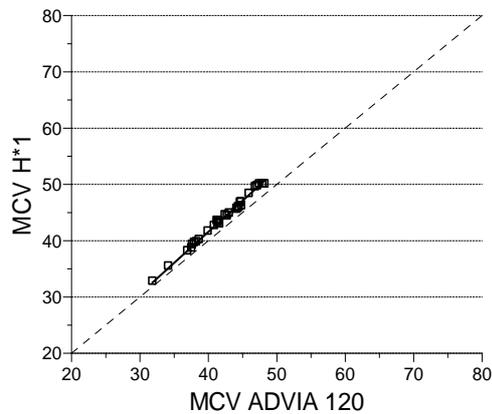


Abbildung 36: Korrelationsdiagramm Hämokritwert ADVIA 120/Hämofuge beim Schwein in **SW-Version IV**; $n = 30$; fettgedruckte Linie: HKG mit der Hauptkomponentengleichung y , gestrichelte Linie: WH, r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanz

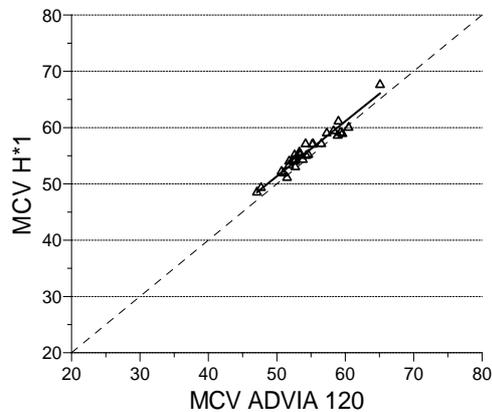
In den Abbildungen 35 und 36 sind die Ergebnisse des Methodenvergleichs nach Abschluss der Evaluation in Softwareversion IV dargestellt. Die deutliche Übereinstimmung und somit Verbesserung der Korrelation für Pferdeblut ist vor allem an der Parallelität der Abszisse und der Hauptkomponentengerade zu erkennen. Für beide Tierarten werden gute bis sehr gute (Pferd $r = 0,959$) Korrelationen erreicht.



$$y = 1,078x - 1,332$$

$$r = 0,997$$

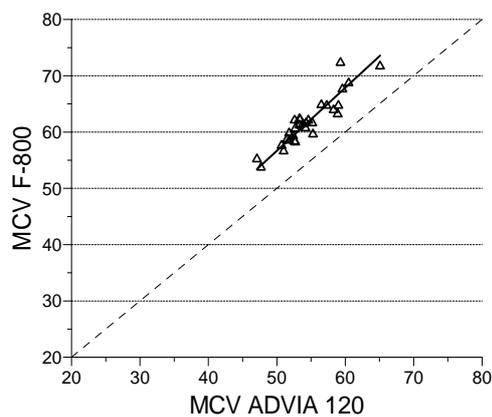
$$p < 0,001$$



$$y = 0,977x + 2,489$$

$$r = 0,968$$

$$p < 0,001$$



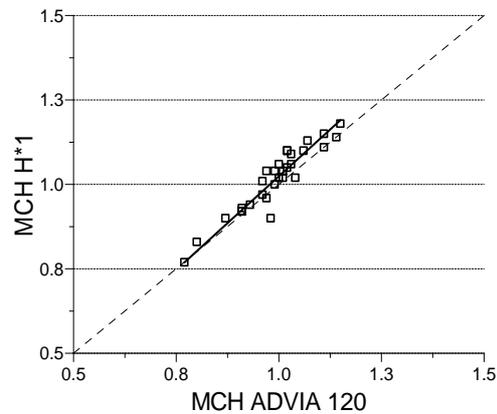
$$y = 1,120x + 0,666$$

$$r = 0,92$$

$$p < 0,001$$

Abbildung 37: Korrelationsdiagramme des Methodenvergleichs ADVIA 120/H*1 für das mittlere Erythrozytenvolumen (fl) beim Pferd (Symbol = □) und ADVIA 120/H*1, ADVIA 120/F-800 beim Schwein (Symbol Δ) in **SW-Version IV**; n = 30; fettgedruckte Linie = HKG, gestrichelte Linie = WH; r = Korrelationskoeffizient; p = Signifikanz

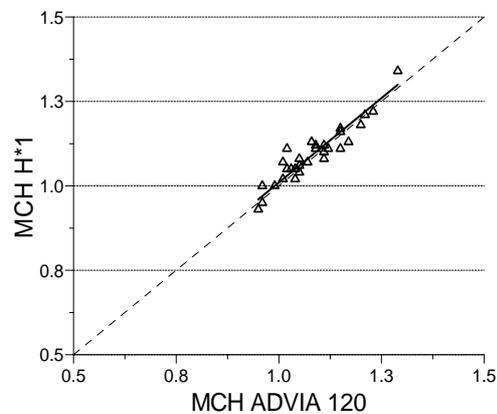
Die Korrelationen der Erythrozytenindizes MCV und MCH sind in den Abbildungen 37 und 38 aufgeführt. Die Übereinsimmung der Messwerte sind bei Pferd und Schwein hoch signifikant. Auffällig sind hier wiederum die im Vergleich zum ADVIA 120 zu hoch gemessenen Werte des F-800 beim Schwein.



$$y = 1,119x - 0,093$$

$$r = 0,943$$

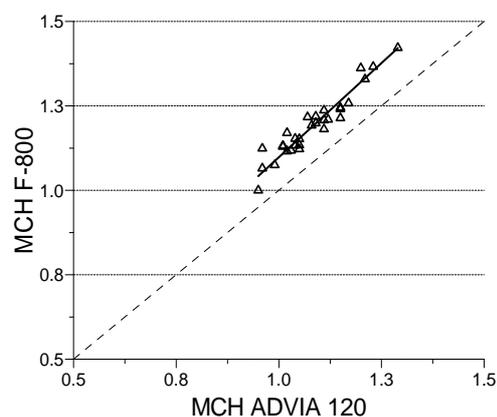
$$p < 0,001$$



$$y = 0,989x + 0,021$$

$$r = 0,936$$

$$p < 0,001$$

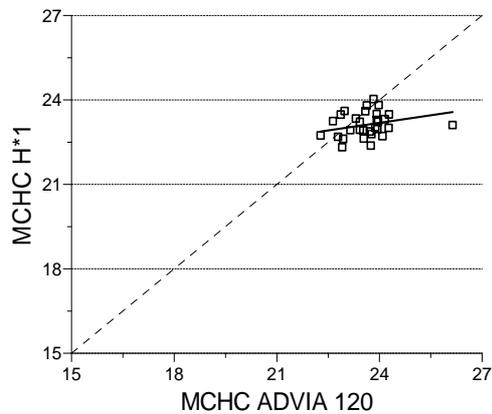


$$y = 1,114x - 0,016$$

$$r = 0,954$$

$$p < 0,001$$

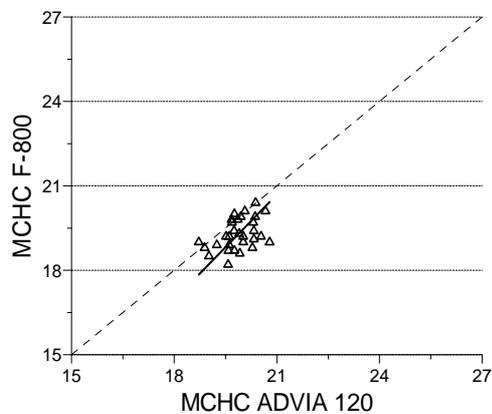
Abbildung 38: Korrelationsdiagramme des Methodenvergleichs ADVIA 120/H*1 für den mittleren zellulären Hämoglobingehalt MCH (fmol) beim Pferd (Symbol = □) und ADVIA 120/H*1, ADVIA 120/F-800 beim Schwein (Symbol Δ) in **SW-Version IV**; n = 30; fettgedruckte Linie = HKG, gestrichelte Linie = WH; r = Korrelationskoeffizient; p = Signifikanz



$$y = 0,177x + 18,936$$

$$r = 0,187$$

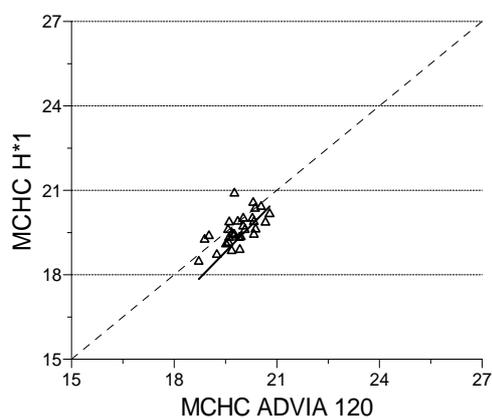
$$p = \text{n.s.}$$



$$y = 1,246x - 5,474$$

$$r = 0,428$$

$$p < 0,05$$



$$y = 1,175x - 3,753$$

$$r = 0,631$$

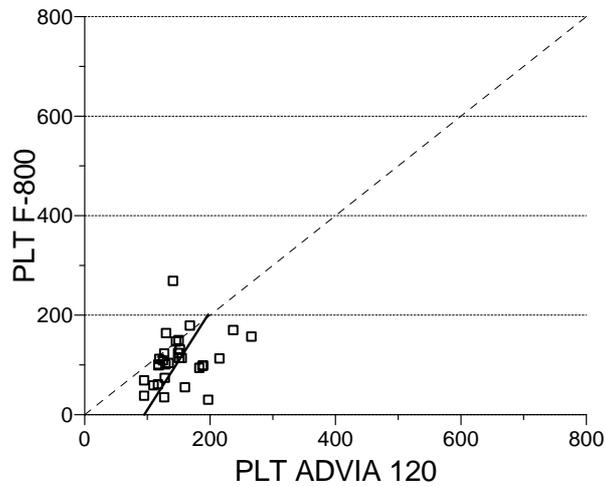
$$p < 0,001$$

Abbildung 39: Korrelationsdiagramme des Methodenvergleichs ADVIA 120/H*1 für die mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten MCHC (mmol/l) beim Pferd (Symbol = □) und beim Schwein (Symbol Δ) und ADVIA 120/F-800 beim Schwein (Symbol Δ) in **SW-Version IV**; n = 30; fettgedruckte Linie = HKG, gestrichelte Linie = WH; r = Korrelationskoeffizient; p = Signifikanz

Im Gegensatz zu den oben genannten Indizes erreicht der MCHC wie in Abbildung 39 dargestellt nur mäßige (Schwein) bis gar keine Übereinstimmungen (Pferd). Offensichtlich ergeben sich hier neben messmethodischen auch deutliche tierartsspezifische Unterschiede.

Für die Thrombozytenzahl ergeben sich die in Abbildung 40 und 41 dargestellten Korrelationsdiagramme. In der Gegenüberstellung von ADVIA 120 und Sysmex F-800 in Softwareversion IV ist für beide Tierarten eine fehlende Übereinstimmung zu erkennen. Die messtechnischen Unterschiede beider Geräte lassen insbesondere bei der Thrombozytenzählung keine Vergleichbarkeit zu. Auffallend ist hier die breite Streuung der Untersuchungsergebnisse, die keinen Bezug zur Hauptkomponentengerade mehr erkennen lassen.

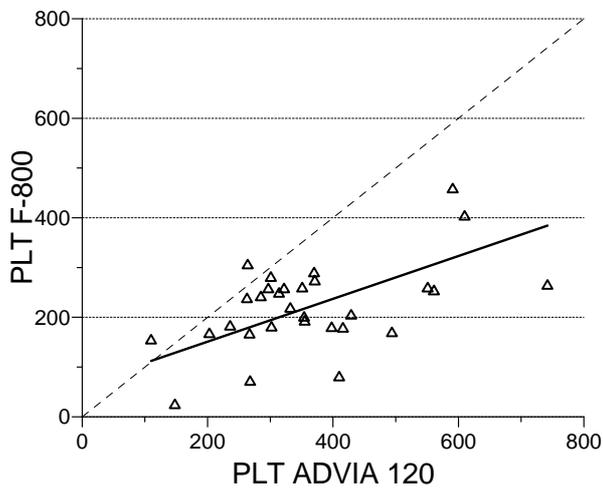
Die Resultate in Abbildung 41 zeigen ein ganz anderes Ergebnis. Hier finden sich exzellente Korrelationen mit dem H*1 bei Pferde- und Schweinethrombozyten. Die dargestellten Korrelationsdiagramme verdeutlichen den engen Zusammenhang der Messergebnisse. Für die Tierart Pferd ergibt sich eine sehr hohe Korrelation von $r = 0,973$. Eine breite Streuung der Messergebnisse wird für die Tierart Schwein ermittelt. Anhand der Darstellung ist hier der tierartsspezifische Unterschied besonders deutlich herausgehoben. So liegen die Thrombozytenzahlen beim Pferd in erheblich engeren Grenzen als beim Schwein. Für beide Tierarten zeigt der ADVIA 120 höhere Messwerte als das Vergleichsgerät H*1.



$$y = 1,9715x - 187,198$$

$$r = 0,289$$

$$p = \text{n.s.}$$



$$y = 0,733x + 72,411$$

$$r = 0,525$$

$$p < 0,01$$

Abbildung 40: Korrelationsdiagramme des Methodenvergleichs ADVIA 120/F-800 für die Thrombozytenzahl PLT ($10^9/l$) beim Pferd (Symbol = \square) und Schwein (Symbol Δ) in **SW-Version IV**; $n = 30$; fettgedruckte Linie = HKG, gestrichelte Linie = WH; r = Korrelationskoeffizient; p = Signifikanz

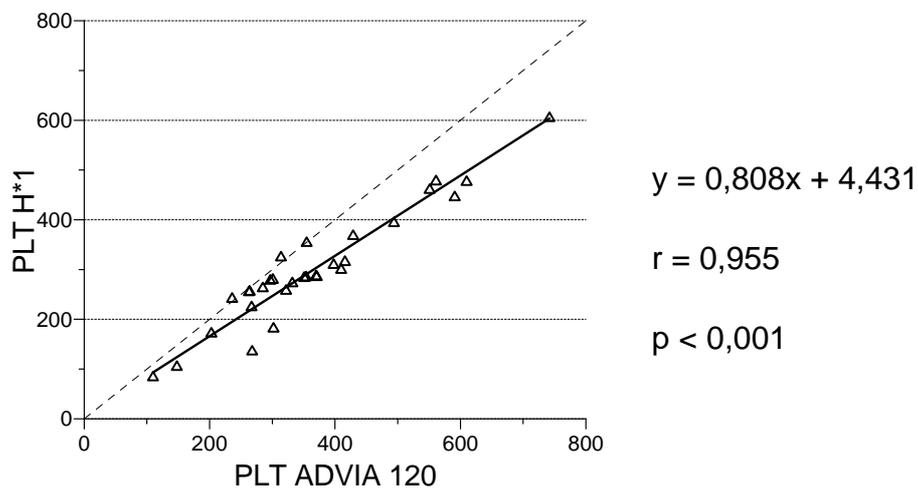
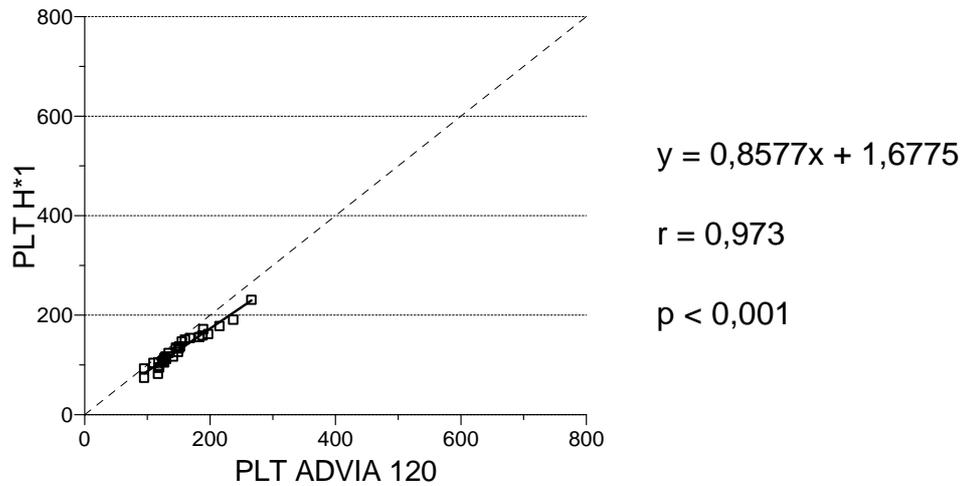


Abbildung 41: Korrelationsdiagramme des Methodenvergleichs ADVIA 120/H*1 für die Thrombozytenzahl PLT ($10^9/l$) beim Pferd (Symbol = \square) und Schwein (Symbol Δ) in **SW-Version IV**; $n = 30$; fettgedruckte Linie = HKG, gestrichelte Linie = WH; r = Korrelationskoeffizient; p = Signifikanz

3.2.1.2.1.3 Retikulozytenzählung

Die automatisierte und tierartsspezifische Retikulozytenzählung stellt Neuland im Bereich der Veterinärmedizin dar. Mit dem Hämatologiesystem ADVIA 120 ist es möglich, Retikulozyten für die verschiedenen Tierarten zu zählen und in die verschiedenen Reifungsstufen einzuteilen. Als Vergleichsmethode dient die manuelle Retikulozytenbestimmung anhand von Brillantkresylblaufärbung. Die Auswertung erfolgt mittels mikroskopischer Auszählung von je 1000 Zellen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus der III. Softwareversion, die der Endversion entspricht, da hiernach an der Retikulozytenanalytik keine Änderungen mehr vorgenommen wurden.

In der nachfolgenden Abbildung 42 werden die Korrelationen von Pferde- und Schweineretikulozyten gezeigt. Die Auswertung der Pferdepatienten muss jedoch als nicht vergleichbar angesehen werden, da in lediglich 3 Fällen (hierbei handelte es sich um Anämiepatienten) in der manuellen Auszählung überhaupt Retikulozyten gezählt werden konnten. Für Schweineretikulozyten konnte mit $r = 0,489$ nur ein sehr mäßiger Zusammenhang hergestellt werden kann.

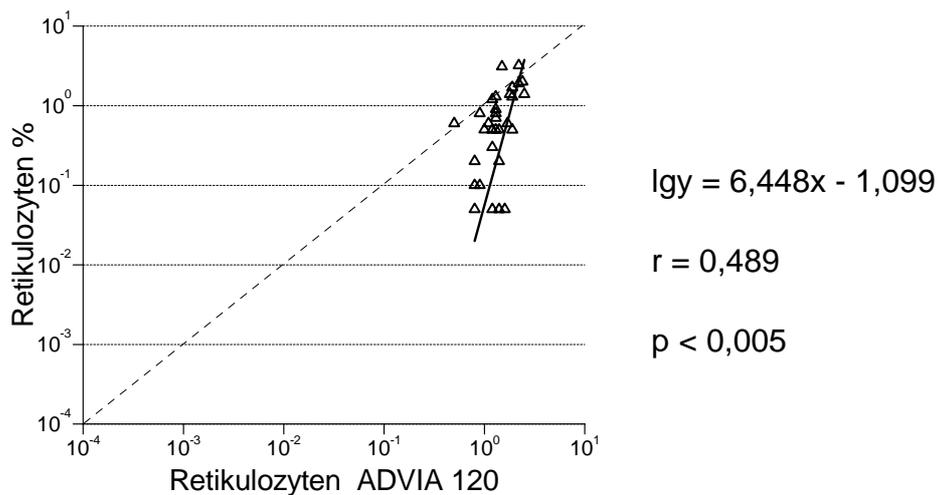
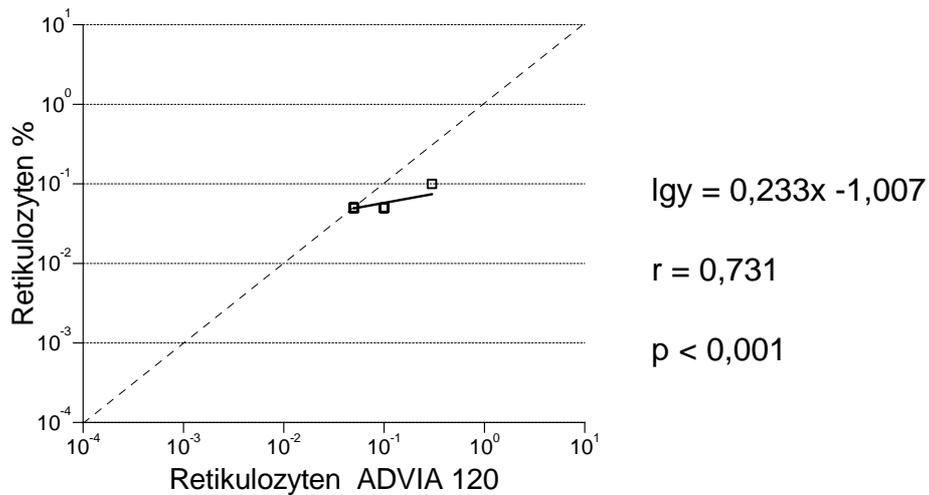


Abbildung 42: Korrelationsdiagramm Retikulozyten ADVIA 120/manuelle Retikulozytenzählung beim Pferd (Symbol = \square) und Schwein (Symbol Δ) in **SW-Version III**; n = 30; fettgedruckte Linie: HKG mit der Hauptkomponentengleichung y, gestrichelte Linie: WH, r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanz

3.2.1.2.1.4 Mittelwertvergleich Blutzellzählung

Im Folgenden (Tab. 28) sind die Ergebnisse des Mittelwertvergleichs und des t-Tests bzw. Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben zusammengestellt. Aufgeführt ist die mittlere Differenz (d) von ADVIA 120 und jeweiliger Vergleichsmessungen mit Standardabweichung (SD_d) und die errechnete relative Differenz (rd in %), bezogen auf den Mittelwert der Vergleichsmessung. Die Signifikanz (p), ermittelt anhand des t-Tests bzw. Wilcoxon-Tests, gibt an ob ein Unterschied zwischen den Methoden nachgewiesen werden konnte.

Die Mittelwerte der Vergleichsmessungen ADVIA 120/H*1 unterscheiden sich mit Ausnahme der Erythrozytenverteilungsbreite (RDW) und des mittleren Plättchenvolumens (MPV) beim Pferd hochsignifikant. Für die Tierart Schwein ist beim Hämoglobin (HGB) und der mittleren zellulären Hämoglobinkonzentration die geringste Abweichung festzustellen. Die Mittelwertunterschiede für den Hämatokritwert werden separat in Tabelle 30 aufgeführt.

Tabelle 28: Mittelwertunterschiede des Methodenvergleichs ADVIA 120/H*1 für die Parameter der Blutzellzählung bei den Tierarten Pferd und Schwein in **SW-Version IV**; n = 30; $d \pm SD_d$ = mittlere Differenz mit Standardabweichung, rd = relative Differenz (bezogen auf den Mittelwert der Vergleichsmethode); p = Signifikanz des t-Tests (*Wilcoxon-Tests) für verbundene Stichproben

Parameter	Pferd			Schwein		
	$d \pm SD_d$	rd %	p	$d \pm SD_d$	rd %	p
WBC $10^9/l$	0,649 \pm 0,257	8,8	< 0,001	1,275 \pm 0,475	8,0	< 0,001
RBC $10^{12}/l$	0,465 \pm 0,126	5,9	< 0,001	0,222 \pm 0,292	2,9	< 0,001
HGB mmol/l	0,239 \pm 0,134	3,0	< 0,001	0,167 \pm 0,266	2,0	= 0,002
MCV fl	-1,894 \pm 0,446	-4,3	< 0,001	-1,153 \pm 0,921	-2,1	< 0,001
MCH fmol	-0,029 \pm 0,021	-2,8	< 0,001	-0,008 \pm 0,243	-0,7	n.s.*
MCHC mmol/l	0,369 \pm 0,486	1,6	< 0,001	0,268 \pm 0,332	1,4	< 0,001
RDW %	-0,148 \pm 0,373	-0,7	\leq 0,05	0,312 \pm 0,380	1,8	< 0,001
HDW mmol/l	0,137 \pm 0,051	10,6	< 0,001	0,916 \pm 0,027	8,4	< 0,001
PLT $10^9/l$	17,606 \pm 10,444	13,4	< 0,001	68,70 \pm 40,27	23,1	< 0,001
MPV fl	0,343 \pm 0,853	4,9	\leq 0,05*	1,496 \pm 1,250	22,7	< 0,001
PDW %	10,152 \pm 5,343	22,8	< 0,001	28,875 \pm 11,791	62,6	< 0,001

Bei Betrachtung der relativen Differenzen in Tabelle 30 fällt auf, dass bei beiden Tierarten die Abweichung für den WBC auffallend hoch ist. Der ADVIA 120 ermittelt demnach 8,8 % (Pferd) und 8,0 % (Schwein) höhere Werte als der H*1. Für die Parameter RBC, HGB und die Erythrozytenindizes zeigt das Schwein deutlich geringere Abweichungen als das Pferd. Bei der Thrombozytenzählung der Tierart Schwein liegen die mit dem ADVIA 120 gemessenen Werte 23,1 % höher als beim H*1, für das Pferd liegt die relative Abweichung bei 13,4 %.

Die Resultate des Mittelwertvergleichs zwischen ADVIA 120 und Sysmex F-800 sind in der nun folgenden Tabelle 29 dargestellt.

Tabelle 29: Mittelwertunterschiede des Methodenvergleichs ADVIA 120/F-800 für die Parameter der Blutzellzählung bei den Tierarten Pferd und Schwein in **SW-Version IV**; n = 30; $d \pm SD_d$ = mittlere Differenz mit Standardabweichung; rd = relative Differenz (bezogen auf den Mittelwert der Vergleichsmethode); p = Signifikanz des t-Tests (*Wilcoxon-Tests) für verbundene Stichproben

Parameter	Pferd			Schwein		
	$d \pm SD_d$	rd %	p	$d \pm SD_d$	rd %	p
WBC $10^9/l$	0,451 \pm 0,493	5,9	< 0,001	-0,279 \pm 1,579	-1,6	n.s.
RBC $10^{12}/l$	0,607 \pm 0,341	7,8	< 0,001	0,636 \pm 0,375	8,7	< 0,001
HGB mmol/l	-0,067 \pm 0,192	-0,8	n.s.	-0,094 \pm 0,360	-1,1	n.s.
MCV fl	-0,652 \pm 1,628	-13,4	< 0,001	-7,156 \pm 1,917	-11,6	< 0,001
MCH fmol	-0,087 \pm 0,050	-8,1	< 0,001	-0,106 \pm 0,028	-8,9	< 0,001
MCHC mmol/l	1,400 \pm 1,378	6,3	< 0,001	0,586 \pm 0,611	3,0	< 0,001
RDW %	-1,172 \pm 0,512	-5,8	< 0,001	0,312 \pm 0,699	1,8	< 0,05
PLT $10^9/l$	36,506 \pm 53,905	32,5	< 0,001	145,18 \pm 117,57	65,8	< 0,001
MPV fl	-0,238 \pm 0,604	-3,2	< 0,05*	-0,774 \pm 1,003	8,7	< 0,001

Die geringste Abweichung kann für beide Tierarten beim HGB ermittelt werden. Außerdem erfolgen nur schwach signifikante Abweichungen für den MPV beim Pferd und den RDW beim Schwein. Während der ADVIA 120 für den WBC beim Pferd 5,9 % höher misst als der F-800, zeigt das Schwein für die Ermittlung des WBC keinen signifikanten Unterschied. Alle anderen Parameter zeigen signifikante methodische Unterschiede vor allem für die Erythrozytenzahl (RBC), MCV und PLT.

Tabelle 30: Mittelwertunterschiede des Methodenvergleichs ADVIA 120/Hämofuge, F-800 und H*1 für den Hämatokrit bei den Tierarten Pferd und Schwein in **SW-Version IV**; n = 30; $d \pm SD_d$ = mittlere Differenz mit Standardabweichung; rd = relative Differenz (bezogen auf den Mittelwert der Vergleichsmethode); p = Signifikanz des t-Tests (*Wilcoxon-Tests) für verbundene Stichproben

HCT I/II	Pferd			Schwein		
	$d \pm SD_d$	rd %	p	$d \pm SD_d$	rd %	p
ADVIA/Hämofuge	-0,006 ± 0,01	-1,7	< 0,01	0,008 ± 0,02	1,9	n.s.
ADVIA/F-800	-0,025 ± 0,02	-6,8	< 0,001	-0,018 ± 0,02	-3,9	< 0,001
ADVIA/H*1	0,005 ± 0,00	1,4	< 0,001	0,003 ± 0,01	0,7	n.s.

In Tabelle 30 sind die Mittelwertunterschiede der Softwareversion IV für den Hämatokritwert der verschiedenen Vergleichsgeräte gegenübergestellt. Im Vergleich zur Hämatokritzentrifuge sind für den ADVIA 120 nur geringe prozentuale Abweichungen festzustellen. Bei Pferdeblut ermittelt der ADVIA 120 um 1,7 % niedrigere und bei Schweineblut um 1,9 % höhere Werte als die Hämatokritzentrifuge. Die größte Übereinstimmung lässt sich für den Vergleich ADVIA 120/H*1 bei Schweineblut feststellen. Einen deutlichen messmethodisch bedingten Unterschied zeigt hingegen der Vergleich ADVIA 120/Sysmex F-800.

Die graphischen Darstellungen in Abbildung 43 sollen die Softwareadaptation von Softwareversion I zu Softwareversion IV noch einmal am Beispiel des Parameters Hämatokritwert verdeutlichen. Zu erkennen ist bei beiden Tierarten eine starke Verringerung des relativen Unterschiedes zwischen ADVIA 120 und Hämatokritzentrifuge (durch entsprechende Kalibration mittels "Golden Standard", der Hämatokritzentrifuge) auf unter 2 %, während im Verlauf der Anpassung die relative Differenz zwischen ADVIA 120 und F-800 (unveränderte Kalibration) deutlich zunimmt.

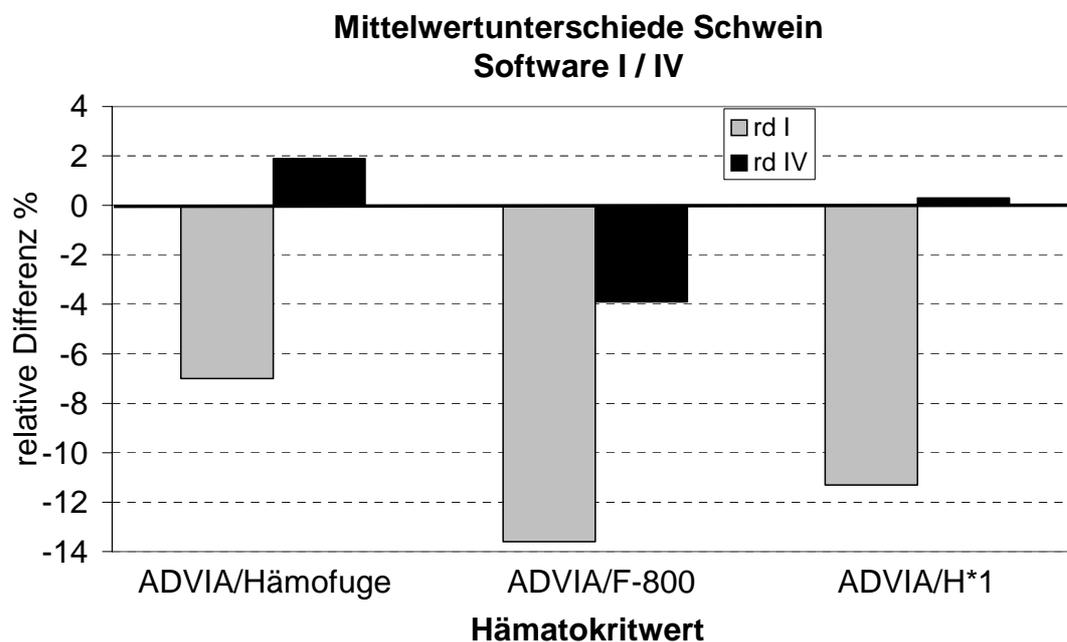
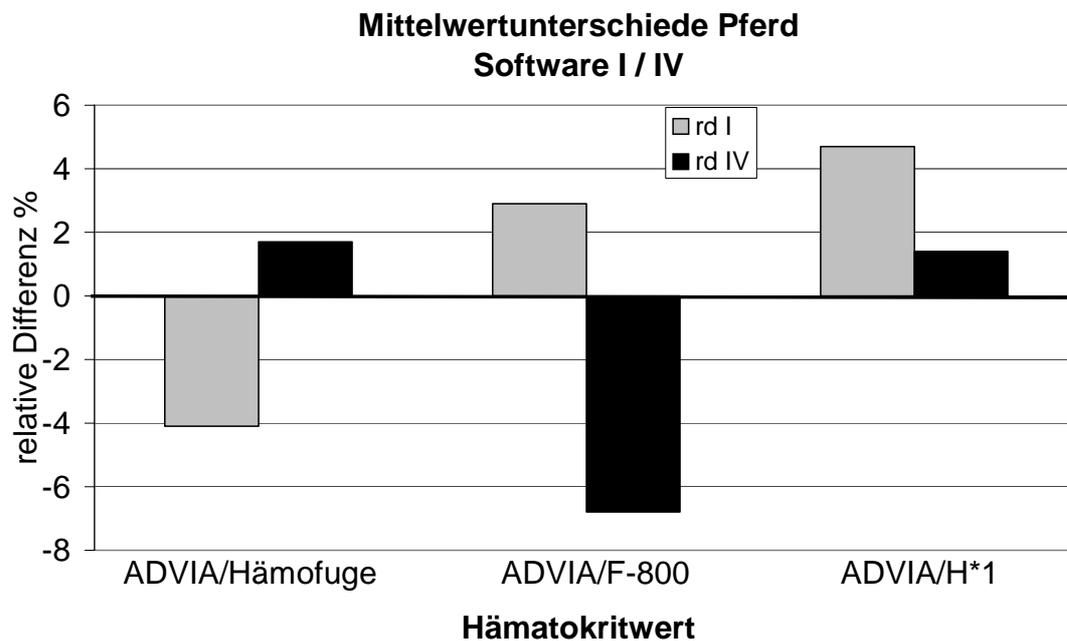


Abbildung 43: Vergleich der Mittelwertunterschiede des Methodenvergleichs ADVIA 120/Hämofuge, F-800 und H*1 für den Hämatokritwert bei den Tierarten Pferd und Schwein in **SW-Version I** und **IV**; rd = relative Differenz (bezogen auf den Mittelwert der Vergleichsmethode)

3.2.1.2.2 Parameter der Blutzelldifferenzierung

3.2.1.2.2.1 Softwareadaptation ADVIA 120

Zunächst soll wieder die Darstellung der Softwareadaptation anhand von Balkendiagrammen für Pferd und Schwein erfolgen. Mit einem durchgeführten Test auf Normalverteilung (Shapiro-Wilks Test) konnte für die Parameter der Blutzelldifferenzierung überwiegend eine Log-Normalverteilung festgestellt werden. Dies ist durch ein kleines l vor der Bezeichnung des Parameters gekennzeichnet.

