LASERGESTÜTZTE ERYTHROZYTENANALYSE (ADVIA® 120 UND LASERCYTE®) BEI HUND UND KATZE MIT AUSWERTUNG DER ERYTHROZYTENMORPHOLOGIE

DEBORAH WEISSERT

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

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2011

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 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Kleintiere,
Klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. A. Moritz

Lasergestützte Erythrozytenanalyse (ADVIA® 120 und LaserCyte®) bei Hund und Katze mit Auswertung der Erythrozytenmorphologie

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

eingereicht von
Deborah Weissert
Tierärztin aus Backnang

Gießen, 2011

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

Dekan:
Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter:
Prof. Dr. A. Moritz
Prof. Dr. E. Burkhardt

Tag der Disputation:
14.06.2011

Meiner Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG 1

2. LITERATURÜBERSICHT 3

2.1 ERYTHROPOESE BEI HUND UND KATZE 3
2.2 KLASSIFIKATION VON ANÄMIEN 9
2.2.1 Klassifikation nach der Knochenmarkansprechbarkeit 9
2.2.2 Morphologische Klassifikation: 9
2.2.2.1 Wintrobe-Indizes 9
2.2.2.2 Normozytär-normochrome Morphologie 11
2.2.2.3 Normozytär-hypochrome Morphologie 11
2.2.2.4 Makrozytär-hypochrome Morphologie 11
2.2.2.5 Makrozytär-normochrome Morphologie 12
a) FELV 12
b) FOLSÄURE- UND COBALAMIN-MANGEL 13
c) MAKROZYTOSE DES PUDELS 14
d) GREYHOUND 14
e) ANDERE 14
2.2.2.6 Mikrozytär-hypochrome/normochrome Morphologie 15
a) EISENMANGEL 15
b) SIDEROBLASTISCHE ANÄMIE 16
c) LEBERFUNKTIONSSTÖRUNG 16
d) DYSERYTHROPOESE DES ENGLISH SPRINGER SPANIELS 18
e) AKITA UND SHIBA INU 18
2.2.3 PATHOPHYSIOLOGISCHE KLASSIFIKATION 20
2.2.3.1 Blutungsanämie 21
2.2.3.2 Hämolytische Anämie 23
2.2.3.2.1 Immunhämolyse 24
2.2.3.2.2 Erythrozytendefekte und Hämolysen durch erhöhte osmotische Fragilität 32
a) PHOSPHOFRUKTOKINASE-MANGEL 32
b) PYRUVATKINASE-MANGEL 33
c) HÄMOLYSE BEI ABESSINIERN UND SOMALI-KATZEN 34
d) STOMATOZYTOSE 34
e) CYTOCHROM b5 