Gezeigt werden die Resultate der Korrelationsanalyse für die Parameter neutrophile Granulozyten (lNeut), Lymphozyten (lLymph), Monozyten (lMono), eosinophile Granulozyten (lEo), basophile Granulozyten (lBaso) und Large Unstained Cells (lLUC). Dargestellt sind die Vergleichsmessung zwischen ADVIA 120 und H*1 (Pferd und Schwein) und ADVIA 120 und panoptischer Färbung (Schwein).

Im Verlauf der Softwareadaptation wird für die Tierart Pferd im Vergleich ADVIA 120/Technicon H*1 (s. Abb. 44) eine exzellente Korrelation ($r \geq 0,95$) der Parameter neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und eosinophile Granulozyten erreicht, während basophile Granulozyten und LUC nur mäßige oder keine Übereinstimmung zeigen. Ähnlich stellt sich die Situation beim Schwein dar. Höchste Übereinstimmung ($r \geq 0,985$) findet man für Neutrophile, Lymphozyten und Eosinophile. Ebenso ergibt sich eine gute Korrelation für die basophilen Granulozyten, während Monozyten und LUC gar nicht korrelieren.

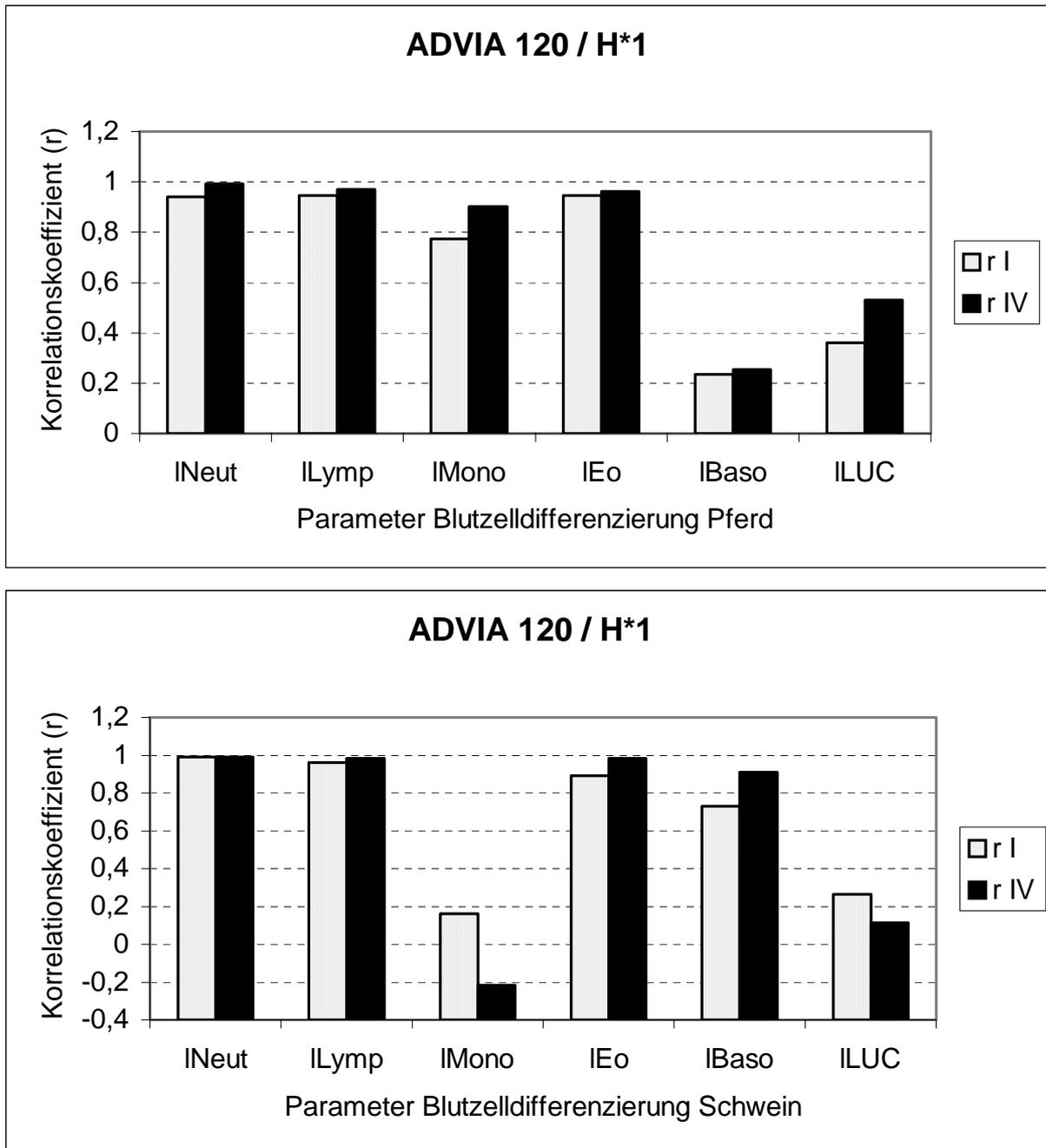


Abbildung 44: Vergleich der Korrelationen **Software I / Software IV** von ADVIA 120 und H*1 für die Blutzellendifferenzierung bei den Tierarten Pferd und Schwein

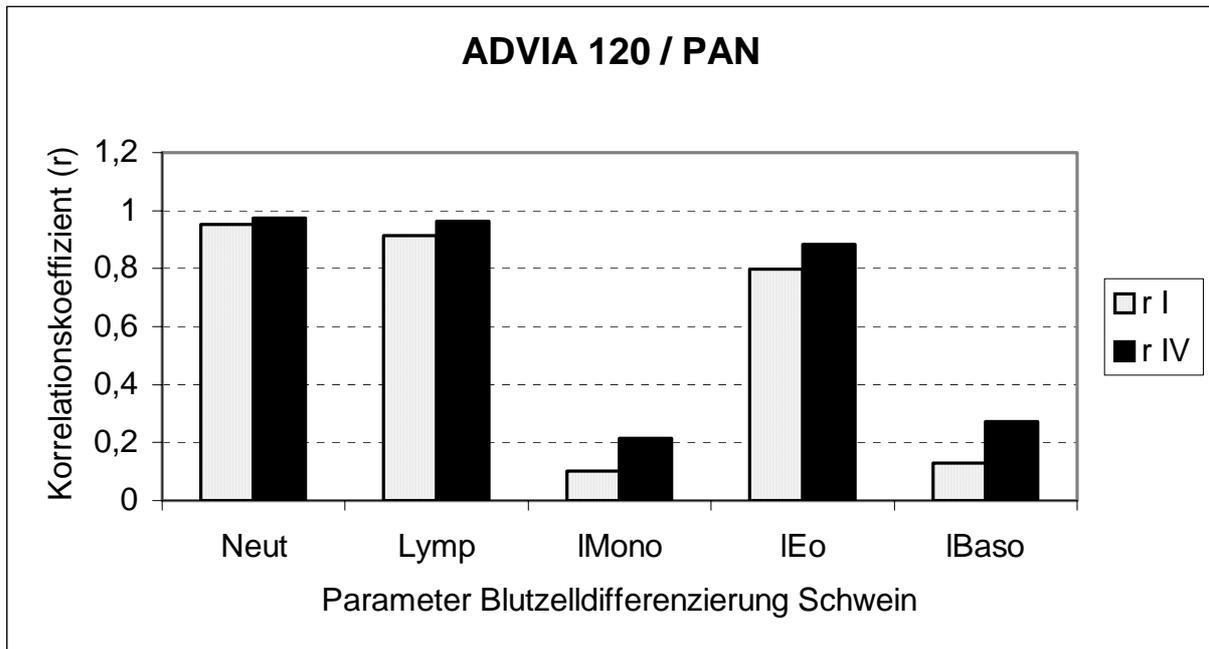


Abbildung 45: Vergleich der Korrelationen **Software I / Software IV** von ADVIA 120 und panoptischer Färbung (PAN) für die Blutzellendifferenzierung beim Schwein

Der in Abbildung 45 angegebene Vergleich von ADVIA 120 und manueller Leukozytendifferenzierung PAN beim Schwein zeigt einen sehr guten Zusammenhang der Ergebnisse für Neutrophile, Lymphozyten und Eosinophile. Für Monozyten und Basophile kann zwar eine deutliche Steigerung der Korrelationen erreicht werden, diese bleibt jedoch trotzdem im Bereich mäßig bis schlecht.

In den nachfolgenden Tabellen 31 und 32 sind die ermittelten Korrelationskoeffizienten der Leukozytendifferenzierung aller vier Evaluationsschritte in einer Übersicht für die Tierarten Pferd und Schwein zusammengefasst.

Tabelle 31: Korrelationen des Methodenvergleichs ADVIA 120 / H*1 **SW-Version I - IV** für die Parameter der Blutzellendifferenzierung (absolute Werte) bei den Tierarten Pferd und Schwein

Parameter	ADVIA120 / H*1 Korrelationskoeffizient (r)							
	Pferd				Schwein			
	I n=105	II n=36	III n=31	IV n=30	I n=100	II n=39	III n=32	IV n=30
Neutrophile G.* 10 ⁹ /l	0,939	0,989	0,977	0,992	0,989	0,989	0,953	0,992
Lymphozyten* 10 ⁹ /l	0,945	0,953	0,953	0,97	0,961	0,95	0,921	0,985
Monozyten* 10 ⁹ /l	0,774	0,873	0,721	0,902	0,161	-0,016	0,136	-0,216
Eosinophile G.* 10 ⁹ /l	0,945	0,984	0,951	0,963	0,893	0,932	0,659	0,985
Basophile G.* 10 ⁹ /l	0,236	0,708	0,487	0,253	0,731	0,876	0,896	0,91
LUC* 10 ⁹ /l	0,362	0,518	0,003	0,529	0,264	0,238	0,288	0,113

* Parameter ist log-normalverteilt

Tabelle 32: Korrelationen des Methodenvergleichs ADVIA 120 / PAN, POX und ANAE **SW-Version I - IV** für die Parameter der Blutzellendifferenzierung bei den Tierarten Pferd und Schwein

Parameter		ADVIA120 / PAN, POX, ANAE Korrelationskoeffizient (r)							
		Pferd				Schwein			
		I n=105	II n=36	III n=31	IV n=30	I n=100	II n=39	III n=32	IV n=30
Neutrophile G.	% PAN	0,865	0,934	0,914	0,951	0,952	0,97	0,895	0,974
	% POX	0,788	0,963	0,817	0,954	0,952	0,96	0,94	0,973
	ANAE	0,829	0,925	0,857	0,963	0,939	0,954	0,9	0,966
Lymphozyten	% PAN	0,842	0,915	0,914	0,962	0,915	0,93	0,895	0,964
	% POX	0,821	0,949	0,868	0,955	0,905	0,941	0,923	0,974
	ANAE	0,851	0,915	0,837	0,957	0,908	0,93	0,857	0,958
Monozyten*	% PAN	0,237	0,146	0,19	0,207	0,101	0,263	0,178	0,214
	% POX	0,313	0,274	-	0,358	0,05	0,206	0,021	0,218
	ANAE	0,33	0,438	0,016	0,391	0,071	0,433	0,419	0,244
Eosinophile G.*	% PAN	0,758	0,69	0,746	0,629	0,797	0,743	0,584	0,884
	% POX	0,828	0,778	0,75	0,671	0,701	0,744	0,697	0,863
	ANAE	0,729	0,692	0,584	0,585	0,747	0,738	0,528	0,93
Basophile. G.*	% PAN	0,04	0,292	-	0,013	0,129	0,123	0,315	0,273
	% POX	-	0,094	-	0,116	-	-	0,121	-
	ANAE	-	0,392	0,031	0,323	0,127	0,109	0,33	0,28

* Parameter ist log-normalverteilt

3.2.1.2.2.2 Korrelationsdiagramme Blutzelldifferenzierung

Zur Veranschaulichung des Zusammenhangs der Ergebnisse von ADVIA 120 und manueller Leukozytendifferenzierung mit Hilfe der drei Färbungen PAN, POX und ANAE, werden in den folgenden Abbildungen ausgewählten Beispiele anhand von Punktwolkendiagrammen dargestellt. Hierbei wird jede Zellpopulation vergleichend für die Tierarten Pferd und Schwein mit den unterschiedlichen Färbemethoden gezeigt. Es handelt sich bei den dargestellten Diagrammen ausschließlich um Ergebnisse aus der IV. Softwareversion.

Die Korrelationsanalyse für neutrophile Granulozyten ergibt für beide Tierarten einen hochsignifikanten Zusammenhang der Ergebnisse. Die größte Übereinstimmung wird beim Schwein mit $r = 0,974$ (s. Tab. 32) für den Vergleich des ADVIA 120 mit der panoptische Färbung nach Pappenheim erreicht. Ebenso hervorragend stellt sich die Situation für Pferdeblut dar, hier liegen die Korrelationen für alle drei Färbungen bei $r \geq 0,951$.

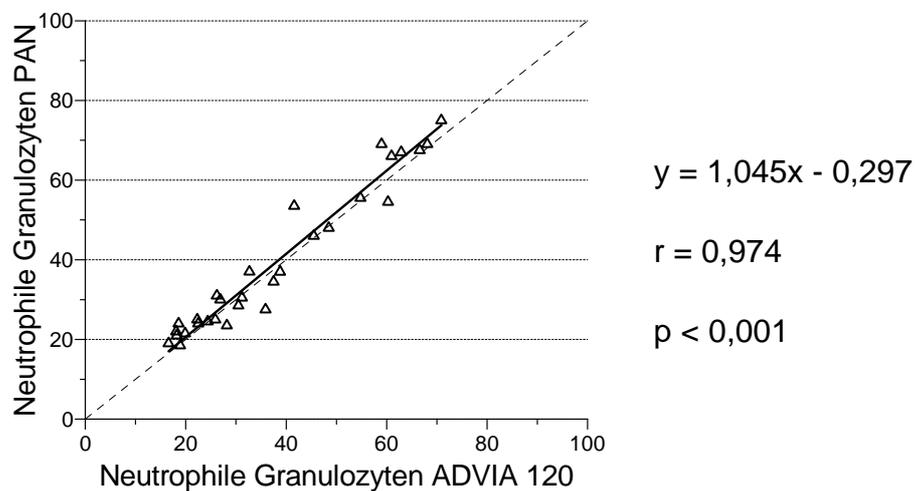
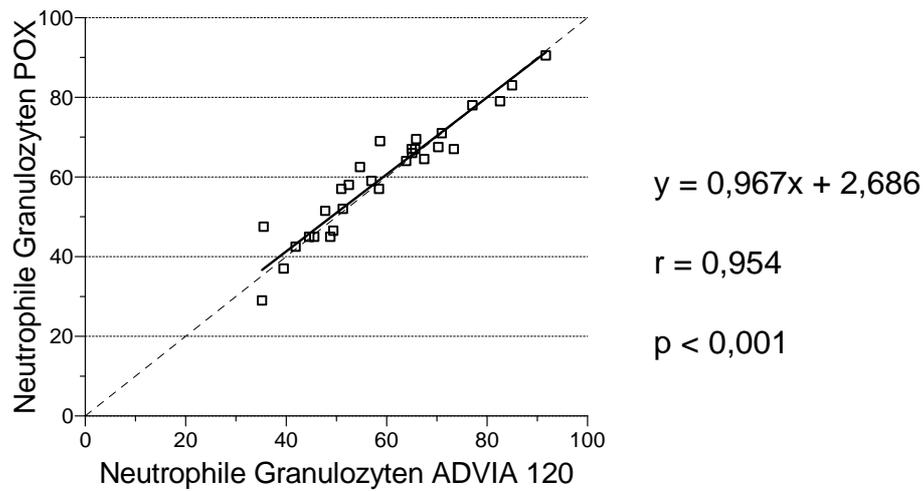


Abbildung 46: Korrelationsdiagramme des Methodenvergleichs neutrophile Granulozyten ADVIA 120/POX beim Pferd (Symbol = □) und ADVIA/PAN beim Schwein (Symbol Δ) in **SW-Version IV**; n = 30; fettgedruckte Linie = HKG, gestrichelte Linie = WH; r = Korrelationkoeffizient; p = Signifikanz

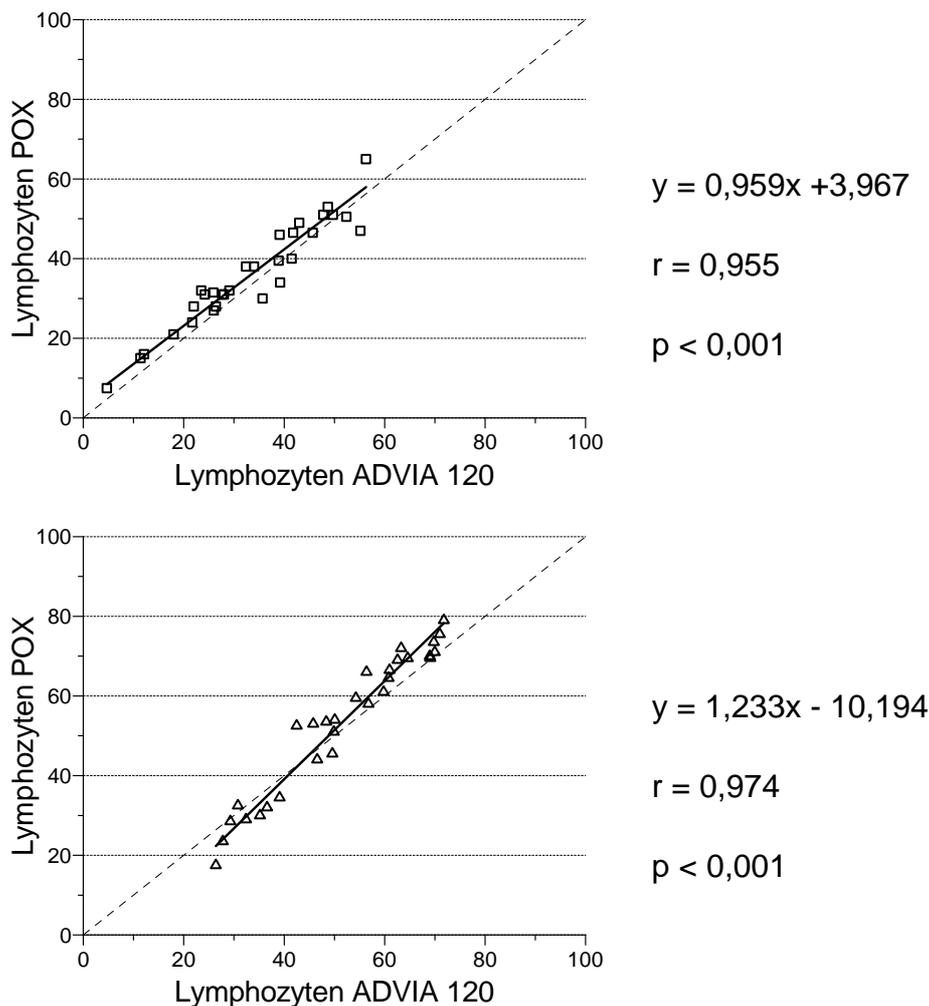


Abbildung 47: Korrelationsdiagramme des Methodenvergleichs Lymphozyten ADVIA 120/POX bei den Tierarten Pferd (Symbol = □) und Schwein (Symbol Δ) in **SW-Version IV**; n = 30; fettgedruckte Linie = HKG, gestrichelte Linie = WH; r = Korrelationskoeffizient; p = Signifikanz

Große Übereinstimmung findet sich ebenfalls für Lymphozyten des ADVIA 120 und deren manuelle Differenzierung. Hierbei liegen die Korrelationen zwischen $r = 0,955$ (Pferd) und $r = 0,974$ (Schwein). Kleinere methodische Unterschiede zeigen sich in der minimalen Verlagerung der HKG gegenüber der WH im Korrelationsdiagramm in Abbildung 47. Es werden beim Pferd über den gesamten Messbereich manuell geringgradig mehr Lymphozyten gezählt als mit dem ADVIA 120. Bei der Tierart Schwein liegen ADVIA 120 Werte im unteren Messbereich höher, während im oberen Messbereich die manuell ermittelten Werte leicht nach oben abweichen.

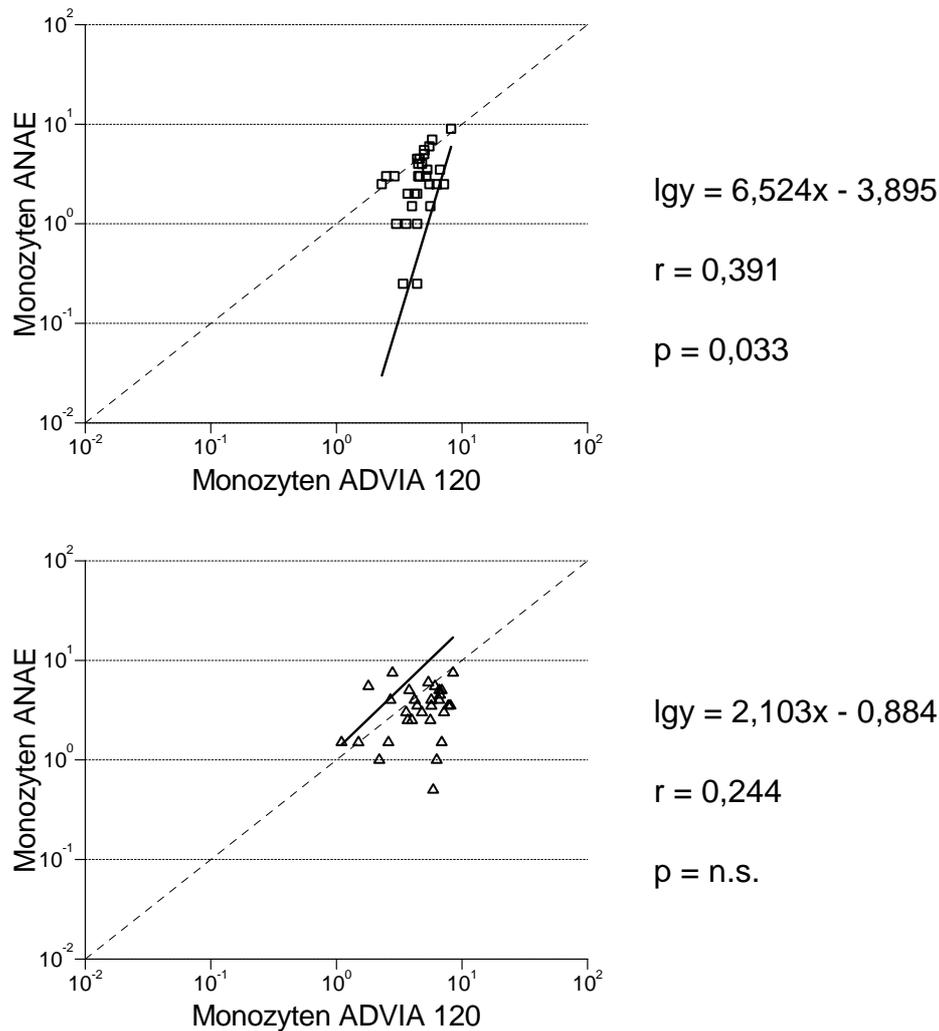


Abbildung 48: Korrelationsdiagramme des Methodenvergleichs Monozyten ADVIA 120/ANAE bei den Tierarten Pferd (Symbol = \square) und Schwein (Symbol Δ) in **SW-Version IV**; n = 30; fettgedruckte Linie = HKG, gestrichelte Linie = WH; r = Korrelationskoeffizient; p = Signifikanz

Die ermittelten Korrelationen für Monozyten in Abbildung 48 ergeben nur eine sehr geringe (Pferd) bzw. keine (Schwein) Übereinstimmung der Messwerte. Trotz der verwendeten Alpha-Naphtyl-Acetat-Esterase-Färbung kann für Pferdeblut lediglich eine schwache Signifikanz $p = 0,033$ im Vergleich ADVIA 120 und ANAE-Färbung ausgewiesen werden. Wie aus Tabelle 34 ersichtlich ist, wird insgesamt gegenüber den Färbungen PAN und POX eine bessere Korrelation erreicht. Jedoch ist die im Korrelationsdiagramm dargestellte breite Streuung der Punktwolke, als auch die starke Verlagerung der HKG Indiz dafür, dass hier starke methodische Unterschiede vorliegen.

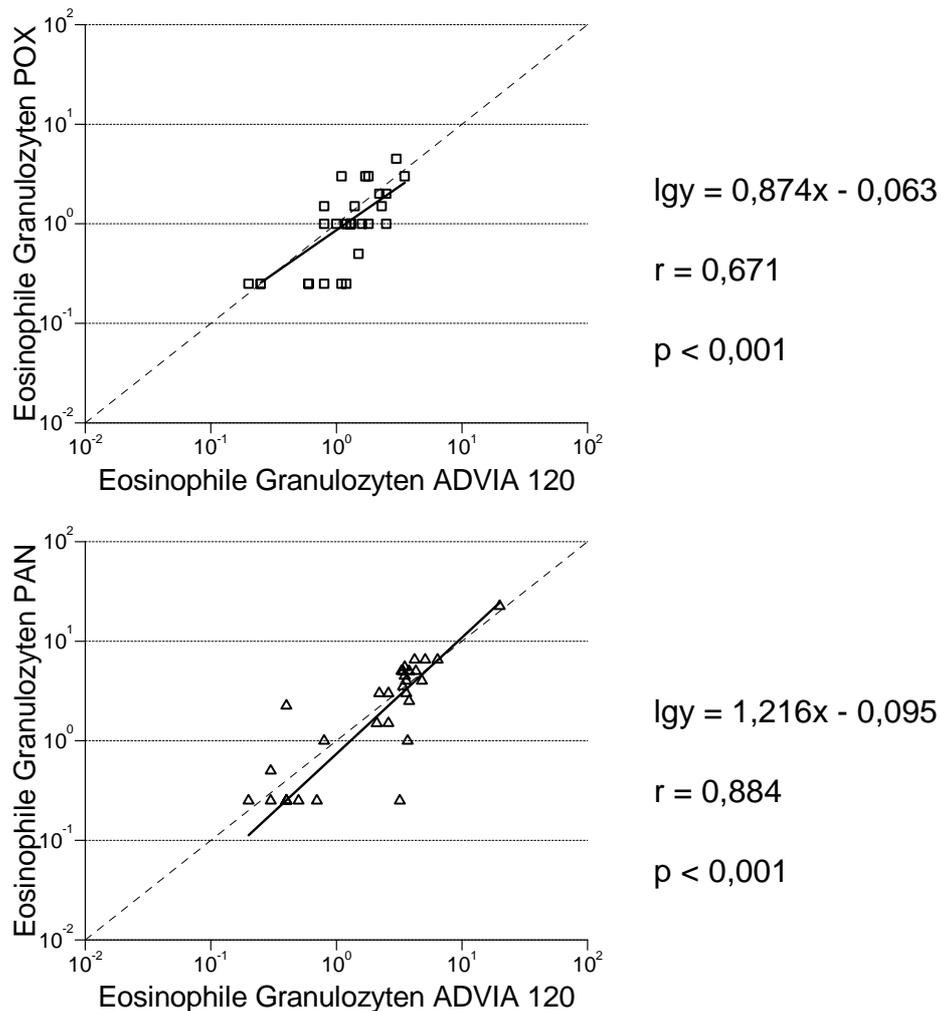


Abbildung 49: Korrelationsdiagramme des Methodenvergleichs eosinophile Granulozyten ADVIA 120/POX beim Pferd (Symbol = □) und ADVIA 120/PAN beim Schwein (Symbol Δ) in **SW-Version IV**; n = 30; fettgedruckte Linie = HKG, gestrichelte Linie = WH; r = Korrelationskoeffizient; p = Signifikanz

Eosinophile Granulozyten erreichen im Vergleich der Methoden ADVIA 120/manuelle Färbung für Pferde mit $r = 0,671$ einen akzeptablen aber doch auffallend geringeren Zusammenhang der Messergebnisse, während sie für Schweine im Vergleich zur manuellen Zählung mit $r = 0,863$ bis $0,93$ bei allen drei Färbungen sehr gut korrelieren. Die Punktwolken beider Spezies weisen eine breite Streuung um die HKG auf.

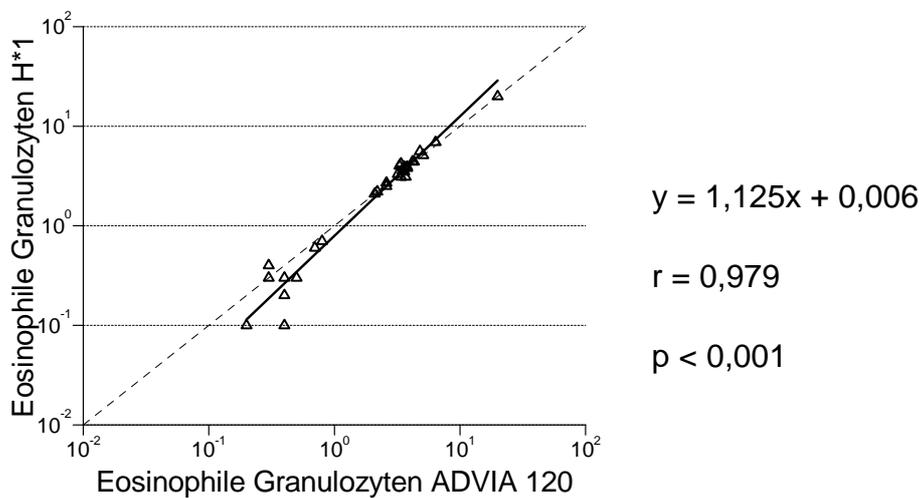
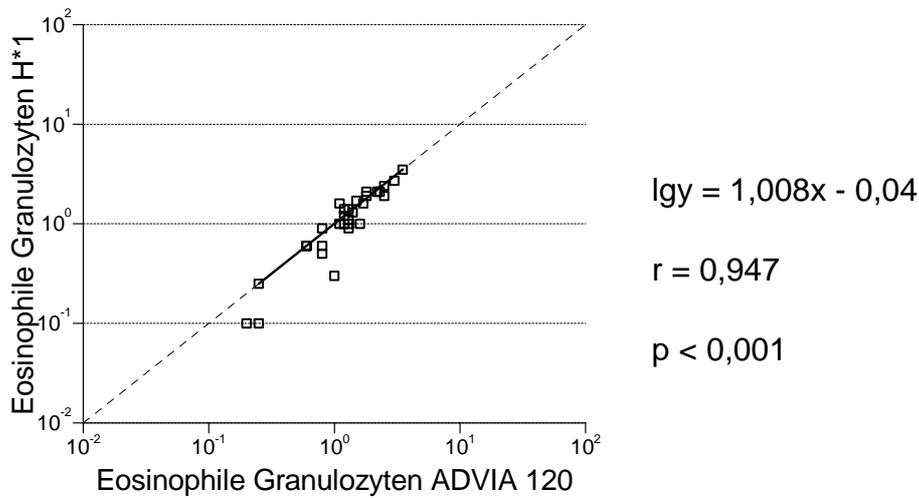


Abbildung 50: Korrelationsdiagramme des Methodenvergleichs eosinophile Granulozyten ADVIA 120/H*1 bei Pferd (Symbol = □) und Schwein (Symbol Δ) in **SW-Version IV**; n = 30; fettgedruckte Linie = HKG, gestrichelte Linie = WH; r = Korrelationkoeffizient; p = Signifikanz

Zum Vergleich soll in Abbildung 50 auf die hohen Korrelationen des ADVIA 120 mit dem H*1 hingewiesen werden. Die geringe Streuung und die annähernde Deckungsgleichheit der HKG und WH spiegeln für beide Tierarten einen guten Zusammenhang der Methoden wider.

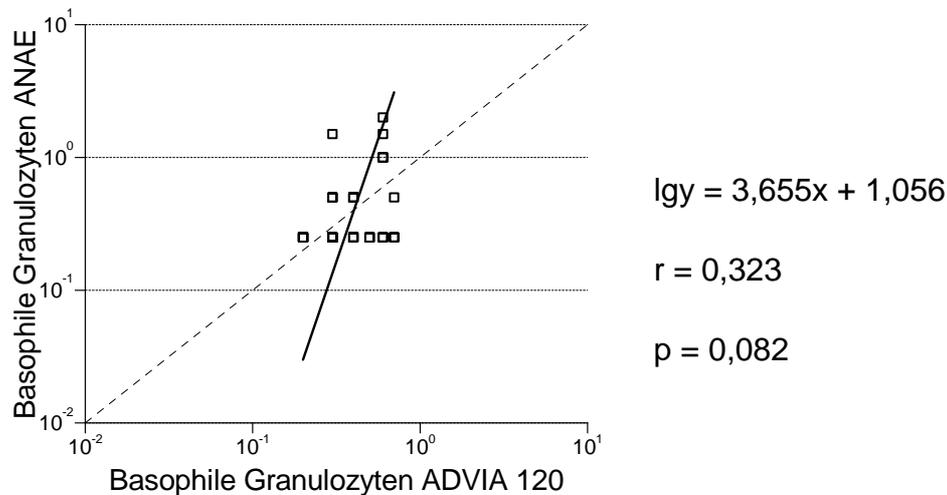


Abbildung 51: Korrelationsdiagramme des Methodenvergleichs basophile Granulozyten ADVIA 120/ANAE beim Pferd in **SW-Version IV**; n = 30; fettgedruckte Linie = HKG, gestrichelte Linie = WH; r = Korrelationskoeffizient; p = Signifikanz

Für basophile Granulozyten kann mittels Korrelationsanalyse kein Zusammenhang zwischen ADVIA 120 Messung und manueller Differenzierung festgestellt werden. Das geringe Aufkommen von basophilen Granulozyten im Blut bedingt, dass bei 200 manuell ausgezählten Zellen diese Leukozytenpopulation häufig nicht ermittelt wurde.

3.2.1.2.2.3 Mittelwertvergleich der Blutzellendifferenzierung

In Tabelle 33 sind die Resultate des Mittelwertvergleichs zwischen ADVIA 120 und H*1 aufgeführt. Da diese Parameter in einer Log-Normalverteilung vorliegen ist neben der relativen Differenz (rd) und der Signifikanz (p) der geometrische Mittelwert der Messwertverhältnisse (\bar{x}_g) ausgewiesen.

Tabelle 33: Mittelwertunterschiede des Methodenvergleichs ADVIA 120/H*1 für die Parameter der Leukozytendifferenzierung (absolute Werte) bei den Tierarten Pferd und Schwein in **SW-Version IV**; n = 30;
 d_g = geometrischer Mittelwert der Messwertverhältnisse; rd = relative Differenz beider Messgeräte; p = Signifikanz des t-Tests (*Wilcoxon-Tests) für verbundene Stichproben

Parameter	Pferd			Schwein		
	d_g	rd %	p	d_g	rd %	p
Neutrophile G.* $10^9/l$	0,052	12,0	< 0,001	0,039	9,3	< 0,001
Lymphozyten* $10^9/l$	0,032	7,7	< 0,001	0,022	5,2	< 0,001
Monozyten* $10^9/l$	0,001	0,3	n.s.	0,549	254,7	< 0,001
Eosinophile G.* $10^9/l$	0,068	17,0	< 0,001	0,084	21,3	< 0,01
Basophile G.* $10^9/l$	-0,256	55,5	< 0,01	0,097	25,0	< 0,001
LUC* $10^9/l$	-0,512	30,8	< 0,001	-0,453	64,8	< 0,001

* Parameter ist log-normalverteilt

Im Mittel ergeben sich für Lymphozyten Abweichungen von 7,7% (Pferd) und 5,2% (Schwein). Neutrophile Granulozyten weisen eine relativ große Abweichung von 12,0 (Pferd) und 9,3% (Schwein) zwischen den Geräten Advia und H*1 auf. Für alle Parameter der Leukozytendifferenzierung werden im Mittel höhere Werte am ADVIA 120 gemessen. Die Mittelwerte unterscheiden sich mit Ausnahme der Monozytenmessung beim Pferd signifikant bzw. hochsignifikant. Für Monozyten besteht nach dem t-Test keine Signifikanz der Mittelwertunterschiede bei dieser Spezies.

Die Analyse des Mittelwertunterschiedes zwischen den automatischen Differentialblutbildern von ADVIA 120 und manueller Differenzierung mittels PAN, POX und ANAE sind in Tabelle 34 aufgeführt. Die geringsten Abweichungen zeigen sich hier bei neutrophilen Granulozyten des Pferdes mit einer prozentualen Abweichung von nur 0,1%. In allen drei Vergleichsfärbungen lässt sich keine bzw. nur ein schwach signifikanter Unterschied für diese Zellpopulation nachweisen. Bei Schweinen ist hingegen zu erkennen, dass, außer bei der panoptischen Färbung (schwach signifikant), ein hochsignifikanter Unterschied im Mittelwertvergleich für

neutrophile Granulozyten besteht. Lymphozyten beim Schwein weisen nur schwach bzw. nichtsignifikante Abweichungen von $\leq 3,6\%$ auf, während für Pferdelymphozyten in den Vergleichen ADVIA 120/PAN und POX signifikante Unterschiede nachgewiesen werden. Nur in der Alpha-Naphtyl-Esterase Färbung liegt die relative Differenz der Methoden nicht signifikant bei 2%.

Sehr hohe Differenzen sind für Monozyten bei Pferd und Schwein, wie auch für basophile Granulozyten beim Schwein zu finden. Pferdebasophile zeigen auffälligerweise im Vergleich ADVIA 120/ANAE einen nicht signifikanten Unterschied mit einer relativen Abweichung von nur 1,5%. Ergebnisse dieser im Blut jedoch sehr seltenen Zellen sind mit entsprechender Vorsicht zu interpretieren.

Die Mittelwertunterschiede der eosinophilen Granulozyten weisen für beide Tierarten laut t-Test keinen signifikanten Unterschied auf. Die prozentualen Abweichungen liegen jedoch je nach Färbung bei bis zu 23 %. Geringe Differenzen der Mittelwerte von 2,5% zeigen die Werte für Eosinophile beim Pferd im Vergleich ADVIA 120/PAN und beim Schwein ($rd = 1,4\%$) im Vergleich ADVIA 120/ANAE.

Tabelle 34: Mittelwertunterschiede des Methodenvergleichs ADVIA 120/PAN, POX und ANAE für die Parameter der Leukozytendifferenzierung bei den Tierarten Pferd und Schwein in **SW-Version IV**; n = 30; $d \pm SD_d$ = mittlere Differenz mit Standardabweichung; d_g = geometrischer Mittelwert der Messwertverhältnisse; rd = relative Differenz (bezogen auf den Mittelwert der ADVIA 120-Messung); p = Signifikanz des t-Tests (*Wilcoxon-Tests) für verbundene Stichproben

Parameter	Pferd			Schwein		
	$d \pm SD_d$; d_g	rd %	p	$d \pm SD_d$; d_g	rd %	p
Neutrophile G.	PAN	0,088 ± 4,947	0,1	n.s.	-1,598 ± 4,323	-4,2 = 0,052
	POX	-0,811 ± 4,293	-1,3	n.s.	-3,681 ± 4,165	-9,8 < 0,001
	ANAE	-1,644 ± 4,075	-2,7	< 0,05	-4,464 ± 4,545	-11,9 < 0,001
Lymphozyten	PAN	-2,878 ± 4,268	-8,6	< 0,01	-1,617 ± 4,983	-3,1 = 0,086
	POX	-2,528 ± 4,006	-7,6	< 0,01	-1,633 ± 4,769	-3,1 n.s.
	ANAE	-0,678 ± 4,187	-2,0	n.s.	1,883 ± 4,734	3,6 < 0,05
Monozyten*	PAN	0,455	184,0	< 0,001	0,247	76,6 < 0,001
	POX	0,742	450,0	< 0,001	0,710	412,9 < 0,001
	ANAE	0,278	89,5	< 0,001	0,187	53,9 < 0,05
Eosinophile G.*	PAN	0,011	2,5	n.s.	0,077	19,4 n.s.
	POX	0,061	15,1	n.s.	0,081	20,4 n.s.
	ANAE	0,089	23,0	n.s.	-0,006	-1,4 n.s.
Basophile G.*	PAN	-0,068	-14,5	n.s.	0,355	126,5 < 0,001
	POX	0,169	47,5	< 0,001	0,588	286,9 < 0,001
	ANAE	0,007	1,5	n.s.	0,547	252,7 < 0,001

* Parameter ist log-normalverteilt

3.2.1.3 Linearität und Verschleppung

Die Linearitätsprüfung am ADVIA 120 berücksichtigt folgende Parameter: die Erythrozytenzahl (RBC) und den Hämoglobingehalt (HGB), die Gesamtleukozytenzahl (WBC) beider Messkanäle, sowie die Thrombozytenzahl (PLT) in verschiedenen vorgegebenen Konzentrationen.

Eine statistische Analyse der Linearitätsmessung war aufgrund der äußerst geringen Varianz zwischen den Wiederholungsmessungen der einzelnen Verdünnungsstufen nicht als Varianzquotiententest (F-Test) durchführbar. Deshalb wurden zur Veranschaulichung der Linearität die Korrelationskoeffizienten (r) mit der entsprechenden Hauptkomponentengerade ($y = mx + b$) berechnet.

Im Bereich der getesteten Konzentrationen misst das Hämatologiesystem ADVIA 120 linear. Dies wird durch die in Tabelle 35 ausgewiesenen hohen Korrelationskoeffizienten noch zusätzlich untermauert. Angegeben sind außerdem die Hauptkomponentengleichung und die Signifikanzen.

Tabelle 35: Ergebnisse der Korrelationsanalyse zur Linearitätsprüfung des ADVIA 120 bei den Tierarten Pferd und Schwein;
 r = Korrelationskoeffizient ; p = Signifikanz

Parameter	Pferd			Schwein		
	r	$y = mx + b$	p	r	$y = mx + b$	p
RBC $10^{12}/l$	1,00	$y = 0,12x + 0,07$	<0,001	1,00	$y = 0,11x + 0,18$	<0,001
HGB mmol/l	1,00	$y = 0,14x - 0,05$	<0,001	1,00	$y = 0,11x + 0,74$	<0,001
WBCB $10^9/l$	0,995	$y = 0,93x + 2,77$	<0,001	1,00	$y = 1,06x - 0,19$	<0,001
WBCP $10^9/l$	0,976	$y = 0,77x + 5,42$	<0,001	0,978	$y = 0,79x + 2,66$	<0,001
PLT $10^9/l$	0,999	$y = 9,08x + 68,24$	<0,001	*	*	*

* nicht durchgeführt

Mit der laut Evaluationsprotokoll vorgegebenen Zentrifugationstechnik war es nicht möglich, eine entsprechende Anzahl von Schweinethrombozyten anzureichern. Aus diesem Grund wurde auf die Linearitätsprüfung dieses Parameters verzichtet.

Die ermittelte Verschleppung (carry over) der oben genannten Parameter zwischen den einzelnen Messungen am ADVIA 120 werden in Tabelle 36 aufgeführt.

Tabelle 36: Prozentuale Verschleppung des ADVIA 120

Parameter	Pferd		Schwein	
	Verschleppung (%)		Verschleppung (%)	
RBC $10^{12}/l$	0,14		0,12	
HGB mmol/l	0,00		0,29	
WBCB $10^9/l$	0,15		0,16	
WBPC $10^9/l$	0,41		0,28	
PLT $10^9/l$	0,00		*	

* nicht durchgeführt

Die Analyse der Verschleppung ergibt für beide Tierarten bei den wichtigsten Parametern Werte zwischen 0 und 0,4 %.

3.2.1.4 Antikoagulanzenvergleich

Zur Überprüfung des Einflusses von K₃EDTA, Li-Heparin und Na-Citrat auf die Morphologie der einzelnen Zellpopulationen und somit auf das Messergebnis des ADVIA 120 und des H*1 (nur bei Schweineblut) wurden 7 Pferde- und 10 Schweineblutproben mit diesen antikoaguliert und analysiert. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erhalten, mussten die Messwerte von dem 1:10 verdünnten Citrat-Blut um den Faktor 1,1 korrigiert werden.

Nach der Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholungen im Faktor Antikoagulanzen (Tabelle 37 bis 40) erfolgt ein paarweiser Vergleich anhand des t-Tests für verbundene Stichproben unter Anwendung des vergleichsbezogenen Signifikanzniveaus (sog. Bonferroni-Adjustierung). Die Auswertungen werden im Folgenden beschrieben, wobei zunächst auf die Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse eingegangen werden soll.

Bei der Tierart Pferd werden statistisch hochsignifikante Abweichungen für die Parameter MCV, MCHC, RDW, PLT und MPV ermittelt. Signifikante Unterschiede treten bei CHCM, HDW und den absoluten Zahlen der basophilen Granulozyten auf. Kein signifikanter Einfluss durch das verwendete Antikoagulanzen ergibt sich beim Pferd für die Parameter WBC, RBC, HGB, HCT, MCH und PDW, sowie für die absoluten Zahlen der Retikulozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten.

Im Vergleich dazu nimmt bei der Tierart Schwein das Antikoagulanzen auffallend häufiger hochsignifikanten Einfluss auf das Messergebnis. Betroffen sind hier die Parameter WBC, RBC, HGB, HCT und MCV sowie MCHC, CHCM, MPV und die absolute Zahl der basophilen Granulozyten. Den PDW ebenso wie neutrophile Granulozyten und Lymphozyten beeinflussen die verschiedenen Gerinnungshemmer hingegen nur schwach signifikant. Kein signifikanter Unterschied wird für die Parameter MCH, die absoluten Retikulozytenzahlen, eosinophile Granulozyten und Monozyten ermittelt.

Tabelle 37: Einfluss der verschiedenen Antikoagulanzen auf die Messergebnisse der Blutzellzählung bei den Tierarten Pferd und Schwein; n = 7 bzw. 10; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer mit Standardabweichung; p = Signifikanz

Parameter	Anti-koagulanz	Pferd		Schwein	
		$\bar{x} \pm SD$	p	$\bar{x} \pm SD$	p
WBC ($10^9/l$)	K ₃ EDTA	7,03 ± 1,43		16,64 ± 3,06	
	Li-Heparin	6,19 ± 1,06	n.s.	16,12 ± 3,32	<0,001
	Na-Citrat	6,98 ± 1,92		17,19 ± 2,58	
RBC ($10^{12}/l$)	K ₃ EDTA	7,65 ± 0,54		7,65 ± 0,95	
	Li-Heparin	7,57 ± 0,50	n.s.	7,72 ± 0,92	< 0,001
	Na-Citrat	7,61 ± 0,53		7,97 ± 0,95	
HGB (mmol/l)	K ₃ EDTA	8,29 ± 0,43		8,60 ± 0,63	
	Li-Heparin	8,21 ± 0,53	n.s.	8,69 ± 0,55	< 0,001
	Na-Citrat	8,31 ± 0,39		9,15 ± 0,78	
HCT (l/l)	K ₃ EDTA	0,36 ± 0,02		0,427 ± 0,04	
	Li-Heparin	0,36 ± 0,02	n.s.	0,429 ± 0,03	< 0,001
	Na-Citrat	0,35 ± 0,02		0,445 ± 0,04	
MCH (fmol)	K ₃ EDTA	1,08 ± 0,04		1,13 ± 0,08	
	Li-Heparin	1,08 ± 0,04	n.s.	1,13 ± 0,08	n.s.
	Na-Citrat	1,09 ± 0,05		1,15 ± 0,07	
MCV (fl)	K ₃ EDTA	47,30 ± 1,94		56,21 ± 3,18	
	Li-Heparin	46,97 ± 1,90	< 0,001	55,78 ± 3,07	< 0,001
	Na-Citrat	46,46 ± 2,12		55,98 ± 2,93	
MCHC (mmol/l)	K ₃ EDTA	22,93 ± 0,28		20,11 ± 0,39	
	Li-Heparin	23,07 ± 0,35	< 0,001	20,30 ± 0,47	< 0,001
	Na-Citrat	23,56 ± 0,25		20,57 ± 0,31	
CHCM (mmol/l)	K ₃ EDTA	22,12 ± 0,18		20,62 ± 0,35	
	Li-Heparin	22,27 ± 0,18	< 0,01	20,85 ± 0,28	< 0,001
	Na-Citrat	22,64 ± 0,20		21,02 ± 0,29	

Fortsetzung Tabelle 37

Parameter	Anti-koagulanz	Pferd		Schwein	
		$\bar{x} \pm SD$	p	$\bar{x} \pm SD$	p
RDW (%)	K ₃ EDTA	16,69 ± 0,69		17,14 ± 0,69	
	Li-Heparin	16,69 ± 0,69	< 0,001	17,08 ± 0,67	< 0,01
	Na-Citrat	16,96 ± 0,63		17,07 ± 0,63	
HDW (mmol/l)	K ₃ EDTA	1,09 ± 0,06		1,12 ± 0,07	
	Li-Heparin	1,10 ± 0,06	< 0,001	1,10 ± 0,07	< 0,01
	Na-Citrat	1,09 ± 0,03		1,13 ± 0,08	
PLT (10 ⁹ /l)	K ₃ EDTA	138 ± 30,23		345 ± 152	
	Li-Heparin	101 ± 30,11	<0,001	304 ± 111	< 0,01
	Na-Citrat	134 ± 30,14		358 ± 148	
MPV (fl)	K ₃ EDTA	4,81 ± 0,49		7,62 ± 1,10	
	Li-Heparin	4,80 ± 0,30	< 0,001	8,64 ± 1,02	< 0,001
	Na-Citrat	5,94 ± 0,78		7,76 ± 0,98	
PDW (%)	K ₃ EDTA	75,9 ± 10,0		72,0 ± 6,28	
	Li-Heparin	90,1 ± 14,9	n.s.	77,2 ± 8,48	< 0,05
	Na-Citrat	81,7 ± 8,5		71,5 ± 8,85	
IReti (10 ⁹ /l)	K ₃ EDTA	5,54 ± 2,82		116 ± 40	
	Li-Heparin	9,37 ± 2,18	n.s.	125 ± 38	n.s.
	Na-Citrat	10,54 ± 1,93		130 ± 46	

Tabelle 38: Einfluss der verschiedenen Antikoagulanzen auf die Messergebnisse der Blutzelldifferenzierung bei den Tierarten Pferd und Schwein; n = 10; geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) mit Standardabweichung; p = Signifikanz

Parameter	Anti-koagulanzen	Pferd		Schwein	
		$\bar{x}_g \pm SD$	p	$\bar{x}_g \pm SD$	p
Neutrophile G.* ($10^9/l$)	K ₃ EDTA	4,43 ± 1,25		9,25 ± 2,99	
	Li-Heparin	3,76 ± 1,33	n.s.	9,05 ± 3,30	< 0,05
	Na-Citrat	4,16 ± 1,46		9,21 ± 2,58	
Lymphozyten* ($10^9/l$)	K ₃ EDTA	1,87 ± 1,60		6,11 ± 1,38	
	Li-Heparin	1,77 ± 1,56	n.s.	5,69 ± 1,41	< 0,05
	Na-Citrat	1,99 ± 1,44		6,60 ± 1,38	
Monozyten* ($10^9/l$)	K ₃ EDTA	0,28 ± 1,25		0,45 ± 1,70	
	Li-Heparin	0,14 ± 1,71	< 0,05	0,47 ± 1,64	n.s.
	Na-Citrat	0,28 ± 1,40		0,46 ± 1,73	
Eosinophile G.* ($10^9/l$)	K ₃ EDTA	0,08 ± 2,60		0,09 ± 2,09	
	Li-Heparin	0,07 ± 2,47	n.s.	0,12 ± 1,86	n.s.
	Na-Citrat	0,08 ± 2,36		0,10 ± 2,01	
Basophile G.* ($10^9/l$)	K ₃ EDTA	0,03 ± 1,57		0,12 ± 1,80	
	Li-Heparin	0,09 ± 1,65	< 0,01	0,27 ± 1,74	< 0,001
	Na-Citrat	0,04 ± 2,28		0,14 ± 1,75	

* Parameter ist log-normalverteilt

Im Anschluss wurde der paarweise Vergleich der Antikoagulanzen mittels t-Test (s. Tab. 39) durchgeführt. In die Betrachtung gingen nur die Parameter ein, deren Abweichung in der einfaktoriellen Varianzanalyse mit $p < 0,01$ oder $< 0,001$ (signifikant bzw. hochsignifikant) zu bewerten war. Hieraus folgte für den MCHC bei der Tierart Pferd bzw. WBC, MCHC, CHCM, MPV und absolute Anzahl basophiler Granulozyten bei der Tierart Schwein ein hochsignifikanter Unterschied zwischen Messungen mit verschiedenen Antikoagulanzen. Signifikante Abweichungen wurden beim Pferd für MCV, CHCM, PLT und absolute Anzahl basophiler Granulozyten und beim Schwein für RBC, HGB, HCT und MCV gefunden. Welche Wirkung die einzelnen Antikoagulanzen auf diese Parameter hatten, ist in Tabelle 39 und 40 anhand eines Mittelwertvergleichs dargestellt.

Tabelle 39: Paarvergleich der Antikoagulanzen beim Pferd; n = 7;
 $d \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung bzw.
 geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) der Messwertverhältnisse;
 rd = prozentuale Abweichung; p^B = Signifikanz nach Bonferroni-
 Adjustierung

Parameter	Paarvergleich Antikoagulanz	Pferd		
		$d \pm SD_d$	rd %	p^B
MCV (fl)	K ₃ EDTA / Li-Heparin	0,33 ± 0,15	0,7	<0,0033
	K ₃ EDTA / Na-Citrat	0,97 ± 0,28	2,0	<0,0033
	Li-Heparin / Na-Citrat	0,65 ± 0,30	0,6	<0,0033
MCHC (mmol/l)	K ₃ EDTA / Na-Citrat	-0,63 ± 0,17	-2,8	< 0,00033
CHCM (mmol/l)	K ₃ EDTA / Li-Heparin	-0,15 ± 0,08	-0,7	<0,0033
	K ₃ EDTA / Na-Citrat	-0,57 ± 0,2	-2,6	<0,0033
PLT (10 ⁹ /l)	K ₃ EDTA / Li-Heparin	37,36 ± 15,21	27,0	<0,0033
Baso* (10 ⁹ /l)	K ₃ EDTA / Li-Heparin	-0,51	-224,0	< 0,0033

*Parameter ist log-normalverteilt

Für die Parameter MCV, MCHC und CHCM kann eine prozentuale Abweichung von bis zu +/- 2,8% zwischen verschiedenen Antikoagulanzen festgestellt werden. Die Thrombozytenzahl weicht im Vergleich K₃EDTA/Li-Heparin bis zu 27% ab. Basophilen Granulozyten erreichen aufgrund ihres geringen Aufkommens und der hohen Standardabweichungen (s. Tab. 39) rechnerisch einen Wert von rd = 224%.

Tabelle 40: Paarvergleich der Antikoagulanzen beim Schwein; n = 10;
 $d \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung bzw.
 geometrischer Mittelwert (\bar{x}_g) der Messwertverhältnisse;
 rd = prozentuale Abweichung; p^B = Signifikanz nach Bonferroni-
 Adjustierung

Parameter	Paarvergleich Antikoagulanz	Schwein		
		$d \pm SD$	rd %	p^B
WBC ($10^9/l$)	K ₃ EDTA / Li-Heparin	0,52 ± 0,61	3,1	n.s.
	Li-Heparin / Na-Citrat	-1,70 ± 0,81	-10,5	< 0,00033
RBC ($10^{12}/l$)	Li-Heparin / Na-Citrat	-0,4 ± 0,24	-5,3	<0,0033
HGB (mmol/l)	K ₃ EDTA / Na-Citrat	-0,09 ± 0,17	-1,0	<0,0033
	Li-Heparin / Na-Citrat	-0,52 ± 0,32	-6,0	<0,0033
HCT (l/l)	Li-Heparin / Na-Citrat	-0,02 ± 0,01	-4,8	<0,0033
MCV (fl)	K ₃ EDTA / Na-Citrat	0,74 ± 0,4	1,3	<0,0033
MCHC (mmol/l)	K ₃ EDTA / Na-Citrat	-0,41 ± 0,09	-2,0	< 0,00033
CHCM (mmol/l)	K ₃ EDTA / Na-Citrat	-0,38 ± 0,16	-1,8	< 0,00033
PLT ($10^9/l$)	K ₃ EDTA / Li-Heparin	40,5 ± 56,0	11,8	n.s.
	Li-Heparin / Na-Citrat	-56,2 ± 47,8	18,6	<0,016
MPV (fl)	K ₃ EDTA / Li-Heparin	-1,02 ± 0,45	-13,4	< 0,00033
	Li-Heparin / Na-Citrat	0,94 ± 0,42	10,9	< 0,00033

Für die Messung des WBC werden in mit Li-Heparin antikoaguliertem Schweineblut 10,5% niedrigere Werte ermittelt als mit Na-Citratblut, während K₃EDTA gegenüber Li-Heparin mit rd = 3,1% keine statistisch signifikante Abweichung zeigt.

Die Werte für die Erythrozytenzahl, HGB, HCT, MCV, MCHC und CHCM weisen eine relative Differenz von bis zu +/- 6% auf.

Für die Thrombozytenzahl kann beim Schwein keine bzw. nur eine schwache Signifikanz ermittelt werden, auffälligerweise liegen hier die relativen Abweichungen jedoch bei 11,8 bzw. 18,6%. Das mittlere Plättchenvolumen zeigt in K₃EDTABlut im Mittel 13,4% und in Citratblut 10,9% niedrigere Werte als in Li-Heparinblut. Eine weitere Auswertung ergab eine Erhöhung der gezählten der PLT-Clumps

(Thrombozytenaggregate) in mit Li-Heparin antikoaguliertem Blut um 41% gegenüber K₃EDTA.

3.2.1.5 Blutalterung und Lagerungstemperatur

Im folgenden Kapitel soll der Einfluss der Lagerungsdauer und Lagerungstemperatur auf die Messdaten des ADVIA 120 für jeweils 10 Pferde- und Schweineblutproben dargestellt werden. Hierzu wurden K₃EDTA antikoagulierte Blutproben bei Zimmertemperatur (22°C) und bei Kühlschranktemperatur (4°C) 72 Stunden aufbewahrt. Messzeitpunkte für Pferdeproben waren 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 Stunden, während die Schweineblutproben zu den Zeitpunkten 0, 3, 9, 12, 24, 36, 48 und 72 Stunden gemessen wurden.

Es erfolgt zunächst eine Darstellung der mittels zweifaktorieller Varianzanalyse ermittelten einflussnehmenden Parameter in Tabellenform. Im Anschluss sollen die Verlaufsuntersuchungen im tierartlichen Vergleich zwischen Pferd und Schwein graphisch anhand ausgewählter Parameter gezeigt werden.

Tabelle 41: Einfluss der Lagerungstemperatur und Lagerungsdauer auf die ADVIA 120 Messung für die Parameter der Blutzellzählung von Pferde und Schweineblutproben; n = 10

Parameter		Signifikanzen p					
		Pferd			Schwein		
		Temp	Zeit	Temp/Zeit	Temp	Zeit	Temp/Zeit
WBC	10 ⁹ /l	n.s.	< 0,01	< 0,05	n.s.	n.s.	< 0,05
RBC	10 ¹² /l	n.s.	< 0,0001	< 0,0001	< 0,05	< 0,0001	= 0,01
HGB	mmol/l	n.s.	< 0,01	n.s.	< 0,01	< 0,001	n.s.
HCT	l/l	n.s.	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
MCV	fl	< 0,01	< 0,0001	< 0,001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
MCH	fmol	< 0,01	< 0,0001	< 0,01	< 0,01	< 0,0001	= 0,0001
MCHC	mmol/l	< 0,05	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
CHCM	mmol/l	n.s.	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
RDW	%	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,01	< 0,0001	< 0,0001
HDW	mmol/l	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	= 0,001	< 0,0001	< 0,0001
PLT	10 ⁹ /l	= 0,01	< 0,0001	< 0,0001	< 0,05	< 0,0001	< 0,0001
MPV	fl	< 0,001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,01	< 0,0001	< 0,0001
PDW	%	< 0,05	< 0,0001	< 0,0001	< 0,01	< 0,0001	< 0,0001
Reti	10 ⁹ /l	n.s.	< 0,0001	n.s.	< 0,01	< 0,0001	< 0,0001

Aus Tabelle 41 ist zu entnehmen, dass die Lagerungstemperatur gegenüber der Lagerungsdauer bei beiden Tierarten einen geringeren Einfluss hat. Insgesamt betrachtet kann gesagt werden, dass Schweineblut für die Parameter der Blutzellzählung häufiger eine signifikante bzw. hochsignifikante Abweichung aufgrund von Lagerungstemperatur und Lagerungsdauer zeigt.

Im Gegensatz hierzu findet man für die Parameter der Blutzelldifferenzierung, wie aus Tabelle 42 ersichtlich, mehrfach höhere Signifikanzen bei Pferdeblutproben.

Tabelle 42: Einfluss der Lagerungstemperatur und Lagerungsdauer auf die ADVIA 120 Messung für die Parameter der Blutzellendifferenzierung von Pferde und Schweineblutproben; n = 10

Parameter	Signifikanzen p					
	Pferd			Schwein		
	Temp	Zeit	Temp/Zeit	Temp	Zeit	Temp/Zeit
Neutrophile G. $10^9/l$	< 0,001	< 0,0001	< 0,0001	n.s.	= 0,04	< 0,01
Lymphozyten $10^9/l$	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,05	n.s.	< 0,0001
Monozyten $10^9/l$	< 0,05	< 0,0001	n.s.	n.s.	< 0,0001	n.s.
Eosinophile G. $10^9/l$	= 0,015	< 0,0001	< 0,0001	n.s.	< 0,0001	< 0,01
Basophile G. $10^9/l$	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	n.s.	< 0,0001	< 0,05
LUC $10^9/l$	n.s.	< 0,0001	n.s.	< 0,05	< 0,0001	< 0,001

Die graphische Darstellung soll die Messwertabweichung vom Ausgangswert durch die Lagerungszeit verdeutlichen. Aufgetragen sind die berechneten Mittelwerte für die zwei verschiedenen Lagerungstemperaturen der jeweils 10 Proben mit ihren Standardabweichungen und die prozentuale Differenz zum Ausgangswert.

Die Gesamtleukozytenzahl (WBC) der Abbildung 52 zeigt bei Pferdeblut temperaturunabhängige Stabilität bis 12 Stunden nach Blutentnahme, dann sinkt die Leukozytenzahl der bei Zimmertemperatur gelagerten Proben auf 5 % unter das Ausgangsniveau, während die "kalten" Proben nach 36 Stunden wieder auf das Ausgangsniveau steigen.

Bei 4°C gelagerten Schweineblutproben (Abb. 53) bleiben die Leukozytenwerte über 72 h stabil, während bei 22 °C gelagerten Proben die Werte bereits bis zur 12. Stunde um mehr als 5 % abgenommen haben.

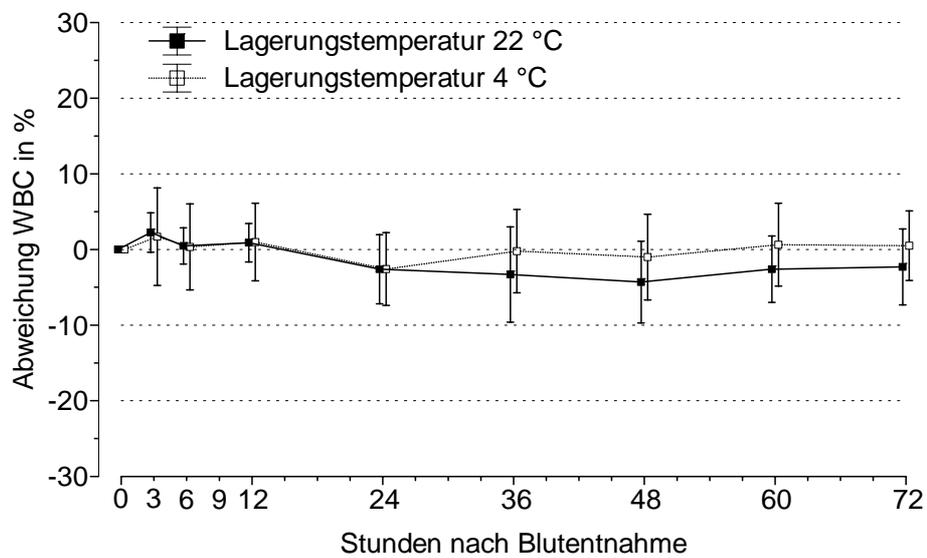


Abbildung 52: Abweichung der absoluten Leukozytenzahl vom Ausgangswert beim Pferd in %; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

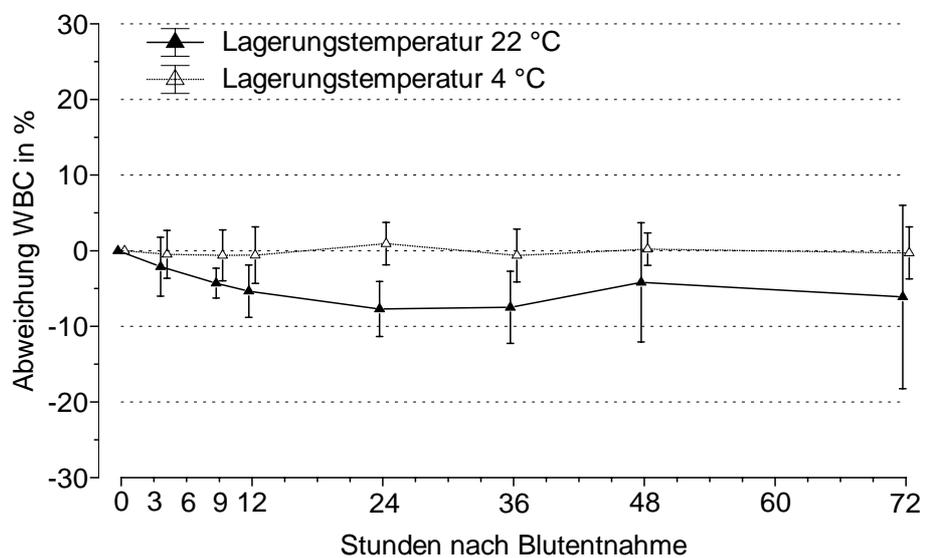


Abbildung 53: Abweichung der absoluten Leukozytenzahl vom Ausgangswert beim Schwein in %; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

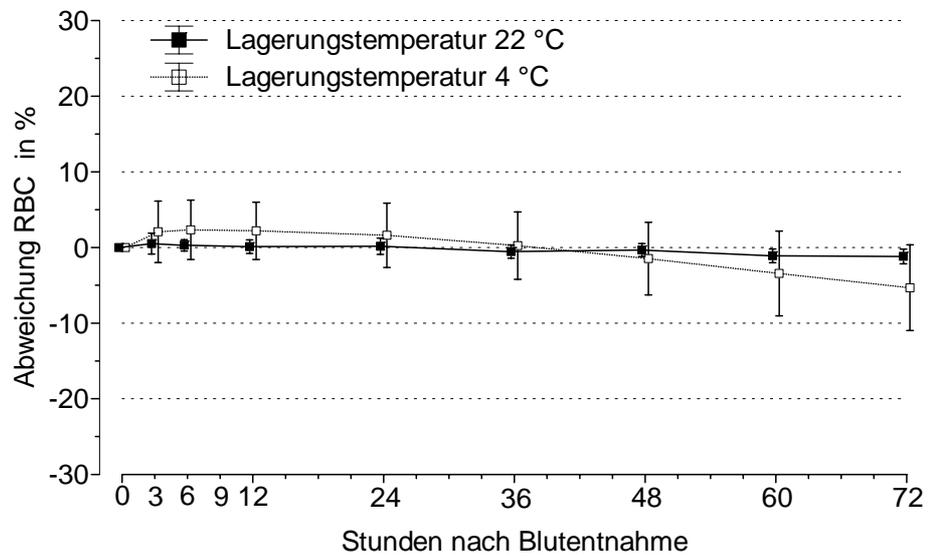


Abbildung 54: Abweichung der absoluten Erythrozytenzahl vom Ausgangswert beim Pferd in %; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

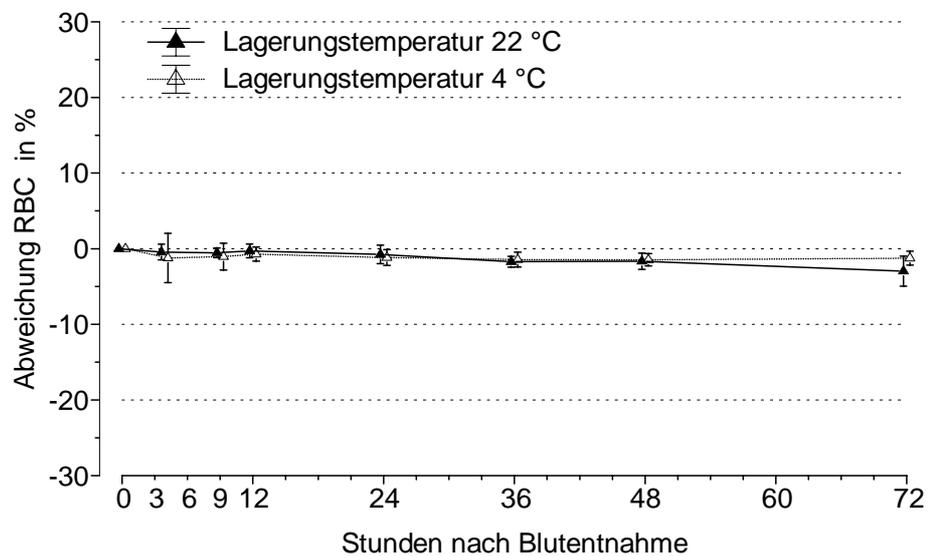


Abbildung 55: Abweichung der absoluten Erythrozytenzahl vom Ausgangswert beim Schwein in %; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

Die Erythrozytenzahlen in Abbildung 54 und 55 zeigen bei Zimmertemperatur für beide Tierarten bis zu 72 h nahezu stabile Werte.

Das mittlere Erythrozytenvolumen (Abb. 56 und 57) weist zwischen den beiden Tierarten deutliche Unterschiede auf. Während in Pferdeblut kaum Abweichungen des MCV erkennbar werden, weist Schweineblut einen kontinuierlichen Anstieg des MCV bei Zimmertemperatur bis zu 13% auf. Bei Kühlschranktemperatur gelagerte Proben bleiben bis zu 12 h stabil und steigen bis zur 72. Stunde um 4% an.

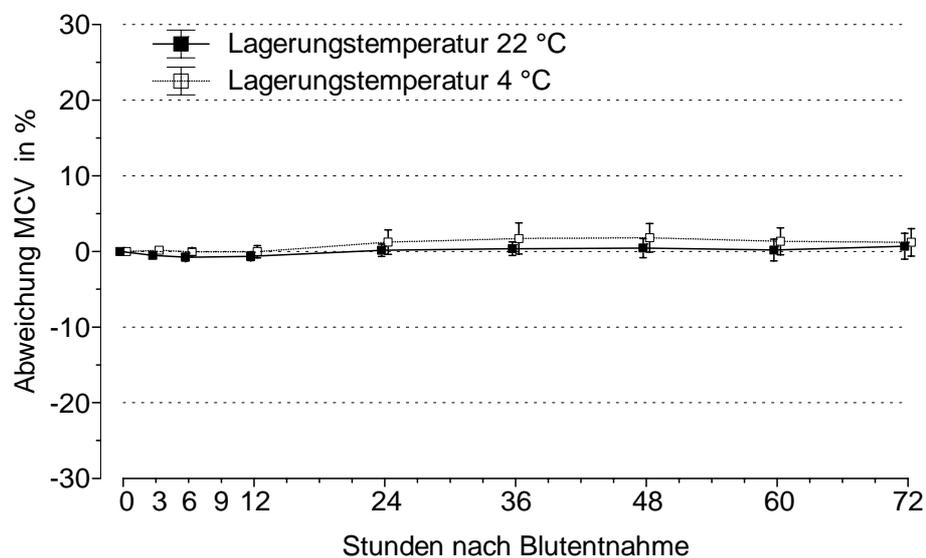


Abbildung 56: Abweichung des mittleren Erythrozytenvolumens vom Ausgangswert beim Pferd in %; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

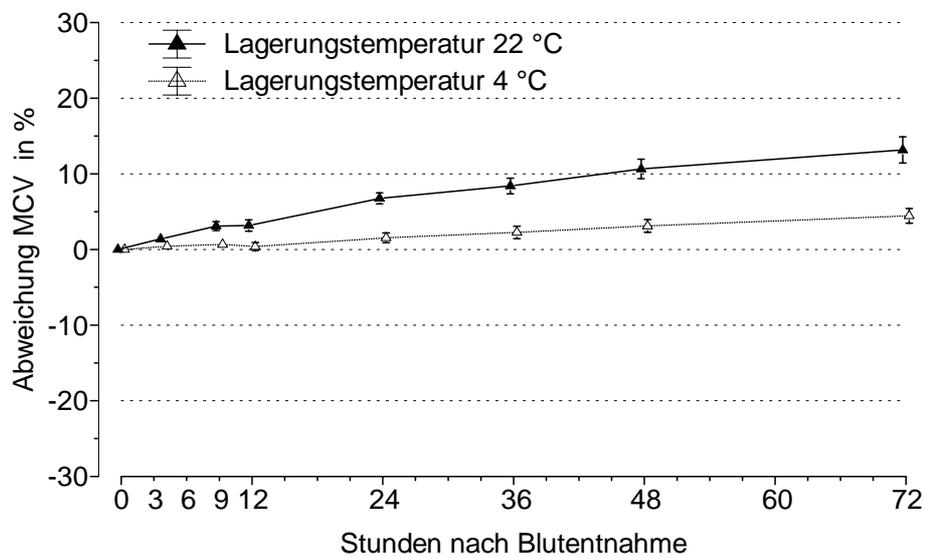


Abbildung 57: Abweichung des mittleren Erythrozytenvolumens vom Ausgangswert beim Schwein in %; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

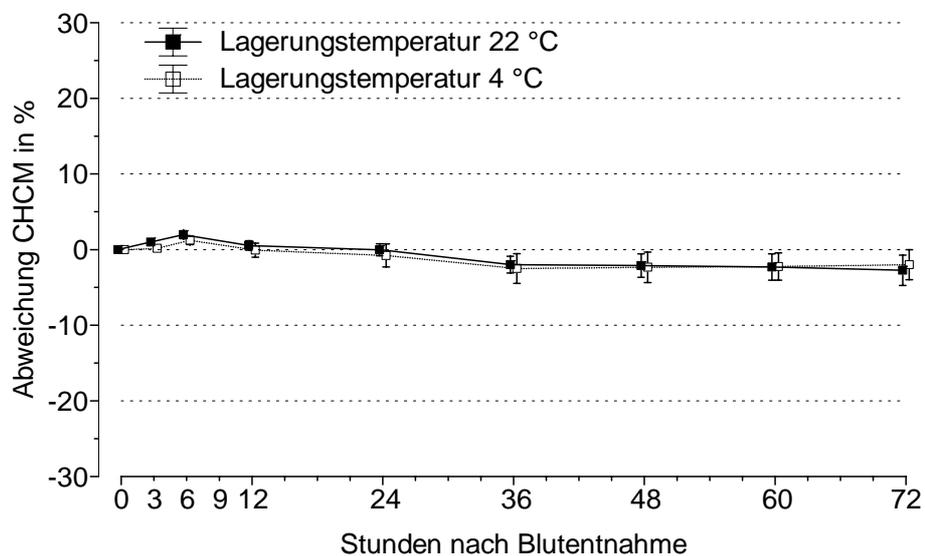


Abbildung 58: Abweichung des CHCM vom Ausgangswert beim Pferd in %; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

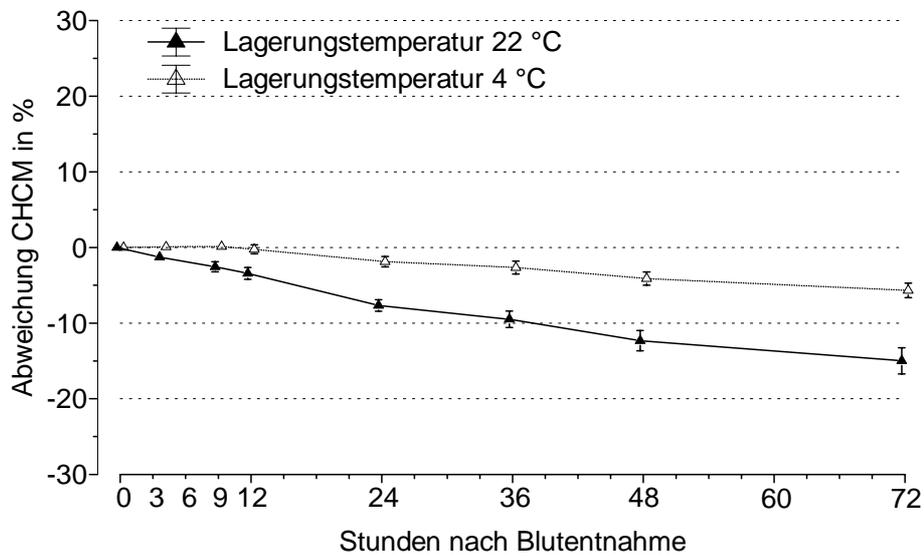


Abbildung 59: Abweichung des CHCM vom Ausgangswert beim Schwein in %; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

Das gemessene Pendant zum MCHC, der CHCM, weist in Pferdeblut (Abb. 58) ebenfalls keine nennenswerten Abweichungen vom Ausgangswert auf, während die Werte beim Schwein (Abb. 59) eine stetige Absenkung für 22°C-Proben bis zu 15% zeigen. Bei gekühlten Proben bleibt der CHCM bis 12 Stunden stabil und sinkt dann um 5%.

Die Hämoglobinverteilungsbreite (HDW) in Pferdeblut (Abb. 60) steigt bei kühlschrankgelagerten Proben ab 6 h nach Blutentnahme hochsignifikant an und erreicht eine Abweichung von bis zu 100%. 22°C-gelagerte Pferdeblutproben und die Schweineblutproben (Abb. 61) weisen nur einen deutlich moderateren Anstieg von bis zu 20% auf.

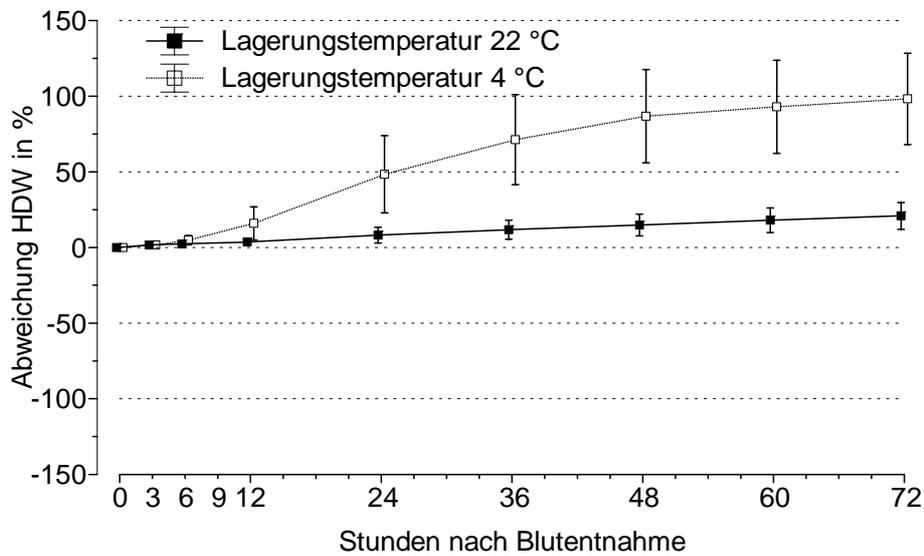


Abbildung 60: Abweichung des HDW vom Ausgangswert beim Pferd in %; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

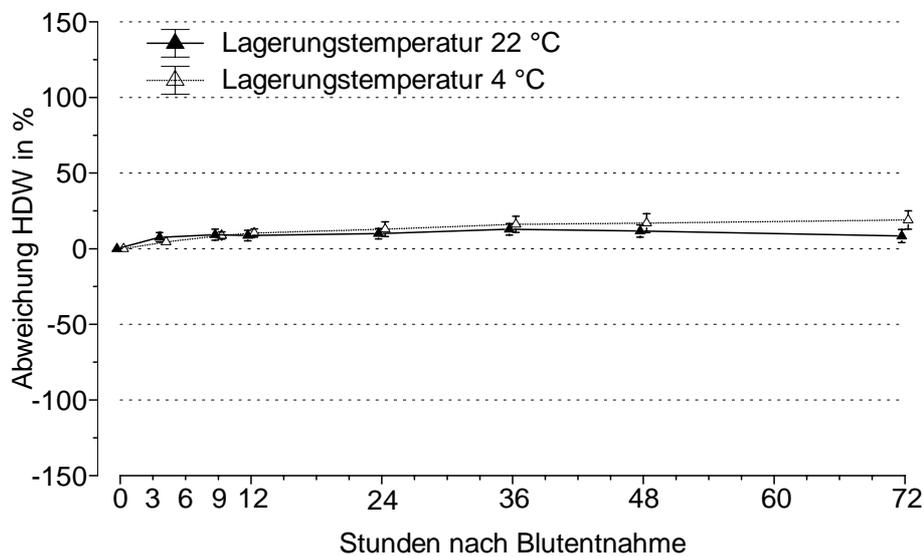


Abbildung 61: Abweichung des HDW vom Ausgangswert beim Schwein in %; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

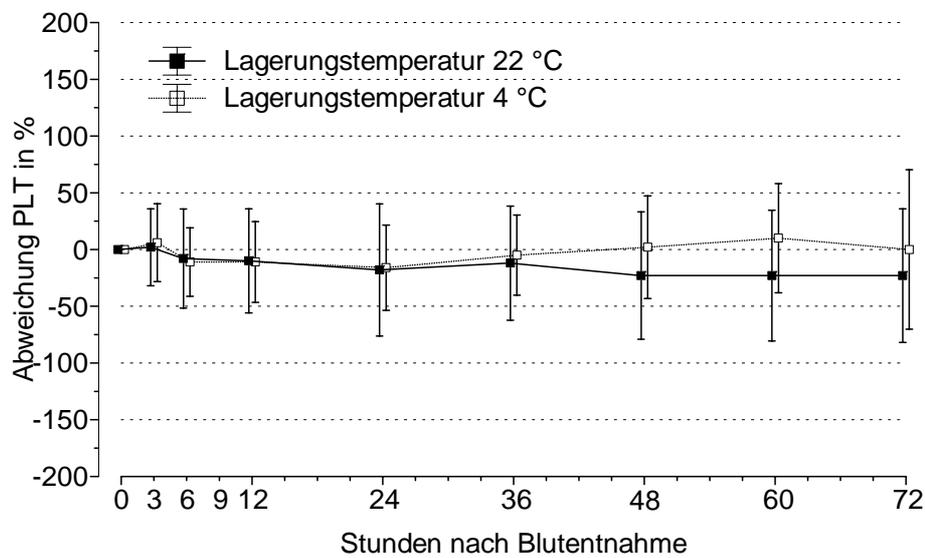


Abbildung 62: Abweichung der Thrombozytenzahl vom Ausgangswert beim Pferd in %; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

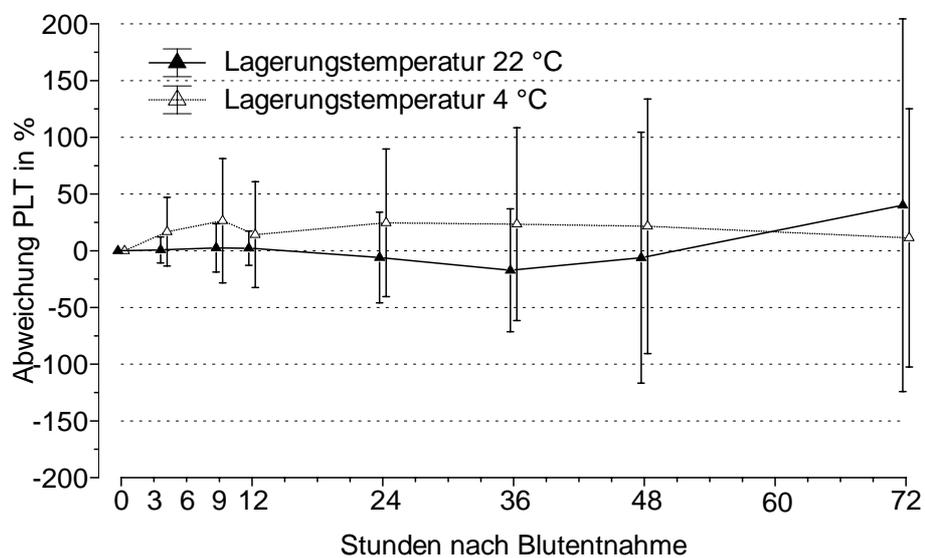


Abbildung 63: Abweichung der Thrombozytenzahl vom Ausgangswert beim Schwein in %; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

In Abb. 62 bis 65 wird der Verlauf der prozentualen Abweichung von der Thrombozytenzahl und dem mittlerem Plättchenvolumen dargestellt.

Thrombozyten des Pferdes zeigen bis 24 Stunden nach Blutentnahme unabhängig von der Lagerungstemperatur eine Absenkung von 18%. Danach fallen die Werte der ungekühlten Proben (22°C) weiter bis auf eine Differenz von 23% ab, während die gekühlten Proben (4°C) bis zur 72. Stunde wieder das Niveau des Ausgangswertes erreichen. Schweinethrombozyten sind mit einer max. Abweichung von +40% (72h) bei Zimmertemperatur und +26% (9h) bei Kühlschranktemperatur im Vergleich zu Pferdeblut etwas lagerungsabhängiger. Hier sind in den ersten 24 Stunden die ungekühlten Proben stabiler, während über einen längeren Lagerungszeitraum von 72 Stunden die gekühlten Proben mit +11% deutlich näher am Ausgangsniveau liegen. Ebenfalls auffällig sind die besonders hohen Standardabweichungen (SD) um den Mittelwert der Thrombozyten in Schweineblut.

Das mittlere Plättchenvolumen zeigt für Pferdeblut einen sehr stabilen Kurvenverlauf der bei 22° gelagerten Proben. Das bei 4°C gelagerte Pferdeblut erfährt einen Anstieg des MPV um +32% zur 60. Stunde, fällt dann aber ebenfalls wieder auf etwa +10% gegenüber dem Ausgangswert ab.

Für Schweineblut ergibt sich ein kontroverses Bild. Hier liegen die Kühlschrankwerte bis 12 h stabil und auch im weiteren Verlauf deutlich unter denen bei Zimmertemperatur ermittelten MPV-Werten, die bis zu +121 % ansteigen.

Insgesamt kann gesagt werden, dass die Parameter der Thrombozyten die auffälligsten tierartspezifischen Unterschiede aufweisen und der Einfluss von Lagerungsdauer und -temperatur deutlich in Erscheinung tritt.

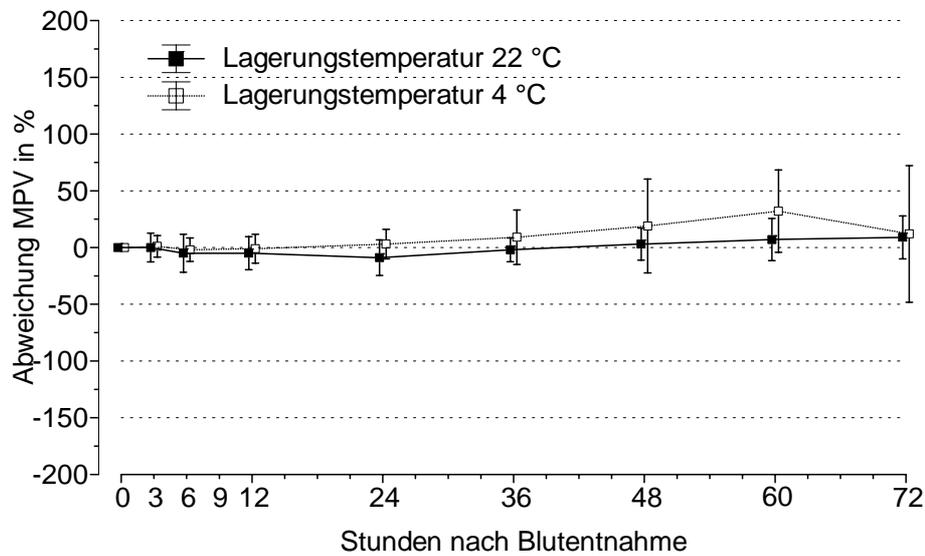


Abbildung 64: Abweichung des mittleren Thrombozytenvolumens vom Ausgangswert beim Pferd in %; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

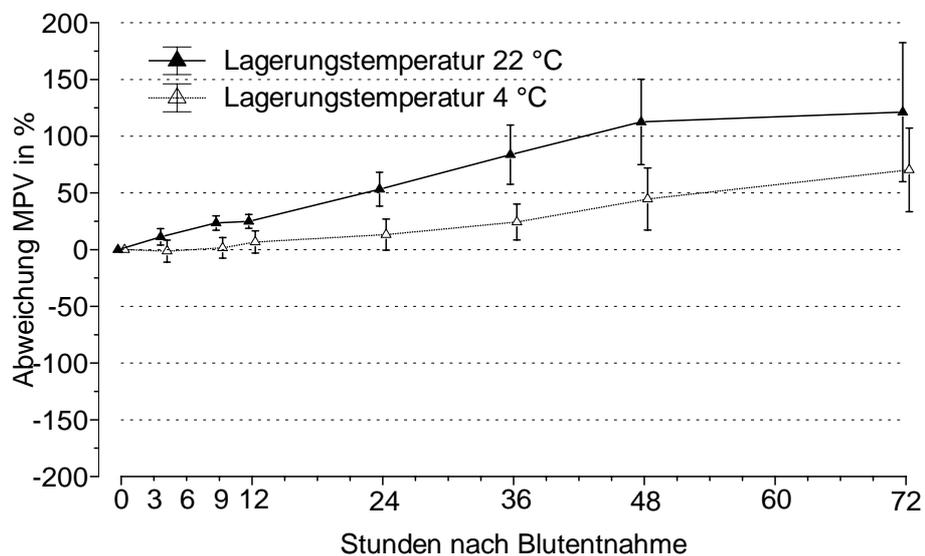


Abbildung 65: Abweichung des mittleren Thrombozytenvolumens vom Ausgangswert beim Schwein in %; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

Die folgenden Abbildungen zeigen den Verlauf der Messwerte der einzelnen Leukozytenpopulationen unter Einfluss von Lagerungstemperatur und -dauer.

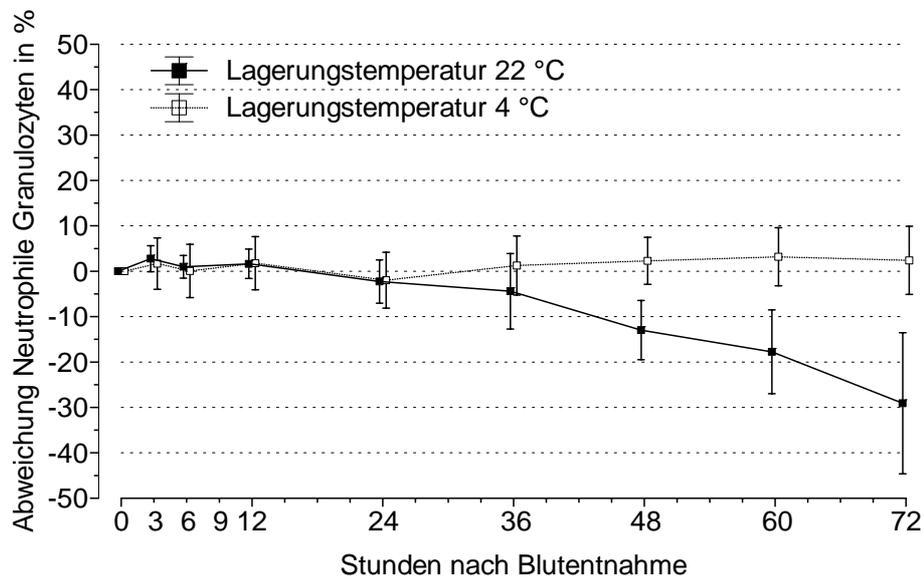


Abbildung 66: Abweichung der Neutrophilenzahl vom Ausgangswert beim Pferd in %; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

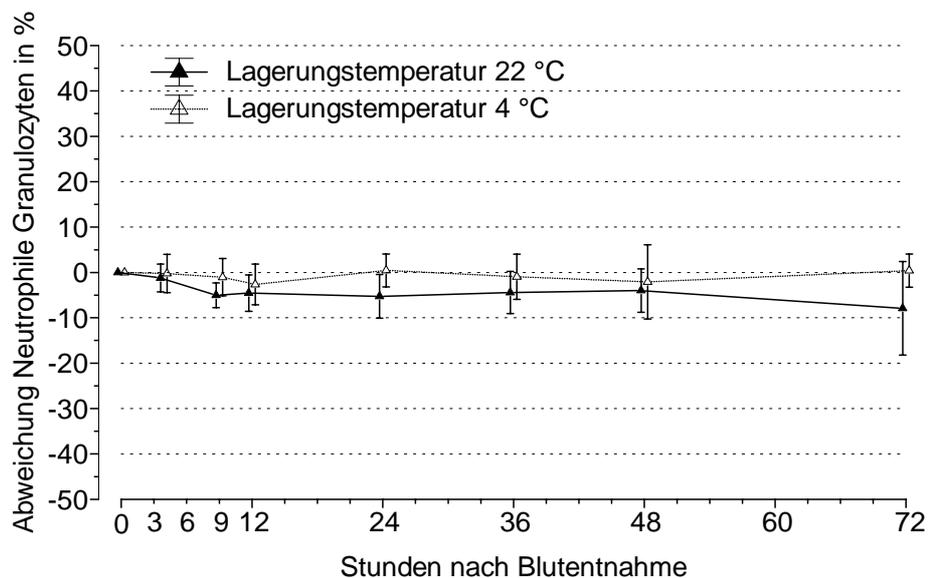


Abbildung 67: Abweichung der Neutrophilenzahl vom Ausgangswert beim Schwein in %; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

Abbildung 66 und 67 zeigen die prozentualen Abweichungen vom Ausgangswert für neutrophile Granulozyten. Für die Tierart Pferd kann festgehalten werden, dass diese Zellpopulation temperaturunabhängig bis 24 Stunden stabil bleibt, während Schweineblut bereits nach 9 Stunden eine Verringerung der Neutrophilen um 5% zeigt. Pferdeblut zeigt im weiteren Verlauf bei ungekühlter Probe einen deutlichen Abfall um knapp 30%. Mit 8% deutlich moderater ist die Verringerung der Zellzahl in Schweineblut. Die bei 4°C gelagerten Proben erweisen sich hingegen für beide Tierarten bezüglich der Neutrophilen als äußerst stabil.

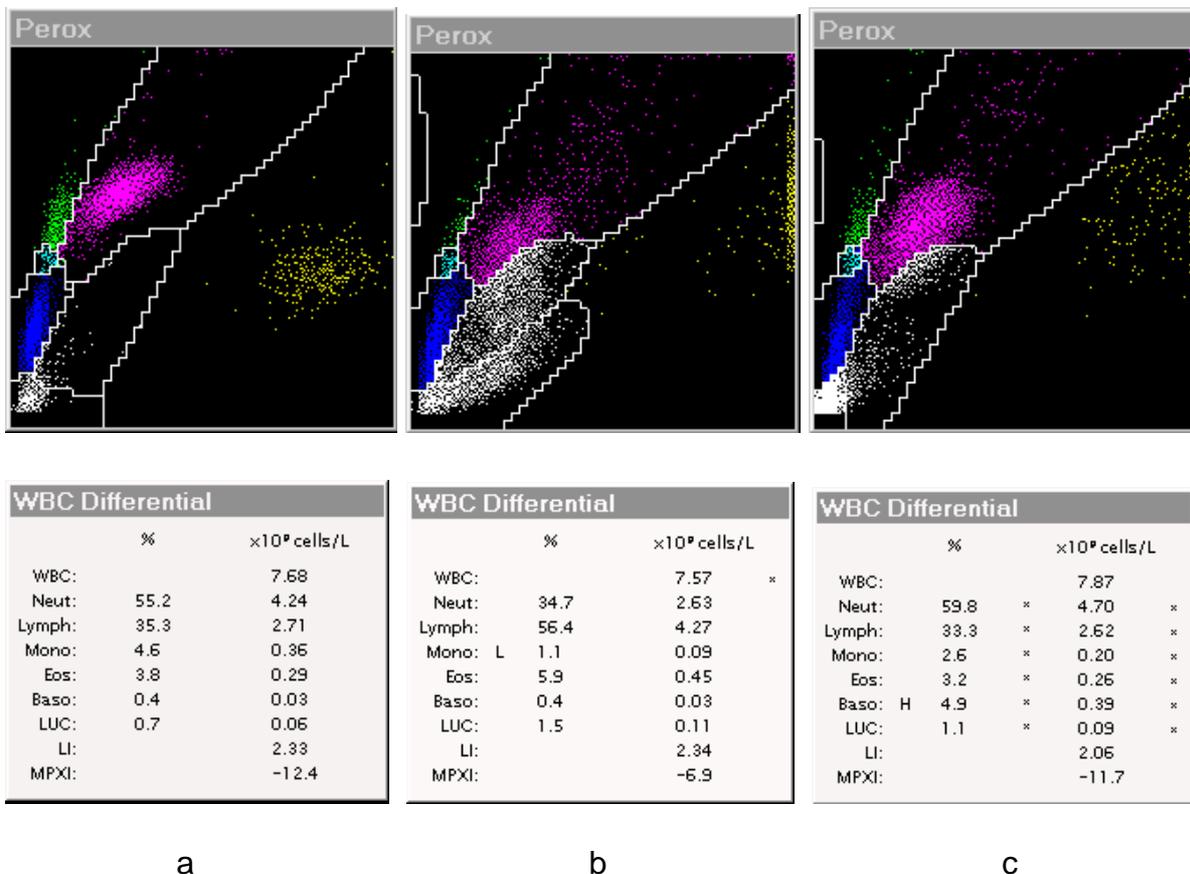


Abbildung 68: Peroxidase-Scattergramm, Leukogramm Pferd-Nr. 213;
Messzeitpunkte 0 h (a); 72 h bei 22°C (b); 72 h bei 4°C (c)

Wie im Leukogramm der Abbildung 68 deutlich zu erkennen, erscheint über den Zeitraum von 72 Stunden ein völlig verändertes Differenzialblutbild des Patienten Nr. 213. Zu Beginn der Messreihe erhält man eine deutliche Abgrenzung der einzelnen Zellpopulationen, die im Verlauf eine immer stärker werdende Streuung aufweist. Die Wolke der neutrophilen Granulozyten (pink) sinkt gegenüber der Ausgangsmessung

ab. Im Winkel von 45° erkennt man den Bereich des sog. Rauschens, das sind Thrombozyten, Erythrozytenstroma und Zellbruchstücke, die nicht in der Gesamtleukozahl (LeukoP) und im Leukodifferenzial enthalten sind. Die gekühlte Probe ist nicht diesen starken Veränderungen unterworfen. Die Neutrophilenwolke zeigt eine erheblich geringere Absenkung und das Differenzialblutbild bleibt mit Ausnahme der Basophilen im akzeptablen Bereich.

Die Lymphozytenpopulation in Pferdeblut in Abb. 69 zeigt dementsprechend ein gegensätzliches Bild. Während die kühlen Proben wieder mit einer maximalen Abweichung um 5% relativ stabil bleiben, erfahren die Lymphozyten bei Zimmertemperatur nach der 24. Stunde einen rasanten Anstieg von über 70%. Schweineblut (s. Abb. 70) verhält sich bei 4°C ebenfalls stabil, weist dagegen ab 48 Stunden nach Blutentnahme bei Zimmertemperatur einen deutlichen Rückgang der Zelldichte um 17% auf.

Monozyten (Abb. 71 u. 72) weisen graphisch für beide Tierarten ein ähnliches Bild auf. Gekühlt beim Pferd bis 12, beim Schwein nur bis 9 Stunden stabil, verringert sich diese Zellpopulation stetig bei ungekühlten Proben im Verlauf der Untersuchung um fast 60 (Pferd) bzw. 70% (Schwein). Kühlung beeinflusst diesen Verlauf kaum.

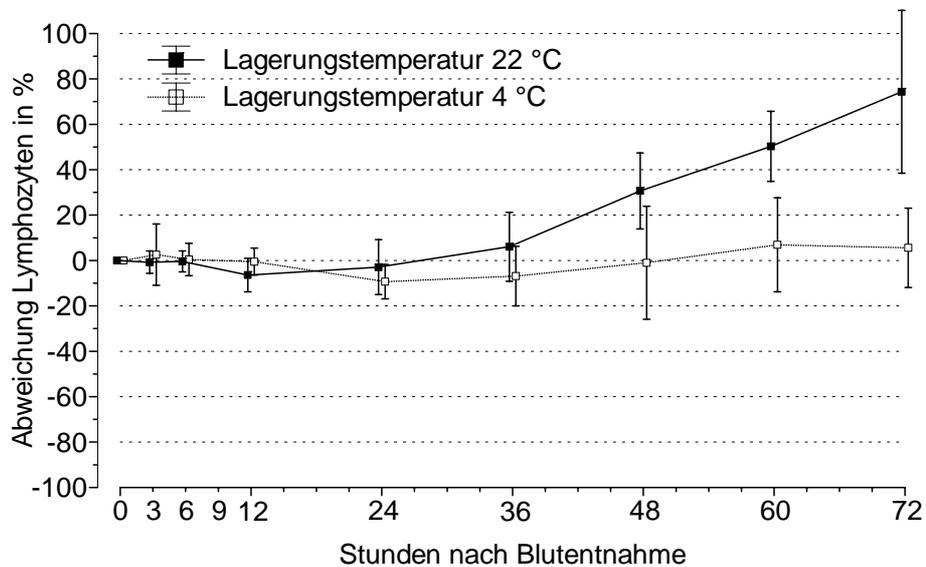


Abbildung 69: Abweichung der Lymphozytenzahl vom Ausgangswert beim Pferd in %; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

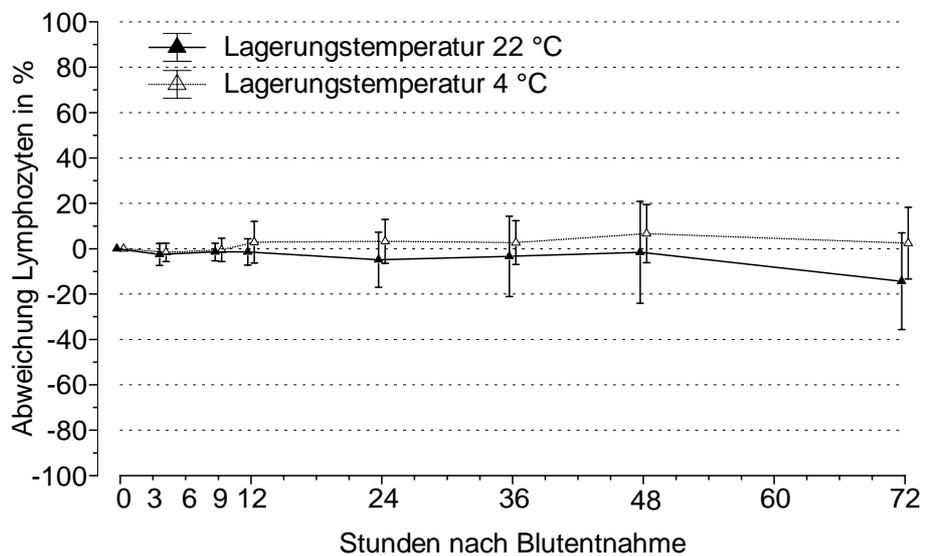


Abbildung 70: Abweichung der Lymphozytenzahl vom Ausgangswert beim Schwein in %; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

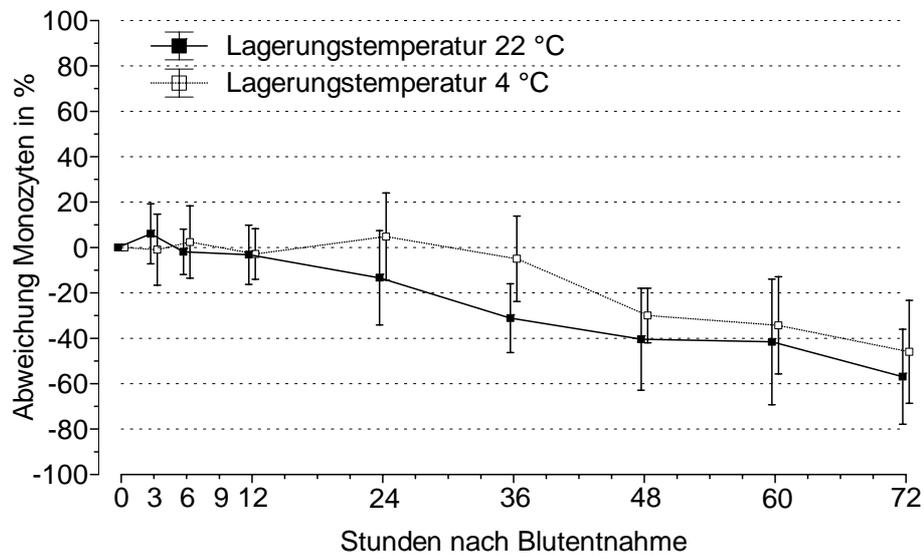


Abbildung 71: Abweichung der Monozytenzahl vom Ausgangswert beim Pferd in %; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

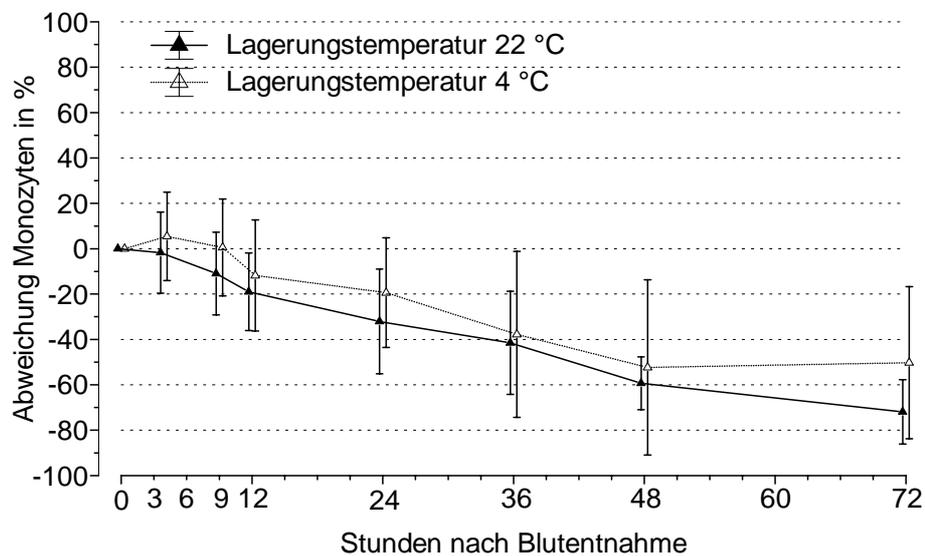


Abbildung 72: Abweichung der Monozytenzahl vom Ausgangswert beim Schwein in %; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

Aufgrund des geringen Zellaufkommens und der im Verhältnis dazu hohen prozentualen Abweichungen, wird für die folgenden, verbleibenden Zellpopulationen die absolute Differenz zum Ausgangswert dargestellt.

Für eosinophile Granulozyten des Pferdes (Abb. 73) kann eine temperaturunabhängige Stabilität bis 36, gekühlt bis 72 Stunden nach Blutentnahme festgestellt werden. Bei 22°C gelagerten Proben findet man eine fortschreitende Erhöhung der Absolutwerte, die mit $< 0,1$ Zellen $10^9/l$ jedoch nur statistische, nicht aber klinische Relevanz hat. In Schweineblut (Abb. 74) zeigen Eosinophile auffallend hohe Streuungen um den Mittelwert. Die temperaturunabhängige Stabilität bis 9 Stunden und eine maximale absolute Abweichung bei 22°C von 0,17 Zellen $10^9/l$ zum Zeitpunkt 48 Stunden sind dementsprechend sehr fragliche Ergebnisse.

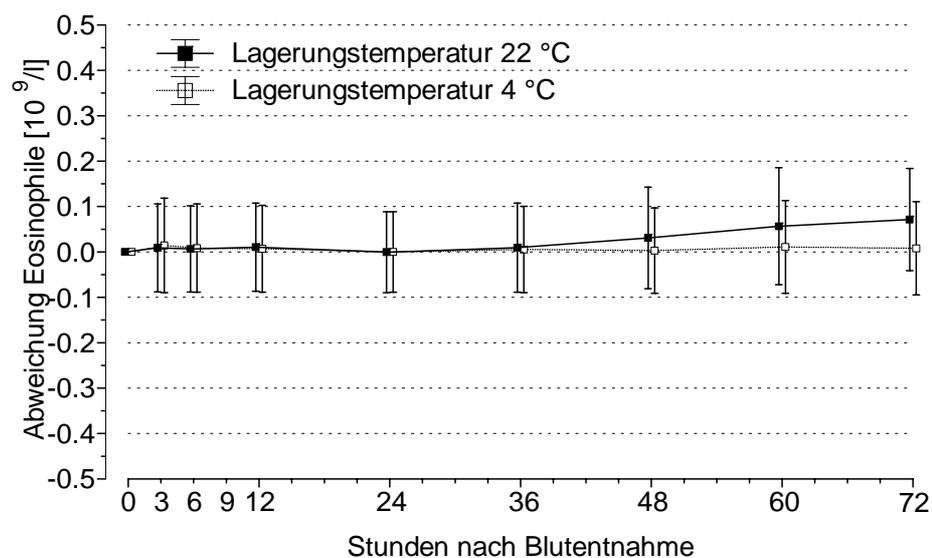


Abbildung 73: Absolute Abweichung der Eosinophilenzahl ($10^9/l$) vom Ausgangswert beim Pferd; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

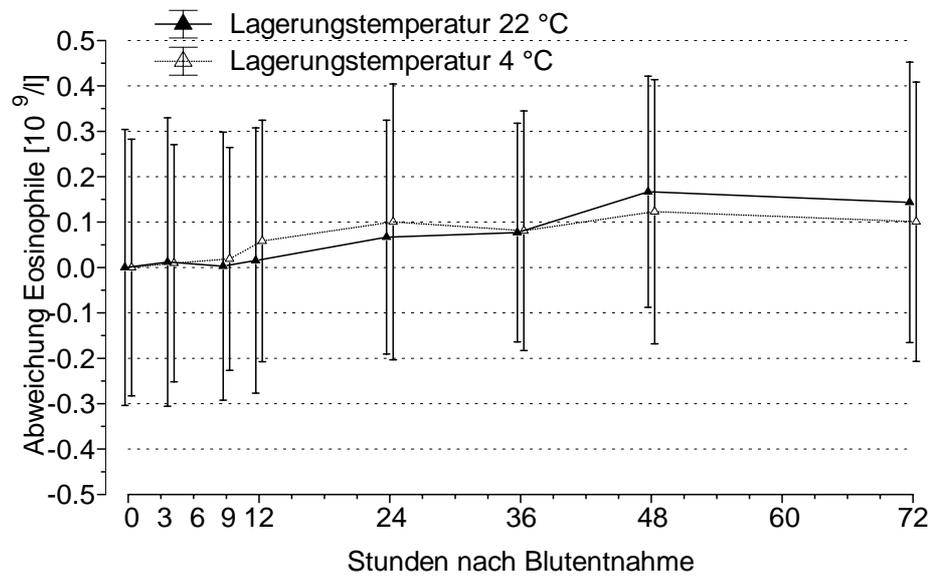


Abbildung 74: Absolute Abweichung der Eosinophilenzahl ($10^9/l$) vom Ausgangswert beim Schwein; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

Ein interessanter Kurvenverlauf kann für die basophilen Granulozyten des Pferdes (Abb. 75) gezeigt werden (vergleiche auch Kap. 4.1.5.2 und Abb. 92). Man erhält je nach Lagerungstemperatur einen Peak von Zellen zum Messzeitpunkt 24 Stunden (22°C) und 60 Stunden (4°C). Bei Zimmertemperatur gelagerte Proben erreichen nach 48 Stunden wieder das Ausgangsniveau. In Schweinblut hingegen, erweisen sich basophile Granulozyten über 72 Stunden als stabil.

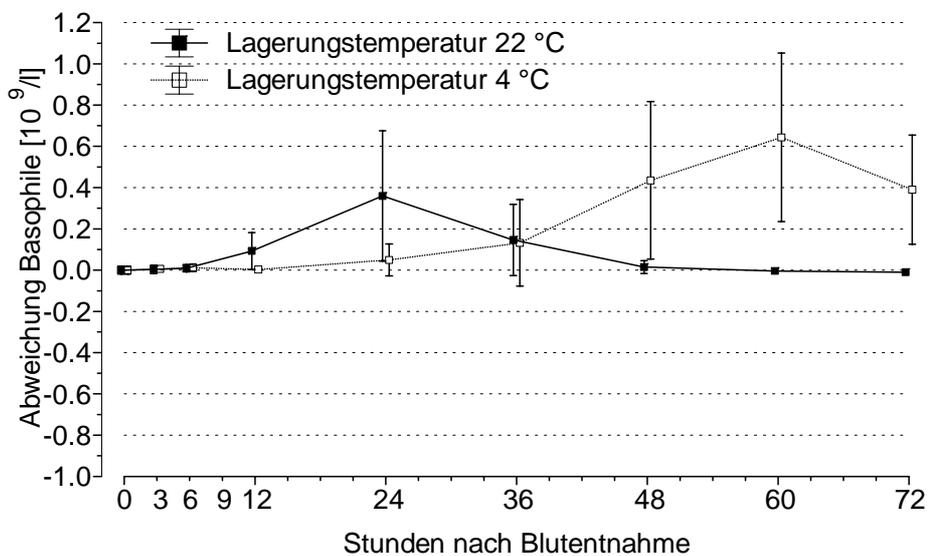


Abbildung 75: Absolute Abweichung der Basophilenzahl ($10^9/l$) vom Ausgangswert beim Pferd; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

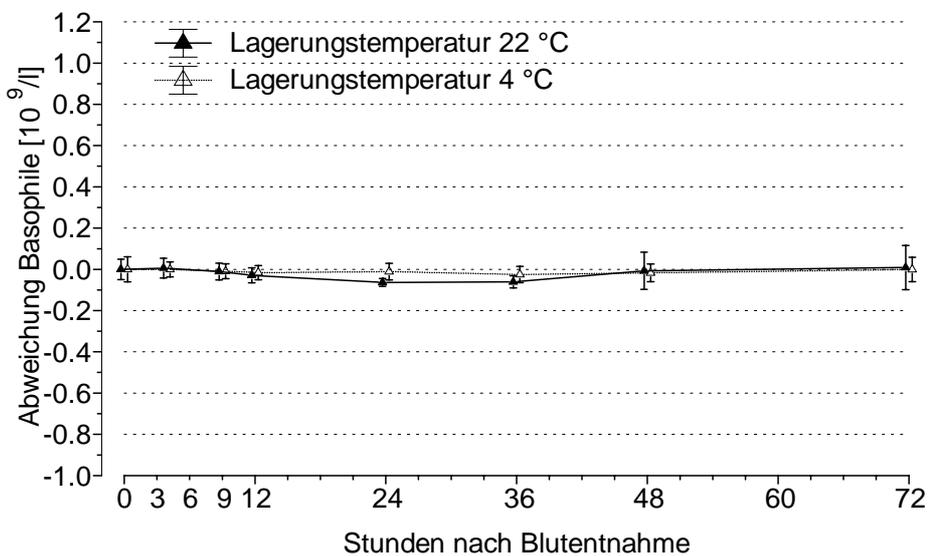


Abbildung 76: Absolute Abweichung der Basophilenzahl ($10^9/l$) vom Ausgangswert beim Schwein; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

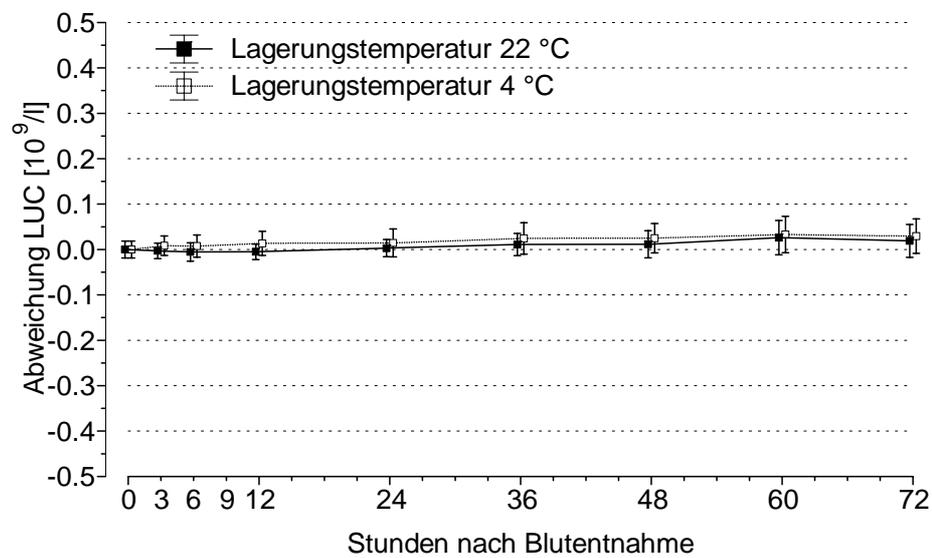


Abbildung 77: Absolute Abweichung der LUC ($10^9/l$) vom Ausgangswert beim Pferd ; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

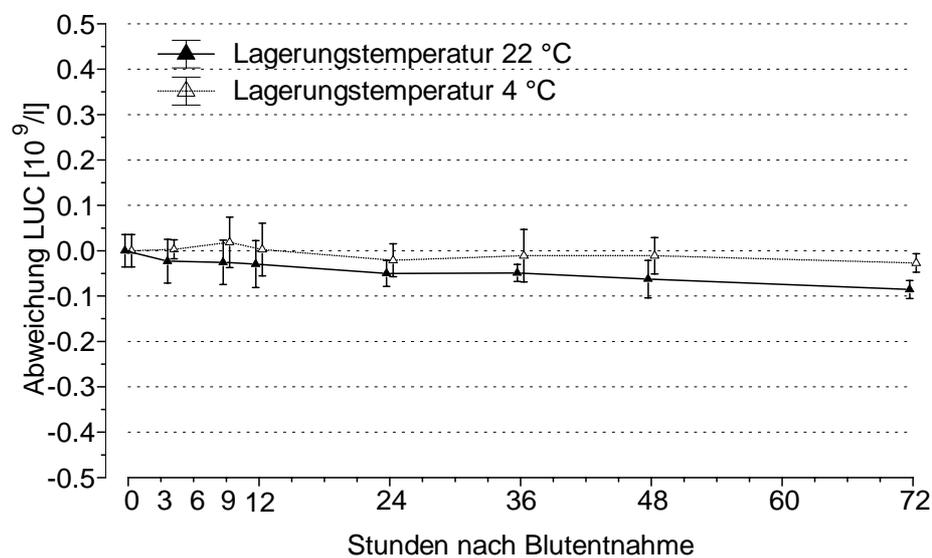


Abbildung 78: Absolute Abweichung der LUC ($10^9/l$) vom Ausgangswert beim Schwein; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

Die LUC des Pferdes steigen, wie aus Abbildung 77 ersichtlich, im Verlauf der Untersuchung geringgradig an, während für die Blutproben der Tierart Schwein (s. Abb. 78) eine Reduzierung dieser Zellpopulation zu verzeichnen ist.

Die in der folgenden Abbildung 79 dargestellte prozentuale Abweichung der Retikulozytenzählung konnte nur für die Tierart Schwein erhoben werden. Hierbei zeigen bei Zimmertemperatur gelagerte Proben etwa 3 Stunden Stabilität, steigen dann um annähernd 30% an (36h), um danach gänzlich abzufallen. Gekühlt erhält man ein entgegengesetztes Bild: Die Reduktion der Zellen beginnt bereits mit Zeitpunkt der Kühlung, fällt allerdings mit etwa 20% etwas moderater aus.

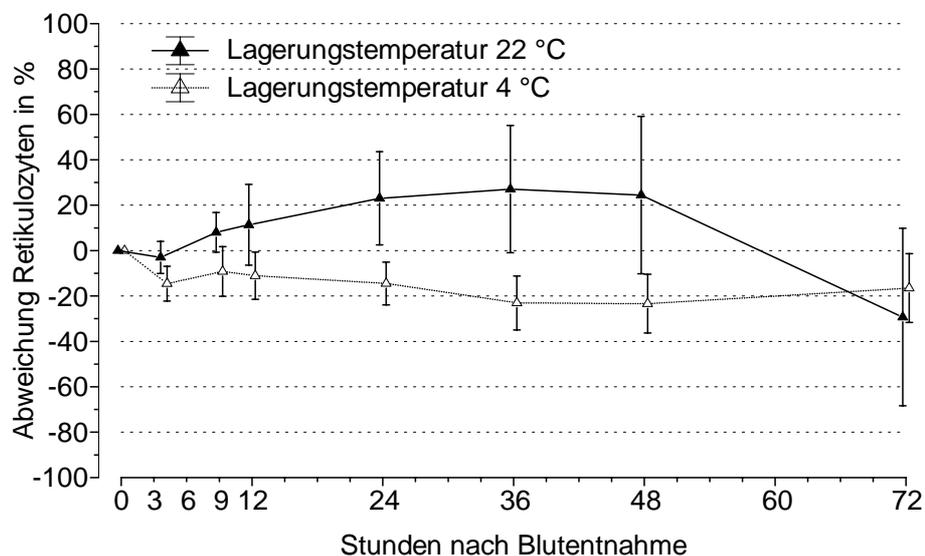


Abbildung 79: Abweichung der Retikulozytenzahl vom Ausgangswert beim Schwein in %; Verlauf bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen

4 DISKUSSION

4.1 Evaluierung des Hämatologiesystems ADVIA 120

Ziel der durchgeführten Arbeit war es, eine von der Firma Bayer erstellte tierartspezifische Software begleitend zu evaluieren und die Einsetzbarkeit des Hämatologiesystems ADVIA 120 für die Tierarten Pferd und Schwein zu überprüfen. Neben der grundsätzlichen Eignung zur Ermittlung akurater Ergebnisse für die Blutzellzählung und -differenzierung bei den Tierarten Pferd und Schwein konnte bei den Untersuchungen gleichzeitig ein besonderes Augenmerk auf den tierartlichen Vergleich gelegt werden.

4.1.1 Präzision

Die Präzision ist das Maß, wie dicht mehrere voneinander unabhängig ermittelte Einzelmesswerte einer Probe zusammen liegen, bzw. wie groß die Abweichungen voneinander sind. Der ermittelte Zufallsfehler (angegeben als Variationskoeffizient oder Streufaktor) einer Methode beschreibt die Wiederholbarkeit oder Reproduzierbarkeit der Messergebnisse und bildet somit einen wichtigen Eckpfeiler der Evaluation. In der vorliegenden Studie wurde die Messpräzision des ADVIA 120 innerhalb (s. Tab. 16) und über verschiedene Serien (s. Tab. 18) hinweg (Dreifachmessung von jeweils 100 bzw. 30 Blutproben) für jede der vier Softwareversionen einzeln überprüft. Zudem wurden ebenfalls Präzisionen der Vergleichsgeräte (Technicon H*1 und Sysmex F-800) ermittelt, um deren Leistungsfähigkeit und Vergleichbarkeit beurteilen zu können. Diese Ergebnisse und die Präzision des ADVIA 120 von Softwareversion IV werden im Folgenden mit denen der Literatur verglichen.

4.1.1.1 Parameter der Blutzellzählung

Die analysebedingte Variation für die automatische Ermittlung der Leukozytenzahl in Pferdeblut mittels Impedanzmethode reicht in der Literatur von $CV = 1,7\%$ bis $11,27\%$ (SPÄTH und WEBER, 1992; MOHR, 1995; SEEGERS, 1997). Erythrozytenwerte streuen von $CV = 0,5\%$ bis $7,67\%$. Für Thrombozyten werden Variationskoeffizienten von $CV = 0,65$ bis $10,95$ (MOHR, 1995) ermittelt.

Eigene Untersuchungen erbringen für den Sysmex F-800 eine gute bis sehr gute Reproduzierbarkeit der Messergebnisse. Der ermittelte CV liegt für die in Tabelle 23 dargestellten Parameter zwischen 0,5% (HGB Schwein) und 4,5% (PLT Pferd) SEEGERS (1997), ZIEGLER (1997) und BEDDIES (1999) erhalten mit Ausnahme der Thrombozyten annähernd vergleichbare Ergebnisse. Bei der Blutzellzählung am Technicon H*1 liegen nach SPANGFORS et al. (1990) die Variationskoeffizienten bei 1,0%, 2,0 % und 7,9% für RBC, WBC und PLT. SEEGERS (1997) ermittelt entsprechende Werte von 1,3%, 2,5% und 5,9%. Eigene Untersuchungen am Technicon H*1 mit Pferdeblut ergeben für WBC und RBC vergleichbare Werte, die Ergebnisse (s.Tab. 21) der Präzision für Thrombozyten sind mit CV = 4,7% besser als die in der Literatur angegebenen. In der nachfolgenden Tabelle 43 werden die ermittelten Variationskoeffizienten verschiedener Autoren für Thrombozyten mit den eigenen Ergebnissen verglichen.

Tabelle 43: Vergleich der Variationskoeffizienten verschiedener Autoren für **Thrombozyten** ermittelt mit Impedanz- bzw. Streulichtmethode

Autor	Spezies (n)	CV % Impedanz	CV % Streulicht
GREENE et al. (1985)	Pferd (n=20)	3,6	-
	Schwein (n=20)	4,1	-
SPANGFORS et al. (1990)	Pferd (n=102)	-	7,3
LAVIN et al. (1991)	Hund (n=5)	10,0	-
SPÄTH und WEBER (1992)	Tierblut (pool)	10,0	-
MOHR (1995)	Pferd (n=10)	0,65 - 10,95	-
ZIEGLER (1997)	Hund (n=220)	6,0	4,2
SEEGERS (1997)	Pferd(n=100)	4,4	5,9
PASTOR et al. (1998)	Pferd (n=10)	18,8 - 26,76	-
SUCHFORT (1998)	Katze (n=100)	25,7	4,6
BEDDIES (1999)	Schaf (n=100)	12,9	4,2
NEURER und HIRSCHBERGER (1999)	Pferd (n=24)	1,7-4,6	-
Eigene Untersuchungen	Pferd (n=100)	4,5	4,7 ^{H*1} 3,6 ^{ADVIA}
	Schwein(n=100)	3,1	5,8 ^{H*1} 4,6 ^{ADVIA}

CV=Variationskoeffizient;

Die ohnehin schon sehr gute Reproduzierbarkeit der Vergleichsgeräte kann vom Hämatologiesystem ADVIA 120 bei Pferdeblut sogar noch übertroffen werden. Mit Variationskoeffizienten von CV = 0,2% für den MCV bis $\leq 1,9\%$ für den WBC entspricht das Messgerät höchsten Anforderungen. Die Zielvorstellung laut DÖRNER (1993) liegt bei CV < 3%.

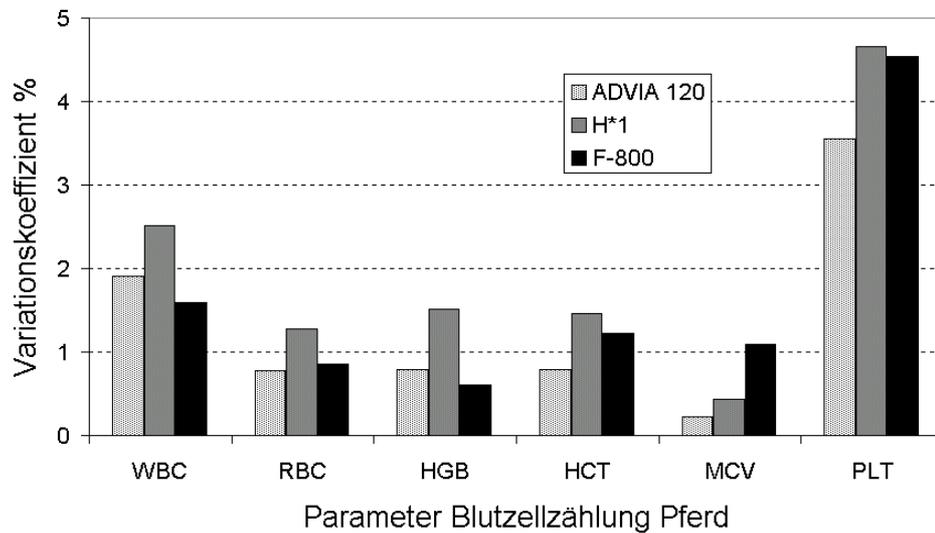


Abbildung 80: Vergleich der Präzision von ADVIA 120 (Softwareversion IV), Technicon H*1 und Sysmex F-800 für die Blutzellzählung beim Pferd; CV = Variationskoeffizient in %

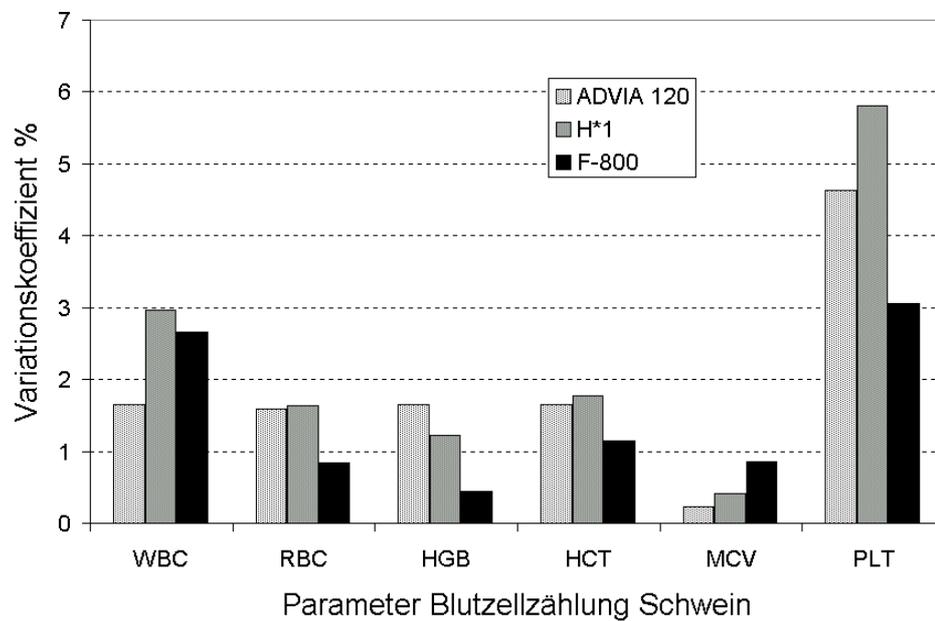


Abbildung 81: Vergleich der Präzision von ADVIA 120 (Softwareversion IV), Technicon H*1 und Sysmex F-800 für die Blutzellzählung beim Schwein; CV = Variationskoeffizient in %

Schweineblut (s. Abb. 81) wird am ADVIA 120 ebenfalls mit sehr hoher Präzision gemessen. Der CV liegt für die dargestellten Parameter, mit Ausnahme der Thrombozytenparameter, bei $\leq 1,7\%$. Interessanterweise zeigt der Sysmex F-800 für Schweineblut eine auffallend gute Präzision der Parameter RBC, HGB, HCT und Thrombozyten (PLT).

Im Vergleich zu Literaturangaben aus der Veterinärmedizin erreicht der ADVIA 120 für Pferde- und Schweineblut ebenfalls eine äußerst hohe Reproduzierbarkeit bei der Thrombozytenzählung sowie den Thrombozytenparametern (s.Tab. 16 u. 18). Nach anfänglich sehr hohen Streubreiten für beide Tierarten (s. Abb. 24 u. 25) in Softwareversion I von knapp 10% (PLT) konnten im Verlauf der Softwareadaptation Werte von 3,6% (Pferd) und 4,6% (Schwein) erreicht werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass im Verlauf der Softwareadaptation des Hämatologiesystems ADVIA 120 durchweg für alle untersuchten Parameter der Blutzellzählung eine sehr gute bis exzellente Präzision erreicht wurde.

4.1.1.2 Parameter der Blutzelldifferenzierung

Variationskoeffizienten bezüglich der Blutzelldifferenzierung dürfen nur mit einer gewissen Vorsicht und unter Einbeziehung der verwandten Methode betrachtet werden. Aus der einschlägigen Literatur erhält man nur wenige Vergleichswerte aus automatischen Differenzierungen mit Tierblut. Ergebnisse aus manuellen Untersuchungen sind, bedingt durch eine vergleichsweise niedrige Anzahl der ausgewerteten Zellen, fehleranfälliger. Laut RÜMKE (1960) verringert sich durch die Erhöhung der ausgewerteten Zellzahl die Variabilität erheblich. Dadurch sind erwartungsgemäß die statistischen Abweichungen zwischen den Wiederholungsmessungen kleiner (Rümke et al. 1975). Aus diesem Grund werden für die Beurteilung der Wiederholbarkeit nur vergleichbare Geräte mit automatischer Differenzierung herangezogen. Die ermittelten Variationskoeffizienten der automatischen Differenzierung von Pferde- und Schafblut am Technicon H*1 aus der Literatur von SPANGFORS et al. (1990) SEEGERS (1997) und BEDDIES (1999) weisen, wie auch die eigenen Untersuchungen an Pferd und Schwein, überwiegend niedrigere Variationskoeffizienten für die relativen Werte (gegenüber den Absoluten)

der Leukozytendifferenzierung auf. In Tabelle 44 sind die eigenen Ergebnisse denen der genannten Autoren gegenübergestellt.

Tabelle 44: Vergleich der Variationskoeffizienten (CV) eigener Untersuchungen am ADVIA 120 mit denen anderen Autoren. Absolute und relative Zahlen der Differenzierung

Parameter	Eigene Untersuchung ADVIA 120		SPANGFORS et al. (1990)	SEEGERS (1997)	BEDDIES (1999)
	Pferd	Schwein	H*1 Pferd	H*1 Pferd	H*1 Schaf
	CV der absoluten (relativen) Werte in %				
Neutrophile G.* 10 ⁹ /l	2,21 (1,3)	3,0 (2,5)	3,1	3,5 (2,4)	12,7(4,3)
Lymphozyten* 10 ⁹ /l	3,3 (1,8)	3,2 (2,3)	3,7	6,6 (5,3)	4,9 (3,5)
Monozyten* 10 ⁹ /l	11,3 (10,7)	15,6 (15,5)	16,6	26,0 (23,3)	32,2 (9,8)
Eosinophile G.* 10 ⁹ /l	16,0 (16,8)	10,0 (10,4)	10,0	7,7 (6,9)	11,8 (30,4)
Basophile G.* 10 ⁹ /l	31,8 (29,6)	11,1 (11,4)	15,0	43,3 (39,1)	14,6 (13,0)
LUC* 10 ⁹ /l	21,7 (23,7)	68,2 (68,3)	-	56,5 (54,2)	-

* Parameter ist log-normalverteilt

Neutrophile Granulozyten und Lymphozyten können mit dem ADVIA 120 mit einer erfreulich geringen Variabilität bestimmt werden. Für beide untersuchten Tierarten liegen die Variationskoeffizienten z. Teil deutlich unter denen der anderen Autoren. Eine gewisse Überlegenheit des ADVIA 120 gegenüber den angegebenen automatischen Bestimmungen am H*1 zeigt sich auch für die Monozytenpopulation bei Pferd und Schwein. Gegenüber den Humanvergleichswerten der manuellen Differenzierung von BUTARELLO (1992) mit 800 ausgezählten Zellen (CV = 25,9%) erreicht der ADVIA 120 mit CV = 11,3 und 15,6% eine erstaunlich geringe Varianz. Desweiteren misst der ADVIA 120 eosinophile und basophile Granulozyten in Schweineblut mit vergleichsweise guter Präzision, während für Pferdeblut hier eine deutlich größere Streuung in Kauf genommen werden muss. Die Population der LUC erreicht in Pferdeblut trotz des vereinzelt Aufkommens eine auffallend geringere Variabilität, vor allem im Vergleich zu den Werten von SEEGERS (1997) und den am H*1 ermittelten eigenen Variationskoeffizienten (s. Abb. 82).

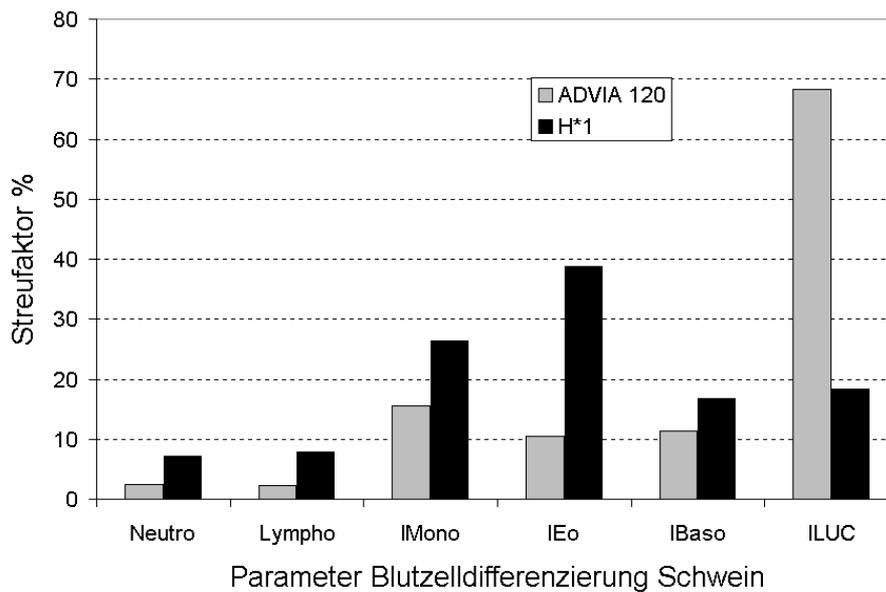
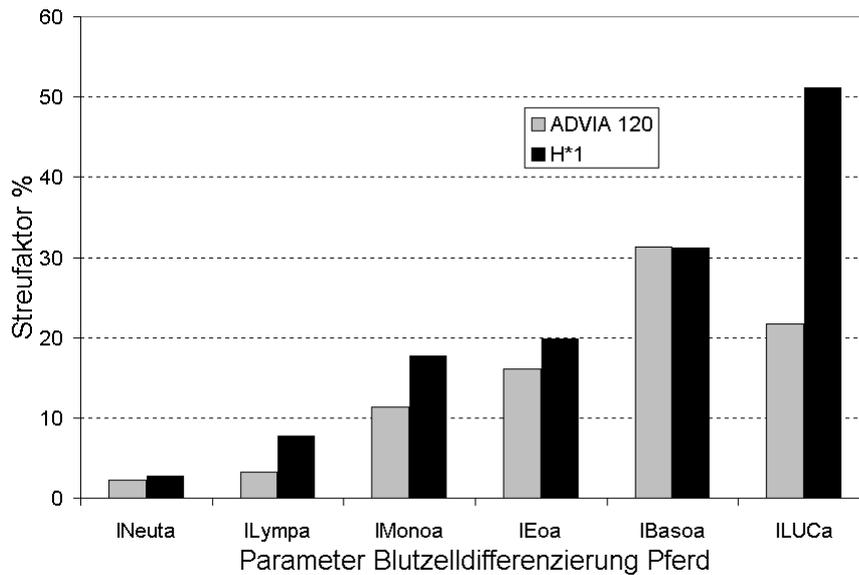


Abbildung 82 u. 83: Vergleich der Präzision von ADVIA 120 (Softwareversion IV), Technicon H*1 Blutzellendifferenzierung beim Pferd und Schwein; I = logarithmierter Wert

Dagegen zeigt Schweineblut (s. Abb. 83) einen CV von 68,2 % und somit eine ungenügende Messgenauigkeit für die LUC. Eigene manuelle Differenzierungen

unterstützen Aussagen von RADIN et al. (1986), dass vermutlich die größere Variabilität von Schweinegranulozyten zu Koinzidenzen mit mononuklären Zellen führt.

Zusammenfassend kann dem ADVIA 120 (nach Softwareadaptation Abb. 82 u. 83) im Vergleich zu Auswertungen aus der Literatur für die automatisierte Blutzelldifferenzierung bei Pferd und Schwein eine gute Präzision bescheinigt werden.

4.1.1.3 Retikulozytenzählung

Vergleicht man die eigenen Ergebnisse der Retikulozytenzählung des Pferdes mit Werten aus der Literatur, fällt zunächst auf, dass im Mittel gemessenen Werte ($6,58 \cdot 10^9/l$) über dem Referenzbereich anderer Autoren liegen. Pferdeblut dürfte demnach keine Retikulozyten aufweisen (JAIN, 1993). Mit dem ADVIA 120-Retikulozytenkanal wird durch die hochsensible Messtechnik jedoch eine geringe Anzahl von Partikeln als Retikulozyten (s. Abb. 23) gezählt. Aufgrund der fehlenden Referenzmethode ist nicht vollständig zu klären, ob es sich tatsächlich um Retikulozyten handelt. Entsprechend dem geringen Zellaufkommen weist der ADVIA 120 bezüglich Pferderetikulozyten auch eine sehr geringe Messpräzision auf (CV = 45,8 - 75,5%).

In Schweineblut wurden sowohl mit der automatisierten Zählung als auch mit der manuellen Methode Retikulozyten nachgewiesen. Auffallend ist die deutlich erhöhte Anzahl von gezählten Retikulozyten gegenüber der Literatur. JAIN (1993) postuliert eine Retikulozytenaufkommen von 0-1%, während eigene Untersuchungen eine Spannweite von 0,5 - 3% ergaben. Die Messpräzision des ADVIA 120 liegt mit CV = 7,8% innerhalb und CV = 9,4% über verschiedene Serien hinweg in einem sehr guten Bereich. Untersuchungen zur Retikulozytenzählung am ADVIA 120 aus der Humanmedizin erreichten einen Wert von CV = 7,7% (BRUGNARA et al., 1997).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die automatisierte Retikulozytenzählung durchschnittlich höhere Retikulozytenzahlen ermittelte als die manuelle lichtmikroskopische Methode. Diese erhöhte Sensibilität der Retikulozytenanalyse konnte auch für andere Tierarten (z.B. Hund) bestätigt werden (FICKENSCHER 2001). Für die Tierart Pferd sollte dies mittels Untersuchungen an Anämiepatienten noch Bestätigung finden.

4.1.2 Methodenvergleich

Ziel des Methodenvergleichs ist es, die Richtigkeit der Messergebnisse festzustellen und systemabhängige oder analytische Fehler zu erkennen. Die Richtigkeit beschreibt, wie dicht man mit einer Reihe von Ergebnissen an den "wahren" Wert heranreicht. Das Alpha-site Protokoll zur Evaluation des ADVIA 120 fand enge Anlehnung an empfohlene Referenz- oder Vergleichsmethoden des Internationalen Komitees für Standardisierung in der Hämatologie (ICSH, 1994).

4.1.2.1 Parameter der Blutzellzählung

Aufgrund der gleichen Analysetechnik von ADVIA 120 und Technicon H*1 werden im Methodenvergleich erwartungsgemäß hohe Korrelationen erreicht. Für die in Tabelle 24 aufgeführten Parameter WBC, RBC HGB, HCT, MCV werden bereits in der ersten Softwareversion Korrelationskoeffizienten von $r \geq 0,92$ erreicht. Nach Softwareanpassung konnten diese Werte sogar noch verbessert werden. Herausragend sind vor allem die Korrelationen für WBC, RBC und MCV des Pferdes und RBC des Schweines mit Werten von $r \geq 0,99$. Für die Parameter MCH, RDW und HDW kann ebenfalls eine sehr gute Übereinstimmung ($r \geq 0,89 - 0,94$) ermittelt werden. Eine Ausnahme bilden die auffallend schlecht korrelierenden Werte des MCHC v.a. beim Pferd (BIENZLE et al., 1994).

Verglichen mit Ergebnissen aus human- und veterinärmedizinischer Literatur, werden für die oben genannten Parameter in eigenen Untersuchungen mit dem ADVIA 120 fast ausschließlich adäquate bzw. höhere Korrelationen erreicht (WEISER, 1987; TVEDTEN und WILKINS, 1988; BIENZLE et al., 1994). Bemerkenswert ist ebenfalls eine hohen Übereinstimmung der Thrombozytenzählung mit $r \geq 0,96$ für beide Tierarten.

Demgegenüber steht eine deutliche Abweichung im Mittelwertvergleich bei PLT und MPV (s. Tab. 28) zwischen den beiden Hämatologiegeräten. Mit dem ADVIA 120 werden erheblich höhere (Schwein 23%) Werte ermittelt. Interferierende große Thrombozyten werden beim H*1 nicht als solche erfasst, während der ADVIA 120 durch die erweiterte und genauere Messtechnik im Thrombozytenkanal (Zweidimensionale Thrombozytenanalyse) die Blutplättchen (PLT) bis zu einer Größe

von 60 fl analysieren und von Mikrozyten, Erythrozyten und Zelldebris abgrenzen kann.

Für den Vergleich ADVIA 120/Sysmex F-800 kann für die Parameter RBC, HGB, MCV und MCH im Vergleich zur Literatur (RADIN et al., 1986; WEISER, 1987; TVEDTEN und WILKINS, 1988; SPÄTH und WEBER, 1992; MORITZ et al., 1995; MOHR, 1995; PASTOR et al., 1998) ebenfalls eine gute Übereinstimmung ($\geq 0,92$) festgehalten werden. Für Leukozyten sieht man eine etwas breitere Streuung (s. Abb. 30) um die Hauptkomponentengerade und einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,89$. Besonders augenfällig ist die schlechte Vergleichbarkeit des Hämatokritwertes des Sysmex F-800 beim Pferd. Sie lässt die messtechnische Überlegenheit des ADVIA 120 bei der Bestimmung des MCV gegenüber dem Impedanzsystem erkennen. Die Werte liegen im Mittel 11 bis 13% höher als beim ADVIA 120. Folglich ist der mit dem Sysmex F-800 errechneter Hämatokritwert durchweg zu hoch. Im Gegensatz dazu beweist die hohe Korrelation $r = 0,96$ (s. Abb. 35 u. Tab. 26) und geringe Mittelwertabweichungen nach Softwareadaptation (s. Abb. 43) mit dem "Golden Standard" Hämatokritzentrifuge, die Richtigkeit der ADVIA 120 -Messung. Ein guter Korrelationskoeffizient von $r = 0,94$ (Sysmex F-800) und gleichzeitig $r = 0,92$ (Hämofuge) für das Schwein, bestätigen die Vermutung von SEEGERS (1997), dass es sich bei der Ermittlung des HCT am Sysmex F-800 um eine pferdespezifisches Problem handelt.

Bei der Thrombozytenzählung werden die Schwierigkeiten des Impedanzmessprinzip gegenüber dem ADVIA 120 besonders durch Betrachtung der Korrelationsdiagramme (Abb.40 und 41) und der Mittelwertunterschiede deutlich. Probleme bei der Unterscheidung von Erythrozyten und Thrombozyten sowie Koinzidenzen mit Thrombozytenaggregationen und Zellresten führen laut TVEDTEN (1993), GREENE (1995) und SEEGERS (1997) zu unrichtigen Messergebnissen mittels Impedanzmethode.

Somit muss festgehalten werden, dass lediglich der H*1 als automatisiertes Vergleichsgerät für Pferdethrombozyten geeignet erscheint. Für die Thrombozytenzählung in Schweineblut existieren zur Zeit aufgrund der fehlenden Softwareeinstellung keine tierartspezifischen automatischen Vergleichsmethoden.

Die Vorteile des ADVIA 120 liegen nach eigenen Untersuchungen in der neuen zweidimensionalen erweiterten Thrombozytenmessmethode. Diese ermöglicht eine

exakte Abtrennung der Thrombozyten (Abb. 84) von Erythrozytenfragmenten, Zelltrümmern (Zelldebris), RBC-Ghosts, großen Thrombozyten, Mikrozyten und Fragmentozyten. Aufgrund der neuen Technik ist es ebenfalls möglich PLT-Clumps quantitativ zu bestimmen und so auch anhand der graphischen Darstellung eine Beurteilung der Datenerhebung vorzunehmen.

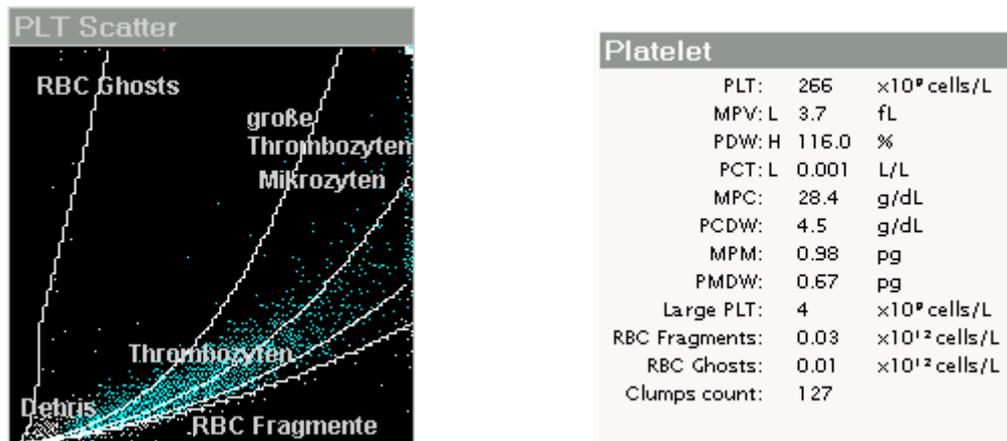


Abbildung 84: Thrombozyten-Scattergramm Schwein Nr. 224 (PLT $266 \times 10^9/l$);
x-Achse Brechungsindex, y-Achse Zellvolumen

Zusammenfassend ergibt sich eine sehr gute bis exzellente Übereinstimmung der Ergebnisse in den Bereichen wo die Referenz- und Vergleichsmethoden selbst mit nachweislich hoher Messgenauigkeit arbeiten. Für kritische Parameter, wie zum Beispiel PLT, kann eine Überlegenheit des ADIVA 120 aufgrund der neuen zweidimensionalen Messtechnik angenommen, für Thrombozyten des Schweines aber nicht bewiesen werden.

4.1.2.2 Parameter der Blutzellendifferenzierung

Vergleiche zur Leukozytendifferenzierung zwischen automatischer (A-Diff) und manueller (M-Diff) Differenzierung werden in der veterinärmedizinischen Literatur mehrfach beschrieben (TVEDTEN und WILKINS, 1988; TVEDTEN und HAINES, 1994; TVEDTEN und KORCAL, 1996; SEEGERS, 1997; EGELI, 1998; BEDDIES, 1999; MATSUNO et al., 1999) Besonders essentiell erscheint eine tierartsspezifische Anpassung der geräteeigenen Software für die Blutzellendifferenzierung. Unterschiedliche Zellmorphologie und Enzymaktivität (z.B. Myeloperoxidase) führt zur Notwendigkeit einer individuellen Anpassung der Clustersetzung im

Peroxidasekanal. In der folgenden Abbildung 85 wird gezeigt, wie fehlerhaft eine Messung ohne Softwareadaptation ausfallen kann. Als Beispiel ist hier der Peroxidasekanal mit der graphischen Darstellung des Leukogramms der Tierart Schwein gewählt. Eine fehlerhafte und eine akurate Messung (nach Softwareadaptation) sind hier gegenübergestellt. Auf der linken Seite erfolgt keine klare Abtrennung der Neutrophilenwolke, was zu einem völlig falschem Differenzierungsergebnis führt.

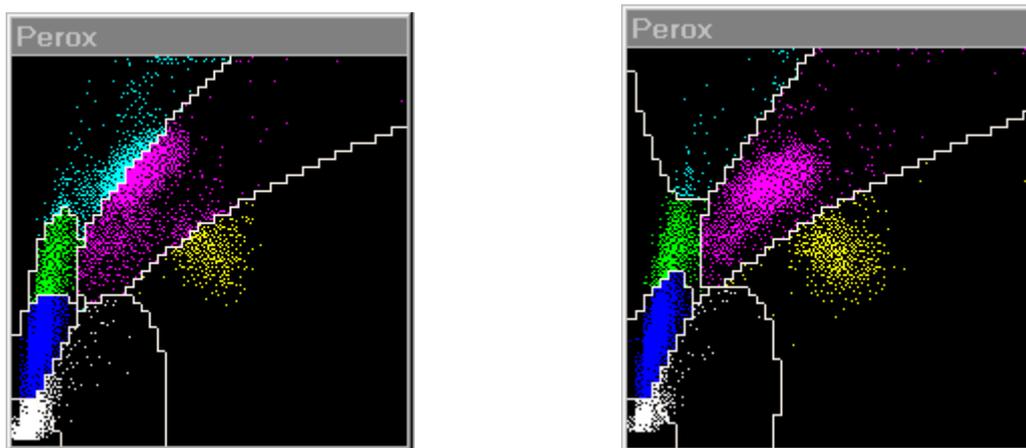


Abbildung 85: Leukogramme; Peroxidasekanal des ADVIA 120; Tier-Nr. 87 (WBC 23,74 x10⁹/l), Tier-Nr. 204 (WBC 18,27 x10⁹/l)

In der vorliegenden Studie können, wie aus Tabelle 32 ersichtlich ist, für neutrophile Granulozyten und Lymphozyten hohe Korrelationen von $r = 0,95$ bis $0,97$ im Vergleich ADVIA 120/manuellen Differenzierung für Pferd und Schwein ermittelt werden. Damit sind die Korrelationen vergleichbar mit den Differenzierungsergebnissen von SEEGER (1997) 400er M-Diff und deutlich höher als die von TVEDTEN UND KORCAL (1996). Die automatischen optoelektrischen Methoden stimmen mit $r = 0,97 - 0,99$ erwartungsgemäß hervorragend überein.

Die Monozytenzählung des ADVIA 120 korreliert mit dem H*1 zwar für das Pferd hervorragend, weist jedoch gegenüber der manuellen Differenzierung wieder die gleiche Inkongruenz auf, wie sie bereits aus der Literatur bekannt ist (GOOSSENS et al., 1991; SEEGER, 1997). Hier kann mit $r = 0,2$ bis $0,39$ (ANAE Pferd) kein bzw. nur ein sehr geringer Zusammenhang der Messergebnisse ermittelt werden. Die schlechte Korrelation von Schweinemonozyten im Vergleich ADVIA 120/H*1 kann auf die fehlende Softwareeinstellung am H*1 zurückgeführt werden. Ob die automatischen Messungen am ADVIA 120 richtig sind, muss in Zukunft noch z.B.

anhand von weitergehenden Untersuchungen (fluoreszenzmakierte monoklonale Antikörper (HÜBL, 1995) überprüft werden.

Die Korrelation für eosinophile Granulozyten des Pferdes mit $r = 0,59 - 0,67$ ist vergleichsweise schlecht gegenüber den Ergebnissen von SEEGERS (1997), liegt aber über den ermittelten Werten von TVEDTEN und KORCAL (1996). Eosinophile Granulozyten des Schweines werden vom ADVIA 120 gut erkannt und weisen mit $r = 0,86$ bis $0,93$ gegenüber der Literatur auf eine erfreulich gute Übereinstimmung hin (EGELI, 1998). Erklärlich durch die deutliche Abgrenzung der Eosinophilenwolke anhand der Peroxidasefärbung und der Größe der Zellen bei der automatischen Differenzierung, korrelieren beide automatischen Zellanalysen hervorragend.

Für basophile Granulozyten kann, mit Ausnahme des Vergleichs der automatischen Differenzierung beim Schwein, keine Übereinstimmung ermittelt werden. Die Schwierigkeiten einer drastischen Pseudobasophilie bei Pferdeblutproben, wie sie in Kap. 3.2.1.1.1.2 und bei SEEGERS (1997) beschrieben wurde, konnten durch eine besondere Clustersetzung (s. Abb. 86) im Basokanal ausgeschaltet werden.

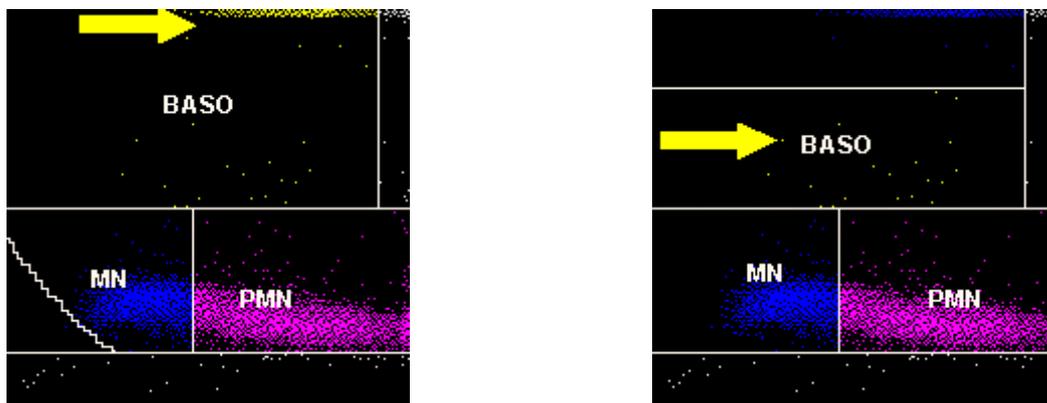


Abbildung 86: Vergleich der Clustersetzung für Basophile Granulozyten Pferd-Nr. 178 **Software I** ("Pseudoasophilie") versus **Software IV** (Baso 0,03 x 10⁹/l)

Die Population der Large Unstained Cells (LUC) ist manuell nicht klar abzugrenzen. Die Vermutung von SEEGERS (1997), dass es sich hierbei um große peroxidasenegative Lymphozyten, Monozyten und wie z.B. bei der lymphatischen Leukämie (s. Abb. 95) um Blasten handelt, kann durch die eigenen manuellen Differenzierungen bestätigt werden.

Im tierartigen Vergleich ist festzustellen, dass Schweineblut gegenüber der manuellen Differenzierung insgesamt besser korreliert, als die untersuchten Pferdeblutproben, was u.a. auch auf die höhere Gesamtleukozytenzahl bei Schweinen im Blut zurückzuführen ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der ADVIA 120 neutrophile und eosinophile Granulozyten und Lymphozyten von Pferde- und Schweineblut richtig differenziert. Die Monozytenbestimmung weist für beide Tierarten weiterhin aufgrund fehlender Referenzmethoden Ungenauigkeiten auf.

4.1.2.3 Retikulozytenzählung

Die in der Vergangenheit zeitaufwendige und ungenaue manuelle Retikulozytendiagnostik wird in jüngster Zeit von den neueren automatischen computergestützten Hämatologiesystemen abgelöst. Untersuchungen aus der Humanmedizin betonen den wichtigen Aspekt einer zuverlässigen Aussage über die Erythropoese für die Anämiediagnostik. Bislang spielte die Retikulozytendiagnostik bei Pferden und Schweinen nur eine untergeordnete Rolle. Wie bereits erwähnt, weisen Referenzangaben aus der einschlägigen Literatur für Pferd und Schwein keine Retikulozyten aus (KRAFT und DÜRR, 1995). Obwohl die klinische Relevanz der Retikulozytenanalytik für die Tierart Schwein eher gering ist, sollte aus eigenen Untersuchung darauf hingewiesen werden, dass für das Schwein am ADVIA 120 im Mittel höhere Referenzbereiche ermittelt werden als bisher aus der Literatur bekannt. Aufgrund der hohen Leistungsfähigkeit, speziell der hohen Durchflussrate an erythroiden Zellen, können für Pferde neben den bekannten Anämieparametern (MCV und RDW) am ADVIA 120 Retikulozyten und ihre entsprechenden Indizes definiert werden.

Ergebnisse der Retikulozytenanalyse Pferd Nr. 139 (autoimmunhämolytische Anämie) und Schwein Nr. 231 werden in den folgenden Abbildungen dargestellt.

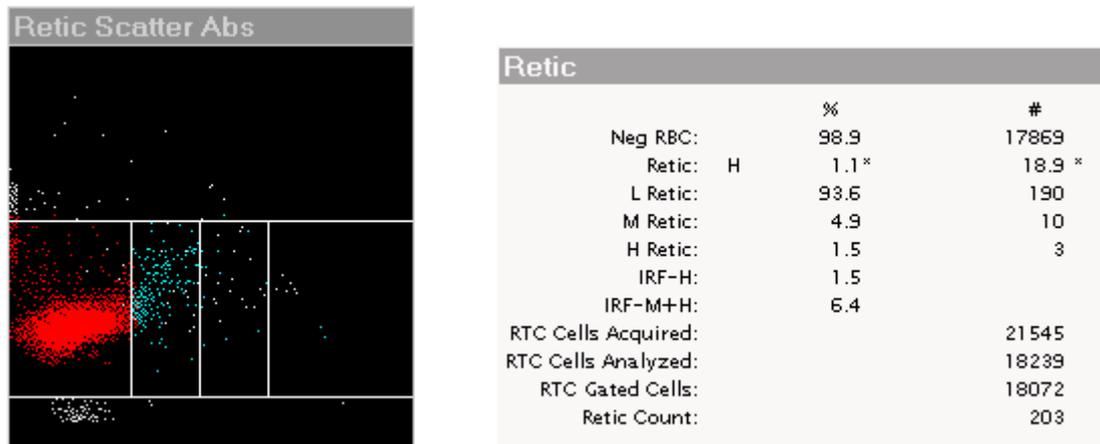


Abbildung 87: Retikulozytogramm (Retiscattergramm) Pferd-Nr. 139 mit autoimmunhämolytischer Anämie

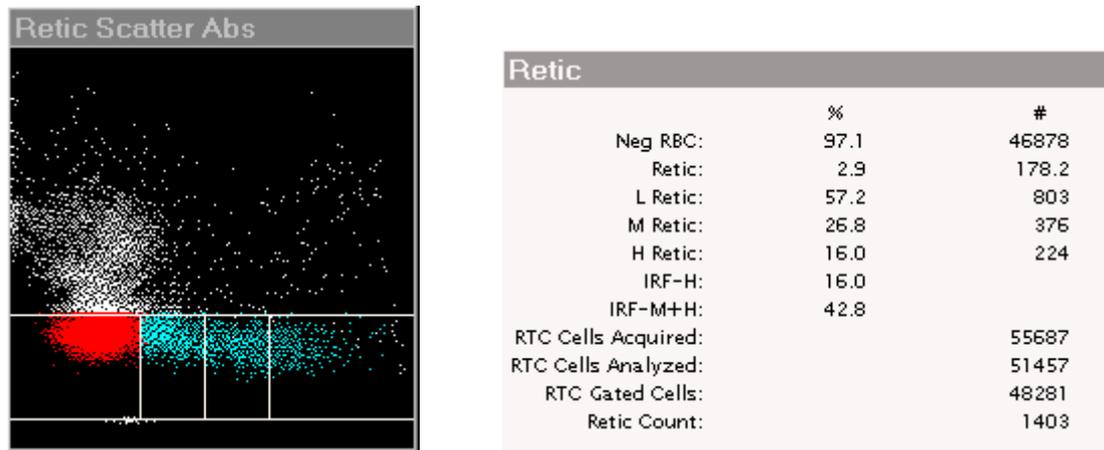


Abbildung 88: Retikulozytogramm (Retiscattergramm) Schwein-Nr. 231

Die ermittelte mäßige Korrelationen für Schweineretikulozyten ($r = 0,49$), erscheint in Anbetracht des geringen Zellaufkommens und der ungenügenden Präzision manueller Retikulozytenbestimmungen realistisch. Für Pferdeblut kann lediglich ein sporadisches vorhandensein von Retikulozyten nachgewiesen werden.

4.1.3 Linearität und Verschleppung

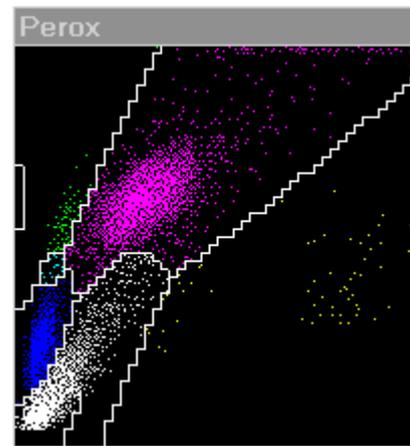
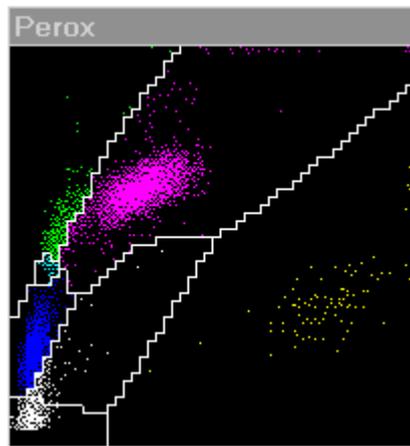
Eine Linearitätsprüfung des ADVIA 120 wurde in der vorliegenden Studie an den in Tab. 35 aufgeführten Parametern durchgeführt. Die Korrelationsanalyse bedarf in Anbetracht des hervorragenden Ergebnisses $r = 0,98$ bis $1,00$ keiner weiteren

Diskussion. Der ADVIA 120 misst in den untersuchten Bereichen von 0 bis $100 \times 10^9/l$ (WBC) bzw. 0 bis $12 \times 10^{12}/l$ (RBC) absolut linear.

Eine Verschleppung (carry over) im Bereich der ermittelten Parameter (s.Tab. 36) sollte laut (MORITZ 2000) möglichst unterhalb von 0,25% liegen. KLINGLER 1997 erreicht Werte unterhalb 0,4%. Die ermittelten Werte aus eigenen Untersuchungen liegen für die reportierten Parameter $\leq 0,16\%$. Aufgrund einer Hämolyse der Schweineblutprobe bei der Probenaufbereitung fällt das carry over für Hämoglobin zu hoch aus. Da hier im Vergleich zu Pferdeblut und zu anderen Untersuchern keine Verschleppung zu verzeichnen sein sollte, muss dieser Wert als Ausreißer gewertet werden. Ansonsten liegen die Ergebnisse dieses Tests im Bereich anderer humanmedizinischer Untersuchungen (KERSHAW et al., 1987; BENTLEY, 1993).

4.1.4 Antikoagulanzenvergleich

Der Einfluss des verwendeten Antikoagulanz ist in den Tabellen 37 bis 40 dargestellt. Auffallend sind hier, wie bei SEEGERS (1997) und BEDDIES (1999) bereits beschrieben, die signifikanten prozentualen Mittelwertabweichungen $rd = 27\%$ für die Thrombozytenzählung des Pferdes von K_3EDTA -Blut gegenüber Li-Heparin. Die erhöhte Agglutinationsneigung der in Li-Heparin antikoagulierten Proben findet sich ebenfalls in Schweineblut. Hier konnte eine Erhöhung des MPV um 13,4 % gegenüber K_3EDTA -Blut festgestellt werden. Die Agglutination in Schweineblut, gemessen an den PLT-Clumps, war um 41% erhöht. Eine Veränderung der Gesamtleukozytenzahl in Li-Heparinblut wie von BEDDIES (1999) beim Schaf am Technicon H*1 beschrieben, kann für den ADVIA 120 bedingt durch die neue Thrombozytenanalytik und den Report des LeukoB nicht mehr festgestellt werden. Insgesamt sieht man eine auffallend breitere Streuung der Leukozyten im Leukogramm in Abb. 89 bei li-heparinantikoaguliertem Blut. Über den Grund einer signifikanten Erhöhung der Basophilenpopulation (s. Abb. 92) kann nur spekuliert werden. Eine Interferenz einiger Plättchenagglutinate im Basophilenkanal wäre denkbar (s. auch Kap.4.1.5.2 Abb.92).



Platelet		
PLT:	176	$\times 10^9$ cells/L
MPV:	7.9	fL
PDW:	51.9	%
PCT:	0.001	L/L
MPC:	28.0	g/dL
PCDW:	7.8	g/dL
MPM:	2.02	pg
PMDW:	0.76	pg
Large PLT:	2	$\times 10^9$ cells/L
RBC Fragments:	0.05	$\times 10^{12}$ cells/L
RBC Ghosts:	0.03	$\times 10^{12}$ cells/L
Clumps count:	148	

Platelet		
PLT:	167	$\times 10^9$ cells/L
MPV:	6.9	fL
PDW:	23.4	%
PCT:	0.001	L/L
MPC:	27.3	g/dL
PCDW:	8.2	g/dL
MPM:	2.02	pg
PMDW:	0.86	pg
Large PLT:	1	$\times 10^9$ cells/L
RBC Fragments:	0.03	$\times 10^{12}$ cells/L
RBC Ghosts:	0.03	$\times 10^{12}$ cells/L
Clumps count:	473	

Abbildung 89: Leukogramm mit Platelet Datenreport Pferd-Nr. 209; K₃EDTA und Li-Heparin

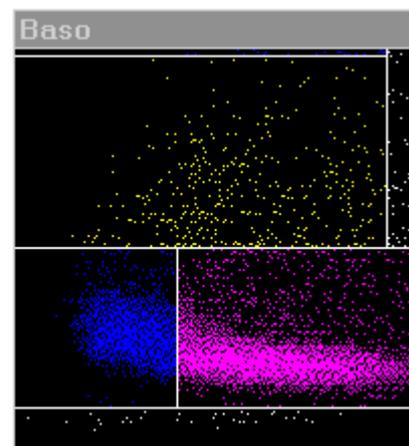
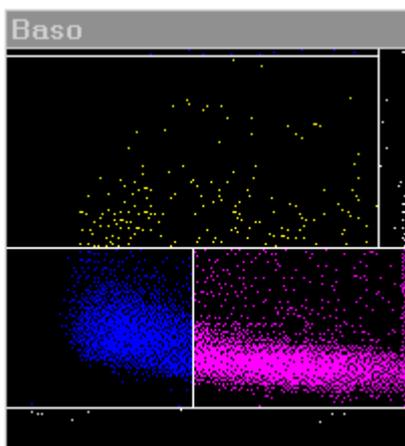


Abbildung 90: Nucleogramm (Basoscattergram) Schwein-Nr. 225 in K₃EDTA und Li-Heparin

Da die Veränderung bezüglich der Thrombozytenparameter in Li-Heparinblut im unteren Referenzbereich klinische Relevanz einnimmt und Na-Citratblut immer die Gefahr des methodischen Verdünnungsfehlers birgt, sollte für Pferde- und Schweineblut ausschließlich K₃EDTA antikoaguliertes Blut zu Untersuchungen verwandt werden.

4.1.5 Blutalterung

4.1.5.1 Parameter der Blutzellzählung

In Verlaufsuntersuchungen über 72 Stunden sollte die Stabilität von Pferde- und Schweineblut und Messverhalten des ADVIA 120 während der Probenalterung in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur analysiert werden. Die immer steigendere Bedeutung von Bestandsuntersuchungen speziell in der Schweinepraxis, nicht zuletzt auch zum Schutze des Verbrauchers, benötigt zuverlässige und vergleichbare Laborergebnisse. Die eigenen Untersuchungen sollen den Einfluss von Zeitraum und Art der Lagerung auf die einzelnen Blutbildparameter beim Versand an kommerzielle Großlabors ermitteln. Dabei zeigen sich zwischen den beiden untersuchten Tierarten zum Teil deutliche speziesspezifische Unterschiede.

Die Parameter der Blutzellzählung erweisen sich bei Pferdeblut als relativ temperaturunabhängig, während Schweineblut signifikante Abweichung aufgrund der Lagerungstemperatur zeigt.

Die Gesamtleukozytenzahl nimmt bei ungekühlten Schweineblutproben bis 24 Stunden nach Blutentnahme um knapp 8% ab, die gekühlten Proben verhalten sich hingegen äußerst stabil (< 1%). Im Gegensatz zu SEEGERS (1997) sieht man für den WBC des Pferdes keinen Anstieg, sondern ebenfalls eine moderate Verringerung der Leukozyten um max. 5% bei 22°C gelagerten Proben.

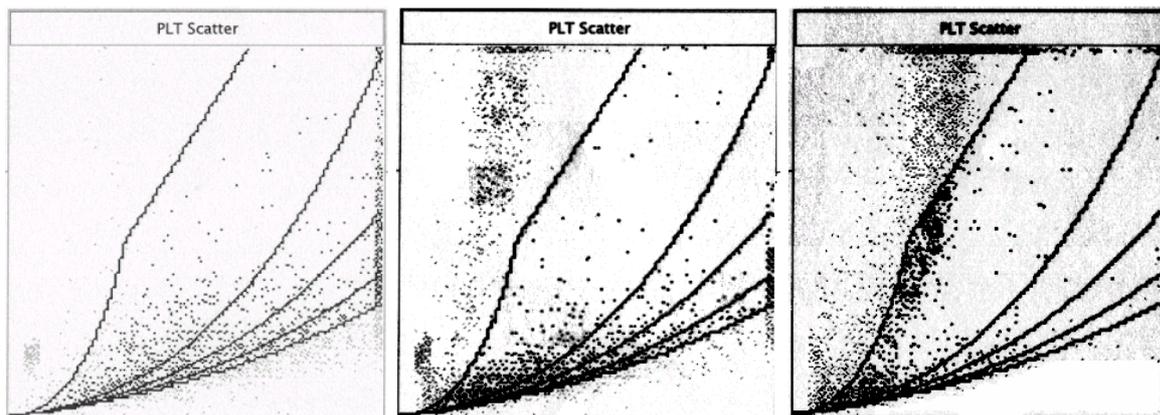
Die Anzahl der Erythrozyten bleibt beim Pferd über 36 Stunden (ungekühlt bis 72h) stabil, um dann gekühlt auf ein Niveau von -5% abzusinken. Parallel dazu steigt bei gekühlten Proben deutlich die Hämoglobinverteilungsbreite. Schweineerythrozyten verhalten sich sehr stabil, während der MCV in Schweineblut ungekühlt sofort deutlich (bis 13%) ansteigt. Die MCV-Werte des ADVIA 120 für Pferdeblut variieren im Gegensatz zu Untersuchungen von SEEGERS (1997) am H*1 kaum. Unterstützt

wird dieses Ergebniss von WEISER (1982), der den MCV des Pferdes für 24 Stunden bei 4°C als stabil bewertet.

In den ersten 24h zeigen sich die Thrombozyten des Pferdes relativ lagerungsunabhängig. Danach erweist sich die gekühlte Probe als stabiler, während die Thrombozytenzahl der ungekühlten Probe deutlich abfällt. Auffällig sind hohe (bis über 50%) Standardabweichungen vom Mittelwert.

Eine ebenfalls recht hohe Standardabweichung zeigt die Thrombozytenzählung beim Schwein, wobei die Mittelwerte der ungekühlten Proben vergleichsweise hohe Stabilität zeigen.

Anhand eines Fallbeispiels wird deutlich wie groß Standardabweichung seien können.



Parameter Balou	0-Messung	72h-Messung 22°C	72h-Messung 4°C
Plt 10 ⁹ /l	109	111	281
RBC-Fragmente 10 ¹² /l	0,03	0,15	0,4
Clumps count	83	1537	586

Abbildung 91: Thrombozytogramm (PLT-Scattergramm) Pferd-Nr. 215 Messzeitpunkt 0 und 72h bei 22°C und 72h bei 4°C

Abbildung 91 zeigt die Thrombozytogramme des Pferdes 215 während der Verlaufsuntersuchung. Die Thrombozytenzahl steigt erheblich um rund 150%.

Außerdem zeigen die Proben bei Raumtemperatur einen massiven Anstieg der PLT-Clumps. Dieser fällt bei gekühlter Probe deutlich geringer aus. Im Scattergramm ist ebenfalls eine starke Streuung um die Thrombozytenpopulation zu erkennen. Es ist anzunehmen, dass Zellbruchstücke der Erythrozyten (Fragmente und/oder Ghosts) bzw. PLT-Clumps zu einer gewissen Interferenz führen. Trotzdem erhält man im statistischen Mittel über alle untersuchten Proben relativ stabile Werte.

Im Bezug auf das kleine Blutbild sollte Schweineblut sofort, Pferdeblut ab 24 h gekühlt werden. Steht eine Untersuchung der Thrombozytenparameter des Pferdes im Vordergrund, ist es unerheblich, ob gekühlt wird oder nicht. Ideal wäre bezüglich der Blutzellzählung in Anlehnung an die ICSH (1994) eine Verarbeitung innerhalb von 4-6 Stunden.

4.1.5.2 Parameter der Blutzelldifferenzierung

Die Blutzelldifferenzierung im Peroxidasekanal zeigt (s. Abb. 68) beim Pferd eine statistisch hochsignifikante bzw. signifikante Abhängigkeit von der Lagerungszeit bzw. -temperatur. Die absolute Zellzahl der neutrophilen Granulozyten beim Pferd weist nach 24 Stunden (22°C), ähnlich wie von SEEGERS (1997) publiziert, einen kontinuierlichen Rückgang auf 30% auf. Ein gleichzeitiger massiver Anstieg der Lymphozyten unterstützt die These von SEEGERS (1997), dass es sich hierbei um degenerierte Neutrophile handelt, die aufgrund eines Verlustes der Peroxidaseaktivität im Lymphozytencluster mitgezählt werden. Die Reduktion der Gesamtleukozytenzahl beruht demnach hauptsächlich auf einem Verlust an peroxidaseaktiven Zellen. Eigene manuelle Differenzierungen ergaben in älteren Pferdeblutproben eine Zunahme von pyknotischen, verhältnismäßig kleinen Zellkernen, die zu Koinzidenzen mit den Lymphozyten führen könnten. Noch empfindlicher gegenüber der Art der Lagerung erscheinen die Zellpopulationen in Schweineblut. Nach RADIN et al. (1986) weisen Schweinegranulozyten eine erhöhte Variabilität in Zell-, Zellkerngröße und Grad der Schrumpfung auf. BOLLWAHN (1960) postuliert einen schnelleren Zellzerfall in Schweineblut. Eigene Untersuchungen ergeben einen deutlichen Abfall der Gesamtleukozytenzahl bei Raumtemperatur (8% nach 24 Stunden) und einen gleichzeitigen Rückgang beider am häufigsten vorkommenden Leukozytenpopulationen. Genaue Erklärungen zu den gering vertretenen Zellpopulationen haben, durch die ermittelte größere Streubreite der Wiederholungsmessungen, nur spekulativen Charakter.

Monozyten beider Tierarten fallen, wie in Abb. 71 u. 72 zu erkennen ist, vermutlich im Verlauf der Untersuchung aufgrund von Zerfallserscheinungen oder Schrumpfung, Vakuolisierung und Peroxidaseverlust in das LUC- (Pferd) bzw. Lymphozytencluster ab. Der Anstieg der eosinophilen Granulozyten des Pferdes ergibt sich möglicherweise durch das Absinken der Neutrophilenwolke insgesamt, was zum Mitzählen einiger Neutrophiler im Eosinophilencluster führt.

Die Anzahl der Basophilenpopulation bleibt beim Schwein unabhängig von Lagerungsart und- dauer auffallend stabil. Pferdeblut (s. Abb. 75) hingegen weist einen deutlichen Peak der Basophilenzahl zeitversetzt bei "warmen" (24 h) und "kalten" Proben (60h) auf, was auf das Erfassen von lyseresistenten Zellen schließen lässt. Ein ähnliches Bild sieht man in heparinkoaguliertem Blut, in dem es ebenfalls zu einer "Pseudobasophilie" kommt. (siehe auch Abb. 75)

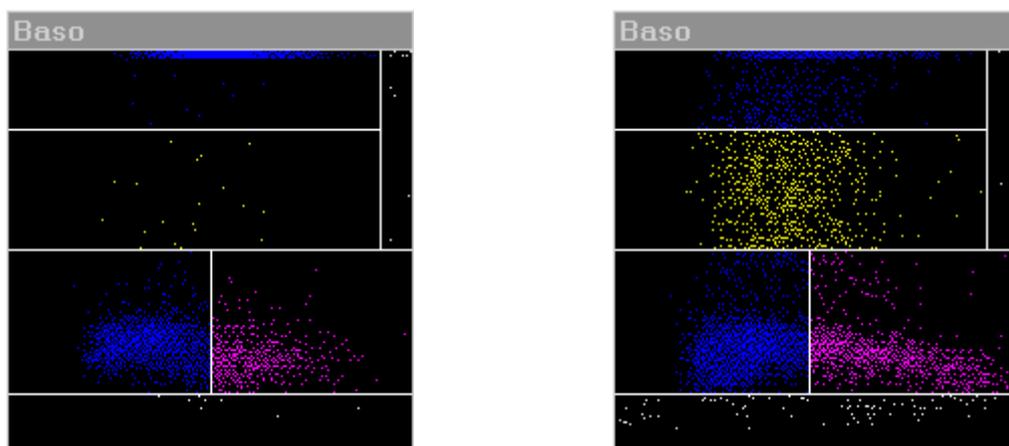


Abbildung 92: Baso-Scattergramm, Nucleogramm Pferd-Nr. 219; Messzeitpunkt 0 und 24 Stunden; Basophilie (gelb) $0,87 \times 10^9/l = 16,4\%$

Zu den Differenzierungsergebnissen der Verlaufsuntersuchung kann gesagt werden, dass Pferdeblut bis 24 Stunden mit Ausnahme der Monozyten stabile Ergebnisse aufweist und darüberhinaus gekühlt gelagert werden sollte. Für Schweineblut erhält man eine stabilere Leukozytendifferenzierung, wenn die Proben direkt nach Blutentnahme gekühlt wurden.

Eine Bestimmung der Retikulozyten sollte nach eigenen Untersuchungen ungekühlt innerhalb von 3 Stunden nach Blutentnahme erfolgen, da die Retikulozytenzahlen je nach Lagerungsart einer hochsignifikanten Veränderung unterliegen.

4.2 Kritische Betrachtung einiger Proben

In Anlehnung an die Forderung von KATZ und LENZ (1986) zur Nachkontrolle kritischer Blutproben sollen im Folgenden auffällige Patienten dargestellt werden.

4.2.1 Veränderungen des roten Blutbildes

Änderungen der Erythrozytenmorphologie und deren Anzahl können sehr gut graphisch erfasst werden. Vorteile dieser Darstellung (neben der numerischen Erfassung) werden anhand eines Fallbeispiels (Pferdeblutprobe Patient-Nr. 139) deutlich gemacht. In der folgenden Abbildung 93 werden zunächst ein Erythro- und ein Retikulozytenscattergramm eines unauffälligen klinisch gesunden Tieres vorangestellt.

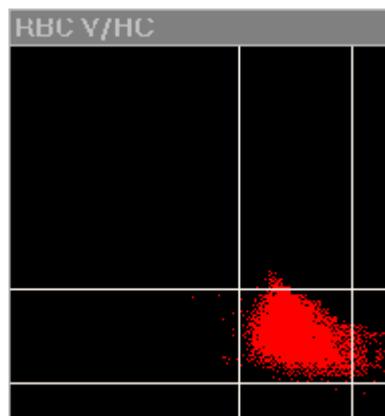


Abbildung 93: Erythrogramm, Tic-Tac-Toe Pferd-Nr. 135

Die Erythrozytenpopulation liegt im normozytär-normochromen Bereich des Erythrogramms. Links davon befindet sich der hypochrome, rechts davon der hyperchrome Bereich. Oben würde man makrozytäre und unten mikrozytäre Zellen finden (siehe auch Abb. 11).

Das Retikulozytenscattergramm in Abbildung 94 findet man 99,9% der Erythrozytären Zellen im Bereich der reifen Erythrozyten im linken Abschnitt der Abbildung. Ein verschwindender Anteil von 0,1% ($3,7 \times 10^9/l$) stellt den physiologischen Referenzbereich equiner Retikulozyten dar.

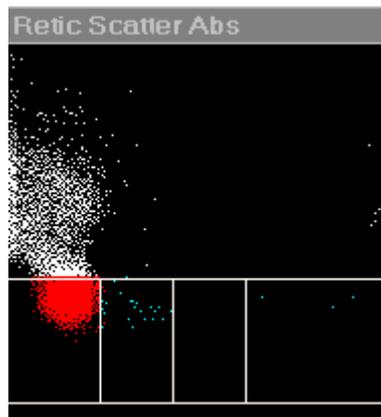
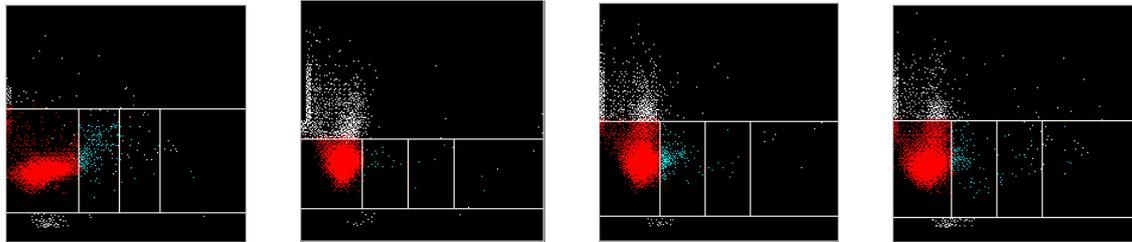
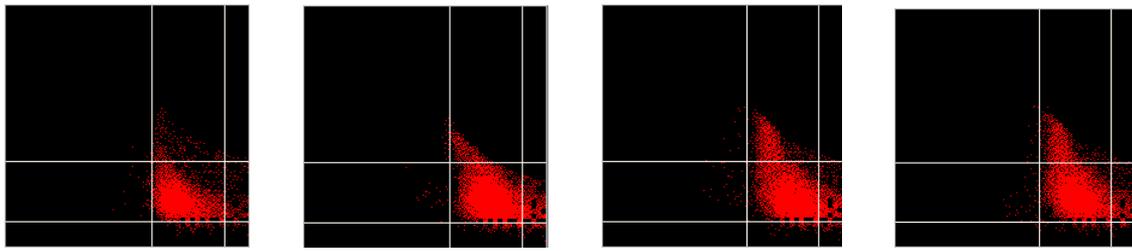


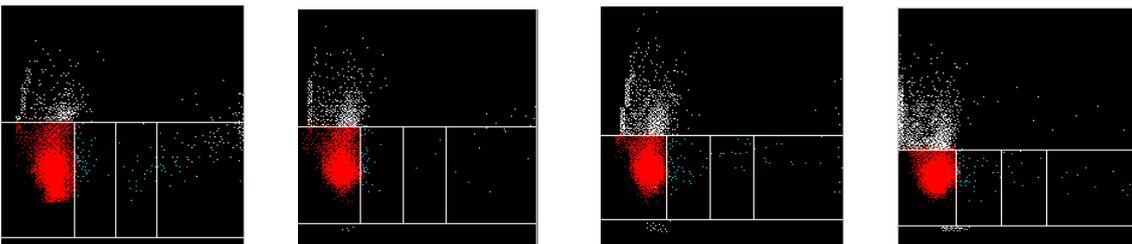
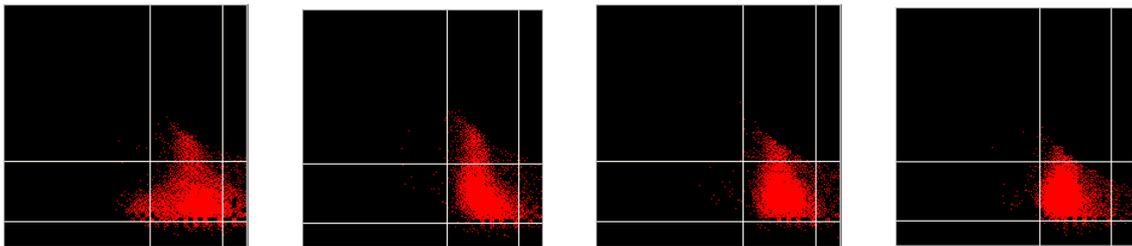
Abbildung 94: Retikulozytenscattergramm Pferd-Nr. 135

Im nun folgenden Fallbeispiel soll vor allem auf die veränderte Erythrozytenmorphologie im Verlauf einer Anämie eingegangen werden. Es handelt sich hierbei um einen 5 Monate alten Haflinger, der aufgrund des auffällig niedrigen Hämatokritwertes (HCT = 0,07 l/l) Anlass für eine Verlaufsuntersuchung gab. Der Patient zeigte eine autoimmunhämolytische Anämie. Da derart ausgeprägte Anämien bei Pferden selten entdeckt werden, ist die Darstellung dieser regenerativen Anämie besonders interessant. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen den Verlauf der hochgradigen Anämie in der graphischen Darstellung des Erythrogramms (bzw. "Tic-Tac-Toe") und dem zugehörigen Retikulozytenscattergramm. Zu Beginn sieht man bei sehr niedriger Erythrozytenzahl einen Anstieg der Retikulozyten auf $18,9 \times 10^9/l$. Im Erythrogramm deutet sich im makrozytär-normochromen Bereich eine kleine Erythrozytenpopulation an, die im Verlauf der Untersuchung bis zum 6. Tag deutlicher in Erscheinung tritt. Der Anstieg der Erythrozyten und der Rückgang der Retikulozyten bereits am 2. Tag ist auf eine durchgeführte Bluttransfusion zurückzuführen. Es folgt daraufhin erneut ein Rückgang der Erythrozytenzahlen bis tatsächlich eine körpereigene Regeneration am Ende der 2. Krankheitswoche beginnt. Im Verlauf schön dargestellt ist das Anwachsen der makrozytären-normochromen Population gefolgt von einem deutlichen Rückgang dieser makrozytären-normochromen "Fahne" in der dritten Krankheitswoche bis die Erythrozytenzahl wieder den Referenzbereich erreicht. Mit diesem Beispiel kann gezeigt werden, dass die Erythrozytenmorphologie im Hinblick auf die regenerativen Prozesse der Erythropoese des Pferdes durch das automatisierte Hämatologiesystem ADVIA 120 graphisch nachgewiesen werden kann. Die neue automatisierte, tierartspezifische Retikulozytendiagnostik setzt zusammen mit der

graphischen Ergebnisdarstellung in der Anämiediagnostik der Haussäugetiere neue Maßstäbe.



Date:	30.10.98	31.10.98	04.11.98	05.11.98
RBC:	$1,72 \times 10^{12}/l$	$3,45 \times 10^{12}/l$	$3,09 \times 10^{12}/l$	$2,47 \times 10^{12}/l$
Reti:	$18,9 \times 10^9/l$	$2,50 \times 10^9/l$	$21,6 \times 10^9/l$	$13,2 \times 10^9/l$



Date:	06.11.98	13.11.98	19.11.98	26.11.98
RBC:	$2,33 \times 10^{12}/l$	$2,31 \times 10^{12}/l$	$3,19 \times 10^{12}/l$	$4,33 \times 10^{12}/l$
Reti:	$10,7 \times 10^9/l$	$3,50 \times 10^9/l$	$6,70 \times 10^9/l$	$6,40 \times 10^9/l$

Abbildung 95: Erythrogramm, Tic-Tac-Toe und Retikulozytenscattergramm Pferd-Nr. 139, Verlauf einer autoimmunhämolytischen Anämie

4.2.2 Veränderungen des weißen Blutbildes

Im Verlauf der Evaluation wurde, neben den in die Untersuchung eingegangenen Pferdeblutproben, ebenfalls die in Abbildung 96 folgende massive Leukozytose von $WBC = 411,3 \cdot 10^9/l$ ermittelt. Bemerkenswert ist die außerordentlich hohe Anzahl an monozytären, lymphoiden Zellen im Vergleich zu den veterinärmedizinischen Literaturangaben von JAESCHKE und RUDOLPH (1991). Auffallend ist die steil nach oben verlaufende Zellpopulation die aus dem Lymphozytencluster durch das LUC- bis in das Monozytencluster hineinreicht. Im Nucleogramm erkennt man eine massive Ansammlung von monozytären Zellen und eine starke Streuung in das Basophilencluster. Hierbei handelt es sich um lyseresistente Zellen. Mit der manuellen Differenzierung konnte die Diagnose einer akuten, lymphatischen Leukämie bestätigt werden.

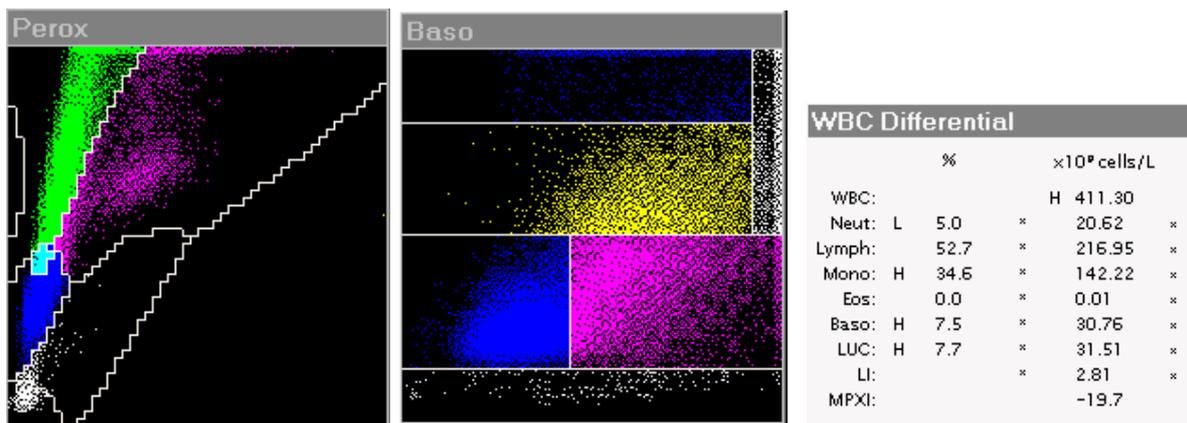


Abbildung 96: Leukogramm (Peroxsattergramm), Nucleogramm (Basosattergramm) und WBC Differenzialblutbild des ADVIA 120, Pferd mit akuter lymphatischer Leukose ($WBC 411,30 \times 10^9/l$)

Auch bei extremer Leukozytose ist das Hämatologiesystem ADVIA 120 in der Lage, die Zellzahl zu erfassen und die Populationen zu differenzieren, bzw. wichtige morphologische Hinweise für die Diagnostik von Leukämien zu liefern.

Im nächsten Beispiel (Abb. 97) sieht man im Peroxidasescatter dargestellte Subpopulationen beim Schwein. Deutlich zu erkennen ist die zweite Population im Neutrophilencluster. Offensichtlich handelt es sich um Zellen geringerer Größe und Peroxidaseaktivität gegenüber der "normalen" Neutrophilenwolke. Im Gegensatz zur Vermutung von SAALMÜLLER (1988), der mononukleäre Subpopulationen bei Schweinen vermutete, handelt es sich in den eigenen Untersuchungen um jugendliche Zellen der myeloischen Reihe mit geringerer Peroxidaseaktivität. Dies bestätigt sich auch in der manuellen Differenzierung der peroxidasegefärbten Blutaussstriche.

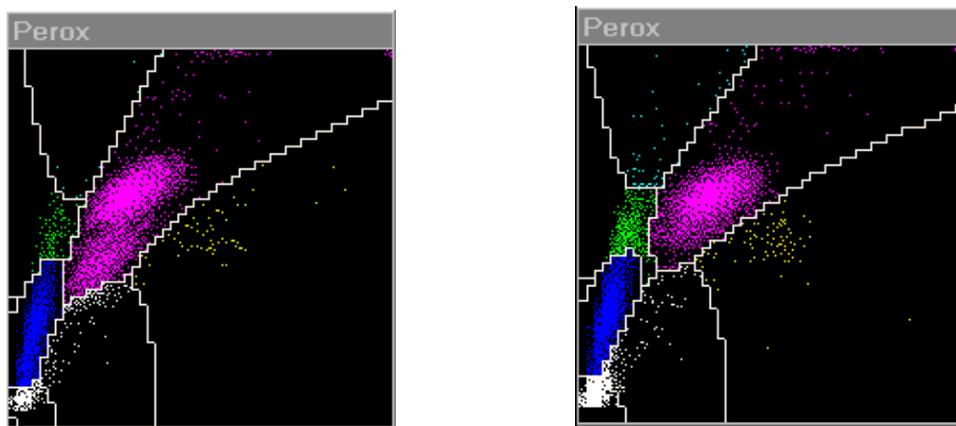


Abbildung 97: Leukogramm (Peroxscaattergramm), Schwein-Nr. 173 mit Subpopulationen (WBC $19 \times 10^9/l$) und Schwein-Nr. 172 (WBC $13,3 \times 10^9/l$) physiologisches Differenzialblutbild

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die hohe Sensitivität des Hämatologiesystems ADVIA 120 eine gravierende Verbesserung der Qualität in der automatisierten Labordiagnostik bezüglich der Blutzellzählung und -differenzierung darstellt. Bei physiologischer Zellmorphologie zählt und differenziert der ADVIA 120 akkurat. Liegen pathologische oder messtechnische Veränderungen vor, werden diese in Form von Beflagung reportiert und geben den Hinweis, dass eine Wiederholungsmessung oder gegebenenfalls eine Nachdifferenzierung nötig wird.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war die Erstellung einer geeigneten Multi-Spezies-Software für das Hämatologiesystem ADVIA 120 und die Evaluierung für die Tierarten Pferd und Schwein.

Zur Prüfung der Tauglichkeit des ADVIA 120 für den Messeinsatz an Pferde- und Schweineblut, wurde nach vorliegendem Protokoll der Nationalen Zulassungsbehörde (FDA, USA) in enger Anlehnung an die ICSH-Richtlinien:

1. eine **Präzision über verschiedene Serien** hinweg und eine **Präzision innerhalb der Serie** durchgeführt.

Für die Parameter WBC, RBC und die Erythrozytenindizes konnte in der vierten Softwareversion eine extrem geringe Variabilität ($CV \leq 1,9\%$) für beide untersuchten Tierarten ermittelt werden. Die Thrombozytenzählung ergab Variationskoeffizienten von $CV = 3,6\%$ (Pferd) und $4,6\%$ (Schwein) und lag hier deutlich unter denen in der Literatur angegebenen Grenzwerte. Die Variabilität der Retikulozytenzählung blieb bei Schweineblut mit Werten zwischen $CV = 5,6\%$ und $9,1\%$ in einem sehr guten Bereich. Pferderetikulozyten wurden gefunden, waren jedoch wegen des geringen Aufkommens durch eine hohe Streubreite gekennzeichnet. Eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse lässt sich ebenfalls für das Differenzialblutbild feststellen. Die in hoher Zellzahl vorkommenden neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten können mit dem ADVIA 120 mit einer erfreulich geringen Varianz bestimmt werden. Werte von $CV = 1,3\%$ bis $2,5\%$ liegen auch hier deutlich unter den Angaben aus der Literatur. Monozyten zeigen mit 10% (Pferd) und 15% (Schwein) eine vergleichsweise geringe Variabilität. Eosinophile und basophile Granulozyten des Schweins liegen bei $CV \leq 11\%$, während hier für Pferdeblut höhere Variationskoeffizienten ($CV = 11 - 16\%$) ermittelt werden. Die anhand von 25-fach Messungen ermittelte Präzision innerhalb der Serie erbrachte erwartungsgemäß ebenfalls ein sehr gutes Ergebnis. Mit Ausnahme des WBC beim Schwein ($CV = 3,4\%$) und der PLT-Zählung (Schwein $CV = 2,9\%$, Pferd $CV = 5,4\%$) lagen die CV-Werte z. T. deutlich unter 2% . Retikulozyten beim Schwein zeigen eine Streubreite von $7,8\%$ bis $9,8\%$.

2. die Richtigkeit der ADVIA 120 Messung anhand des **Methodenvergleichs** überprüft.

Als Referenz- und Vergleichsgeräte bzw. -methoden dienten H*1, Sysmex F-800, Mikrohämatokritzentrifuge, die manuelle Leukozytendifferenzierung mit 200 sowie die Retikulozytenzählung mit 1000 ausgezählten Zellen. Die Blutzellendifferenzierung erfolgte mittels panoptisch gefärbter Blutausstriche nach Pappenheim, den zytochemischen Färbungen Peroxidase und Alphy-Naphtyl-Acetat-Esterase und einer Supravitalfärbung mit Brilliantkresylblau für die Retikulozytenzählung.

Vergleichsmessungen des ADVIA 120 mit dem H*1 ergaben sehr gute bis exzellente Korrelationen. Herausragend vor allem WBC, RBC, MCV des Pferdes und RBC des Schweines mit Werten von $r \geq 0,99$. Für Thrombozyten lagen die Werte bei $r = 0,973$ (Pferd) und $r = 0,955$ (Schwein). Die Korrelationen des ADVIA 120 mit dem Sysmex F-800 lagen insgesamt niedriger, für WBC, RBC und HGB mit $r \geq 0,95$ aber immer noch in einem sehr guten Bereich. Die Messergebnisse der Thrombozytenzählung hingegen unterstreichen mit $r = 0,289$ (Pferd) und $r = 0,525$ (Schwein) deutlich die Unterschiede in der Messtechnologie. Mit seiner neuen zweidimensionalen, erweiterten Thrombozytenanalyse, ist der ADVIA 120 dem Impedanzverfahren (F-800) deutlich überlegen. Retikulozyten wurden bei beiden Tierarten gefunden. Sie korrelieren beim Schwein mit $r = 0,489$ mäßig, während bei Pferden keine Übereinstimmung vorhanden war. Im Differenzialblutbild konnte für neutrophile Granulozyten und Lymphozyten beider Tierarten ein hochsignifikanter Zusammenhang der Ergebnisse ermittelt werden. Beste Übereinstimmung zeigte Schweineblut ($r = 0,974$) für den Vergleich ADVIA 120 / panoptische Färbung. Eosinophile Granulozyten des Schweines korrelierten in allen drei Färbungen ($r = 0,863 - 0,93$) besser als die des Pferdes. Für Monozyten konnten nur geringe $r = 0,391$ (Pferd) bzw. keine (Schwein) Übereinstimmungen erreicht werden.

3. **Linearität** und **Verschleppung** in unterschiedlichen Messbereichen getestet.

Die bei der Linearitätsprüfung ermittelten Korrelationen erwiesen sich als hervorragend. Sie lagen für die untersuchten Parameter Erythrozytenzahl (RBC 0,00 bis $12,43 \cdot 10^{12}/l$), Hämoglobin (HGB 0,00 bis 14,1 mmol/l), die Gesamtleukozytenzahl (WBC 0,00 bis $107,88 \cdot 10^9/l$) und Thrombozyten (PLT 64 bis $961 \cdot 10^9/l$) zwischen $r = 0,98$ und 1,00. Die Werte für den Grad der Verschleppung (carry over) liegen für die dargestellten Parameter RBC, HGB, WBC und PLT zwischen 0,00 und 0,29 %.

4. ein **Vergleich der** am meisten verwendeten **Antikoagulanzen** durchgeführt.

Im Vergleich der Antikoagulanzen K₃EDTA, Li-Heparin und Na-Citrat konnten signifikante Veränderungen bezüglich der Thrombozytenparameter in Li-Heparinblut nachgewiesen werden. Am besten geeignet zur Blutanalyse am ADVIA 120 ist der Gerinnungshemmer K₃EDTA.

5. der **Einfluss von Lagerungstemperatur** und **-dauer** ermittelt.

In Verlaufsuntersuchungen über 72 Stunden wurde die Stabilität von Pferde- und Schweineblut sowie das Messverhalten des ADVIA 120 während der Probenalterung in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur überprüft. Da der ADVIA 120 vor allem Einsatz im Großlabor findet, spielt der Einfluss von Zeitraum und Art der Lagerung auf die Blutparameter eine entscheidende Rolle bei deren Beurteilung. Pferdeblut erweist sich als relativ temperaturunabhängig, während die Blutparameter des Schweines signifikante Abweichungen zeigen. Bei Untersuchung der Thrombozyten des Pferdes spielt die Lagerungstemperatur in den ersten 24 Stunden keine Rolle. Eine Retikulozytenbestimmung sollte innerhalb von 3 Stunden nach Blutentnahme erfolgen, da die Retikulozytenparameter deutliche Abhängigkeit von der Lagerungsart zeigen. Im Ergebnis sollte Schweineblut immer sofort gekühlt werden. Pferdeblut hingegen nur, wenn die Untersuchung voraussichtlich mehr als 24 Stunden nach Blutentnahme durchgeführt wird.

6. die Ausgabe der **graphischen Darstellungen** mittels Fallbeispielen beurteilt.

Anhand von ausgewählten Beispielen wurden die Vorteile der graphischen Darstellung aufgezeigt. Hierbei wird die Beurteilung der Messergebnisse in Form von Zytogrammen besonders bei Proben mit pathologischen Veränderungen extrem erleichtert. Schnelles Erkennen von abnormem Zellaufkommen (quantitativ und qualitativ) oder abweichender Zellmorphologie stellt in der automatisierten Labordiagnostik ein unabdingbares Hilfsmittel zur Diagnosefindung und Qualitätssicherung dar.

Das Hämatologiesystem ADVIA 120 ist mit seiner Multi-Spezies-Software für die Tierarten Pferd und Schwein in der klinischen Labordiagnostik sehr gut einsetzbar. Grenzen liegen hier lediglich bei der Beurteilung der Monozytendiagnostik. Ansonsten misst der ADVIA 120 mit größter Genauigkeit und ermittelt verlässliche Ergebnisse bei Zellzählung und -differenzierung.

6 SUMMARY

The aim of this study was to generate suitable multi-species software for the haematology system ADVIA 120 and to evaluate it with respect to horses and pigs.

In accordance with the current protocol of the national authorisation authority (FDA, USA) and in close compliance with the ICSH guidelines, the following procedures were taken in order to assess the suitability of the ADVIA 120 for measuring and analysing horse's and pig's blood:

1. A **precision study across different batches** and a **precision study within the batch** were carried out.

For the parameters WBC, RBC and the erythrocyte indices, the variability was found to be extremely low ($CV \leq 1.9\%$) in the fourth software version for both animal species under examination. The thrombocyte count showed coefficients of variation of $CV = 3.6\%$ (horses) and 4.6% (pigs) and, as such, was clearly below the threshold values stated in the literature. With values ranging from 5.6% to 9.1% in pig's blood, the variability of the reticulocyte count was very good. Reticulocytes were found in horses but the measured values were widely spread on account of their low occurrence. Similarly, a very high level of reproducibility of the results was noted for the differential blood count. Occurring in a high number of cells, the neutrophile granulocytes and lymphocytes can be identified using the ADVIA 120 with a gratifyingly low variance. Values of $CV = 1.3\%$ to 2.5% are also well under the values given in the literature. At 10% (horses) and 15% (pigs), monocytes show comparably low variability. Eosinophile and basophile granulocytes levels in pigs are at $CV \leq 11\%$ while higher coefficients of variation can be determined in this case for horse's blood ($CV = 11 - 16\%$). The precision within the batch, calculated over 25 measurements, also yielded very good results as expected. With the exception of the WBC in pigs ($CV = 3.4\%$) and the PLT count (pigs $CV = 2.9\%$, horses $CV = 5.4\%$) some of the CV values were well below 2% . Reticulocytes in pigs show a spread of 7.8 to 9.8% .

2. The accuracy of the ADVIA 120 measurement was tested by **method comparisons**.

The following served as reference and comparison equipment or methods: H*1, Sysmex F-800, microhaematocrit centrifuges, manual leukocyte differentiation as determined by counting 200 cells and the reticulocyte count as determined by counting 1000 cells. The blood cell differentiation was effected by means of panoptic staining of blood smears following the Pappenheim method, the cytochemical dyes peroxidase and alpha-naphthyl-acetate-esterase and supravital staining with brilliant cresyl blue for the reticulocyte count. A comparison of the measurements made by the ADVIA 120 with those made by the H*1 showed very good to excellent correlations. Particularly outstanding were the WBC, RBC and MCV in horses and RBC in pigs with values of $r \leq 0.99$. For thrombocytes the values were $r = 0.973$ (horses) and $r = 0.955$ (pigs). The correlations of the ADVIA 120 with the Sysmex F-800 were lower overall, at $r \leq 0.95$ for WBC, RBC and HGB, but nevertheless still in a very good range. At $r = 0.289$ (horses) and $r = 0.525$ (pigs), on the other hand, the thrombocyte count readings clearly underline the differences in the measurement technology. With its new two-dimensional advanced platelet analysis the ADVIA 120 is clearly superior to the impedance method (F-800). Reticulocytes were found in both animal species. At $r = 0.489$, they correlate moderately in the case of pigs whereas no correlation was found in the case of horses. A highly significant correlation of the results was determinable in the differential blood count for neutrophile granulocytes and lymphocytes in both species. The best correlation was showed by pig's blood ($r = 0.974$) for the ADVIA 120 / panoptic staining comparison. Eosinophile granulocytes in pigs correlated better than those of the horses in all three stainings ($r = 0.863 - 0.93$). In the case of monocytes, only a low correlation of $r = 0.391$ or nil (pigs) could be achieved.

3. **Linearity** and **carry-over** were tested in different measurement ranges.

The correlations determined during the linearity test proved to be outstanding. They were between $r = 0.98$ and 1.00 for the following parameters investigated: erythrocyte count (RBC 0.00 to $12.43 \times 10^{12}/l$), haemoglobin (HGB 0.00 to 14.1 mmol/l), the overall leukocyte count (WBC 0.00 to $107.88 \times 10^9/l$) and thrombocytes (PLT 64 to $961 \times 10^9/l$). The values for the degree of carry-over are between 0.00 and 0.29 % for the reported parameters RBC, HGB, WBC and PLT.

4. A **comparison** of the most frequently used **anticoagulants** was carried out.

In a comparison of the anticoagulants K₃EDTA, Li-heparin and sodium citrate, evidence was found of significant changes to the thrombocyte parameters in Li-heparin blood. The anticoagulant K₃EDTA is the most suitable one for blood analysis with the ADVIA 120.

5. The **influence of storage temperature** and **storage duration** was evaluated.

In investigations carried out over a period of 72 hours the stability of horse's and pig's blood and the analysis response of the ADVIA 120 were monitored as the sample aged and deteriorated depending on the storage temperature. Since the ADVIA 120 is primarily used in large laboratories, the influence of the duration and type of storage on the blood parameters plays a crucial role in its assessment. Horse's blood is shown to be relatively unaffected by temperature factors whereas the blood parameters of pigs show significant deviations. When investigating the thrombocytes of horses, the storage temperature in the first 24 hours makes no difference. A reticulocyte reading should be taken within three hours of taking the blood sample since the reticulocyte parameters are clearly affected by the method of storage. The results show that pig's blood should always be refrigerated immediately whereas horse's blood need only be refrigerated if the investigation is likely to be carried out more than 24 hours after taking the blood sample.

6. The readout of **graphical representations** was assessed by way of case examples.

The advantages of graphical representations were highlighted using selected examples, whereby the analysis of the readings is made significantly easier in the form of cytograms, especially in the case of samples with pathological changes. Rapid detection of abnormal amounts of cells (quantitative and qualitative) or differences in cell morphology constitute an essential resource for diagnosis and quality assurance in automated laboratory diagnosis.

With its multi-species software, the ADVIA 120 haematology system is highly suitable for use in clinical laboratory diagnostics for horses and pigs. Its only limitation is in monocyte diagnosis. In all other respects the ADVIA 120 is a measurement instrument of supreme precision with the ability to calculate reliable results in cell counts and cell differentiation.

7 SCHRIFTUMVERZEICHNIS

- ALLEN, B.V.; POWELL, D.G.; SINGLETON, W.B. (1982):
Value and Limitations of Haematology in Viral Infections in Horses.
Vet.Rec.110 (15), 348
- BACUS, J. W. (1973):
The Observer Error in Peripheral Blood Cell Classification.
Am.J.Clin.Path. 59, 223-230.
- BARNETT, C.W. (1933):
The Unavoidable Error in the Differential Count of the Leucocytes of the Blood.
J.Clin.Invest. 12, 77-85.
- BEDDIES, G. (1999):
Erstellung hämatologischer Referenzwerte mit dem für die Tierart Schaf etablierten
Hämatologiesystem Technicon H*1.
Vet. Med. Dissertation Justus-Liebig-Universität, Giessen
- BENTLEY, S.A. (1993):
A Parallel Evaluation of four Automated Hematology Analysers.
Am.J.Clin.Pathol., 100, 626-632.
- BIENZLE, D.; JACOBS, R.M.; LUMSDEN, J.H.; GRIFT, E.; TARASOV, L. (1994):
Comparison of Two Automated Multichannel Haematology Analysers in Domestic
Animals.
Comp. Haematol. Int., 4, 162-166.
- BOLLINGER, P.B.; DREWINKO, B.; BRAILAS, C.D.; SMEETON, N.A.; TRUJILLO;
J.M. (1987):The technicon H*1 an automated hematology analyzer for today and
tomorrow. Complete blood count parameters.
Am. J. Clin. Path., 87, 71 -78.
- BOLLWAHN,W. (1960):
Die Senkungsgeschwindigkeit der Erythrozyten beim Schwein.
Dtsch. Tierarztl. Wochenschr., 67, 378-380.

BOROVICZENY, K.V. (1967):

Beiträge zur Geschichte der hämatologischen Laboratoriumsdiagnostik.
Ärztl.Lab. 13, 493-500.

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

Quantitative buffy coat analysis for hematologic measurements of canine, feline, and equine blood samples and for detection of microfilaremia in dogs.
Am.J.Vet.Res. 49, 321-324

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

ADVIA 120 Hematology System: Reticulocyte and Workflow Analysis. In:
Proceedings of the First International Bayer Diagnostic Central Laboratory
Symposium, 23-25

BURKS, M.F.; TUMBLESON, M.E.; HICKLIN, K.W.; HUTCHESON, D.P.;
MIDDLETON, C.C. (1977):

Age and sex related changes of hematologic parameters in Sinclair(S-1) miniature swine.
Growth, 41, 51-62

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

Evaluation of four automated analyzers. A comparative study of differential counts (imprecision and inaccuracy).
Am. J. Clin. Path., 97, 345-352.

CARLSON, D.; VELAZQUEZ, F.; DAIGNEAULT, R.; STATLAND, B.E. (1986):

Evaluation of the Technicon H*1, an automated complete blood count and differential analyzer.
Clin. Chem., 6, 1173

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

Automated reticulocyte counting: evaluation of the Coulter STKS Haematology Analyser reticulocyte counting function.
Clin. Lab. Haematol., 19, 89-92.

-
- DÖRNER, K.; SCHULZE, S.; REINHARDT, M. AB (1993):
Erste Evaluationsergebnisse mit dem Hämatologiesystem Cell-Dyn 3500.
Klin. Lab., 39, 39-44.
- EDER, H. (1988):
Automatische Retikulozytenanalyse.
Instand Symposium Berlin, 199-206.
- EGELI, A. K. (1998):
Evaluation of piglet blood utilizing the Technicon H*1.
Vet. Clin. Path., 27, 123-128.
- EIKMEIER, H. (1965):
Untersuchung des weißen Blutbildes des Schweins
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 78, 289-290.
- FERGUSON, D. J.; LEE, S. F.; GORDON, P. A. (1990):
Evaluation of reticulocyte counts by flow cytometry in a routine laboratory.
Am. J. Hematol., 33, 13-17.
- FICKENSCHER, Y. (2001):
Hämatologiesystem ADVIA 120, Softwareadaptation und Evaluation bei der Tierart
Hund.
Vetmed Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- FINOCCHIO, E. J.; COFFMAN, J. R.; OSBALDISTON, G. W. (1970):
Platelet counts in horses.
Cornell Vet., 60, 518-527
- FISCHER, A.; LECHNER, J.; KRAFT, W.; HIRSCHBERGER, J. (1989):
Test eines zentrifugalen Hämatologiesystems für die Praxis.
Tierärztl. Prax., 17, 227-230.
- FUCHS, A.; EDER, H. (1991):
Zahl und Reifegradverteilung der Retikulozyten von sechs Tierarten.
J. Vet. Med., 38, 749-754.

- GOOSSENS, W.; VAN HOVE, L.; VERWILGHEN, R.L. (1991):
Monocyte counting: discrepancies in results obtained with different automated instruments.
J. Clin. Pathol., 44, 224-227.
- GREENE, C.E.; PRESTWOOD, A.K.; CLARK, J.D.; ADAMS, D.D.A. (1985):
Microtechnique for Quantitative Platelet Isolation from Blood Enabling Electronic Counting and Sizing of Animal and Human Platelets.
Am. J. Vet. Res., 46, 2648-2653.
- GRENN, H.H.; ATKINSON, S.M.; CARLOS, B.; SOBOL, B. (1976):
Investigational studies of selected hematological parameters in fresh and mailed blood of six species of domestic animals.
Can.Vet. Jour., 17, 213-215
- GROMMELT, P. (1999):
Automatisierte Blutzellzählung und Differenzierung mit dem Hämatologiesystem Technicon H*1 beim Rind.
Vet. Med. Dissertation Justus-Liebig-Universität, Giessen
- GRONER, W.; TYCKO, D. (1980):
Characterizing blood cells by biophysical measurements in flow.
Blood Cells, 6, 141-157.
- GUELFY, J.F.; TRUMEL, C. (1995):
Évaluation d'un appareil d'hématologie, le QBC VetAutoread. Comparision avec les méthodes de référence.
Revue De Medecine Veterinaire, 146, 765-770.
- HOFMANN-LEHMANN, R.; WEGMANN, D.; WINKLER, G.C.; LUTZ, H. (1998):
Evaluation of the QBC-Vet Autoread haematology system for domestic and pet animal species.
Comparative Haematology International, 8, 108-116.
- HOLSTEG, M. (2002):
Hämatologiesystem ADVIA 120, Softwareadaptation und Evaluation bei der Tierart Rind.
Vetmed Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen.

ICSH (1994):

Guidelines for the Evaluation of Blood Cell Analysers Including Those Used for Differential Leucocyte and Reticulocyte Counting and Cell Marker Applications. Clin.Lab.Haematol., 16, 157-174.

ICSH (1985):

Recommended methods for cytological procedures in haematology. Clin.Lab.Haematol., 7, 55-74.

JAIN, N.C. (1993):

Essentials of Veterinary Hematology.
Lea & Febiger, Philadelphia, 4. Aufl., 19-53

KATZ, N.; LENZ, T. (1986):

Kriterien für die Nachkontrolle automatisiert erstellter Blutbilder. GIT.Labor.-Medizin., 8/86, 490-494.

KERSHAW, G.W.; ROBIN, H.; KRONENBERG, H. (1987):

Evaluation of the Technicon H-1 hematology analyser. Pathology, 19, 305-309.

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

Isovolumetric Sphering of Erythrocytes for more Accurate and Precise Cell Volume Measurement by Flow Cytometry. Cytometry 3(6), 419-427.

KLINGLER, K. (1997):

Ergebnisse einer Alpha-site Evaluation des ADVIA 120 Hämatologie Systems. Vortrag in Rom, April 1997

KOEPKE, J.A. (1988):

American Initiatives in Cytometry. Instand Symposium Berlin 43-46.

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

White Blood Cell Differential: A Call for Standards. Blood Cells. 11, 1-9.

-
- KRAFT, W.; DÜRR, U.A. (1995):
Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.
Schattauer-Verlag., Stuttgart., New York.
- KRAUSE, J.R. (1990):
Automated Differentials in the Hematology Laboratory.
Am.J.Clin.Pathol. Suppl. 93(1), 11-16.
- KUNICKA, J.E.; FISCHER, G.; ZELMANOVIC, D.(1998):
Improved platelet count accuracy: Two-dimensional platelet analysis.
Am. Clin. Lab., 6, 6-7
- LAVIN, S.; MORA, F.J.; MONREAL, L.; VINAS (1991):
Evaluation of a Haematological Analyser for its Use in Canine Clinical Pathology.
J.Vet.Med., 702-709.
- MÄDE, D.; WUJANZ, G. (1997):
Untersuchungen zum roten Blutbild der Muttersau.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 110, 68-70
- MANSBERG, H.P.; SAUNDERS, A.M.; GRONER, W.A. (1974):
The Hemalog D White Cell Differential System.
J.Histochem. Cytochem. 22, 711-724.
- MATSUNO, K.; MORIMOTO, M.; FUJISAWA, S. (1999):
Precision and accuracy of white blood cell differentiation by an automated blood cell analyzer.
Rinsho Byori, 47, 353-358.
- MEISTER, D.; TSCHUDI, P.; HERMANN, M.; LUTZ, H. (1990):
Experiences with the QBC-V hematology system at the veterinary hospitals of Zurich and Bern.
Schweiz. Arch. Tierheilkd., 132, 261-266.
- MEYER, K. (2005):
Hämatologiesystem ADVIA 120, Softwareadaptation und Evaluation bei der Tierart Katze.
Vetmed Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen, in Arbeit.

-
- MOHANDAS, N.; KIM, Y.R.; TYCKO, D.H.; ORLIK, J.; WYATT, J.; GRONER, W.A. (1986):
Accurate and Independent Measurement of Volume and Hemoglobin Concentration of Individual Red Cells by Laser Light Scattering.
Blood 68(2), 506-513.
- MOHR, E. (1995):
Sysmex E-2500 Ein automatisches Blutzellzählgerät.
Vet. Med. Dissertation Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- MORITZ, A.; HOFFMANN, C.; SEEGER, M.; ZIEGLER, A.; FAILING, K. (1995):
Die automatisierte Blutzelldifferenzierung mit dem Hämatologiesystem Technicon H*1.
Kongressband 41. Jahrestagung der FG Kleintierkrankheiten der DVG, München, 1-18.
- MÜLLER-PRASUHN, W.(1971):
Use of the Coulter counter "model D" for counting erythrocytes and leukocytes in pigs.
Dtsch. Tierärztl. Wochenschr., 78, 546-548.
- NEURER, F.; HIRSCHBERGER, J. (1999):
Evaluation des Hämatologiegerätes Vet ABC/8P bei Hund, Katze und Pferd.
Prak.Tierarzt., 80, 584-594.
- ORNSTEIN, L.; ANSLEY, H.; SAUNDERS, A.A. (1976):
Improving Manual Differential White Cell Counts with Cytochemistry.
Blood Cells 2, 557-585.
- PASTOR, J.; CUENCA, R.; VELARDE, R.; MARCO, I.; VINAS, L.; LAVIN, S. (1998):
Evaluation of a haematological analyser (Sysmex F-800) with equine blood.
Zentralblatt Veterinärmedizin A, März, 119-126.
- PIERRE, R.V. (1985):
The Routine Differential Leucocyte Count vs Automated Differential Count.
Blood Cells., 11, 11-23.

PÜSCH, M. (2002):

Hämatologiesystem ADVIA 120, Softwareadaptation und Evaluation bei der Tierarten Schaf und Ziege.

Vetmed Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen.

RADIN, M.J.; WEISER, M.G.; FETTMAN, M.J. (1986):

Hematologic and serum biochemical values for Yucatan miniature swine.

Lab. Anim. Sci., 36, 425-427.

REINAUER; H. (1988):

Aktuelle Probleme der Qualitätssicherung im medizinischen Laboratorium.

Instand Symposium Berlin 17-31.

ROSS, D.W.; BENTLEY, S.A. (1986):

Evaluation of an automated hematology system (Technicon H-1).

Arch Pathol Lab Med, 110, 803-808.

RÜMKE, C.L. (1960):

Die Zelldifferenzierung in Blutaussstrichen: Variabilität der Ergebnisse.

Triangle., 4, 154-158.

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

Normal Values and Least Significant Differences for Differential Leucocyte Counts.

J. Chron. Dis., 28, 661-668.

RÜMKE, C.L. (1985):

The Statistical Precision of WBC Differentials

Blood Cells; 11, 145-147

SAUNDERS, A.M. (1972):

Development of Automation of Differential Leucocyte Counts by Use of Cytochemistry.

Clin.Chem., 18, 783-788.

SAVAGE, R.A.; SKOOG, D.P.; RABINOVITCH, A., (1985):

Analytic inaccuracy and imprecision in reticulocyte counting: a preliminary report from the College of American Pathologists Reticulocyte Project.

Blood Cells, 11,1, 97-112

- SCHALM, O.W.; JAIN, N.C.; CAROLL (1975):
Normal Values in Blood Morphology.
In: Schalm's Veterinary Hematology, 156.
Lea & Febinger, Philadelphia
- SEEGERS, M. (1997):
Einsatzfähigkeit des Technicon H*1 in der Hämatologischen Diagnostik beim Pferd.
Vet. Med. Dissertation Justus-Liebig-Universität, Giessen.
- SHINTON, N.K.; ENGLAND, J.M.; KENNEDY, D.A.A. (1982):
Guidelines for the Evaluation of Instruments Used in Haematology Laboratories.
J. Clin. Path., 35, 1095-1102.
- SPANGFORS, P.; KINBERGER, B.; HOLMEN, A. (1990):
Nytt Analyssystem för Veterinärmedicinsk Hematologi.
Sve.Vet.Tid., 42, 527-531.
- SPÄTH, H.; WEBER, C. (1992):
Prüfung eines für die Humanmedizin entwickelten Hämatologie Analysesystems auf
Anwendbarkeit in der Veterinärmedizin.
prakt.Tierarzt, 11, 1037-1040.
- STANWORTH, S.J.; DENTON, K.; MONTEATH, J.; PATTON, W.N. (1999):
Automated counting of platelets on the Bayer ADVIA (TM) 120 analyser.
Clinical And Laboratory Haematology, 21, 113-117.
- SUCHFORT, C. (1998):
Die automatisierte Blutzellzählung und-differenzierung mit dem Technicon H*1 bei
der Katze unter besonderer Berücksichtigung der Thrombozyten und der
Erythrozytenmorphologie bei Anämien.
Vet. Med. Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen.
- THOMAS, L.; MÜLLER, J.; RODRIAN, J. (1989):
Vergleich der Bestimmung von Leukozytenpopulationen am Technicon H*1 mit der
mikroskopischen Differenzierung.
Lab. Med., 13, 213-219.

TVEDTEN, H.; HAINES, C. (1994):

Canine automated differential leukocyte count: study using a hematology analyzer system.

Veterinary Clinical Pathology, 10, 90-96.

TVEDTEN, H.; KORCAL, D. (1996):

Automated differential leukocyte count in horses, cattle, and cats using the Technicon H-1E hematology system.

Veterinary Clinical Pathology, 6, 14-22.

TVEDTEN, H.W.; WILKINS, R.J. (1988):

Automated Blood Cell Counting Systems: A Comparison of the Coulter S-Plus IV, Ortho ELT-8/DS, Ortho ELT-8/WS, Technicon H-1 and Sysmex E-5000.

Vet.Clin.Pathol. 17, 47-54.

VIERORDT, K. (1852):

Neue Methode der quantitativen mikroskopischen Analyse des Blutes.

Arch.physiol. Heilk., 11, 327-331.

VON RÜCKER, A.; HENKEL, E.; HAECKEL, R.; DIEM, H.; GUNZER, H.; MÜLLER, H.A.G.; NEBE, T.; WEBER, R.; JÖNSSON, D.; HELLER, S.; BRÜGGEMANN, M.; FINK, P.; KALOUS, J.; KATZ, N.; KUTZNER, M.; LENZ, T.; LIPS, H.; MÜLLER, W.; PICK, K.H.; PINTO, G.; PROHASKA, W.; RAFFAEL, A.; REINECKE, T.; ROTHE, G.; RUBY, C.; SACHSE, C.; SEEGER, H.T.; SCHMITZ, G.; SCHNEIDER, W.; STOBRAWA, F.; VAN WERSCH, J.W.J.; ZIERVOGEL, H. (1994):

Evaluationsprotokoll für hämatologische Zellzähl- und Zelldifferenzierungsgeräte.

Klinische Chemie Mitteilungen, 25, 272-286.

WATSON, J.S.; DAVIS, R.A. (1987):

Evaluation of the Technicon H*1 hematology system.

Lab. Med. B., 18, 316-321.

WEBER, R. (1992):

Messprinzipien in der Hämatologie.

MTA Extra, 16, 4-24.

WEISER, M.G. (1987):

Modification and Evaluation of a Multichannel Blood Cell Counting System for Blood

Analysis in Veterinary Hematology.
J.Am.Vet.Med.Ass., 190, 411-415.

WELKER, H. (1854):
Über Blutkörperchenzählung.
Arch. Verein Gemeensch. Arbeit, 1, 161-195

WENSING, Th. (1992):
Some Experiences with the Use of the Quantitative Buffy Coat-Analyser QBC in horses.
Tijdschr.Diergeneeskd., 117, 343-344.

WENZ, B.; RAMIREZ, M.A.; BURNS, E.R. (1987):
The H*1 hematology analyser: Its Performance Characteristics and Value in the diagnosis of infectious disease.
Arch.Pathol.Lab.Med., 111, 521-524.

WISECUP, W.G.; CROUCH, B.G.A. (1963): Evaluation and Calibration of an Electronic Particle Counter for Enumeration of Multispecies Blood Cells.
Am.J.Clin.Pathol., 39, 349-354

ZELMANOVIC, D.; GARCIA, R.A.; TURRELL, J. (1992):
Automated Instrumentation (Haematology).
aus: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 4th.ed. Vol. 3, 772-787.
John Wiley & Sons.

ZIEGLER, A. (1997):
Die Automatische Blutzelldifferenzierung mit den Hämatologiesystemen Microx 70 und Technicon H*1 beim Hund.
Vet. Med. Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen.

8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen sehr herzlich bedanken, die zum Entstehen und Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn HDoz Dr. A. Moritz für die Anregung dieser Studie und die Überlassung des Themas. Seine hervorragende Beratung und fachliche Hilfestellung und sein menschlicher Beistand in schwierigen Zeiten waren entscheidend bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. H.H.L. Sasse danke ich für die Unterstützung des Themas und die wichtigen Hinweise zur Verbesserung der Arbeit.

Bei Herrn Dr. K. Failing, Herrn H. Heiter und Frau Lehmann von der Arbeitsgruppe für Biomathematik möchte ich mich herzlich für ihre endlose Geduld bei der statistischen Auswertung und Datenaufbereitung bedanken.

Weiteren herzlichen Dank möchte ich dem Laborteam der Medizinischen Veterinärklinik I, insbesondere Frau Klein, Frau Schulte, Frau Weiß und Frau Bender aussprechen. Sie standen mir genau wie das Laborteam der Rinderklinik um Frau Neeb-Sonntag immer mit freundlichem Rat zur Seite.

Danken möchte ich auch den Kollegen aus der Arbeitsgruppe Hämatologie, insbesondere Y. Fickenscher, M. Püsch, M. Holsteg und K. Meyer für die nette Zeit der Zusammenarbeit.

Außerdem danke ich auch allen anderen Kolleginnen und Kollegen, die mich in der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik für Kleintiere und Innere Krankheiten der Pferde so hilfsbereit unterstützt haben.

Bei dem Team des Schlachthofs Giessen möchte ich mich für die zur Verfügungstellung der Tiere und die Unterstützung bei den Blutentnahmen bedanken.

Einen ganz herzlichen Dank den Mitarbeitern von Bayer Diagnostics, v.a. Herrn Dipl. Ing. W. Kosanke und Herrn Erwin Schraml.

Weiterhin danke ich Gerald Beddies für die technische Unterstützung und die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen Freunden für ihren Beistand bedanken.

Abschließend richtet sich mein größter Dank an meine Familie für die Geduld, die seelische Unterstützung, die Motivation und den Rückhalt zum Fertigstellen dieser Arbeit. Besonders danken möchte ich Martin Wehner, meinen Töchtern Murielle und Maja, meinem Sohn Paul und vor allem meinen Eltern, ohne sie wäre die Anfertigung dieser Dissertation nicht möglich gewesen.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: 49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5021-5



9 783835 950214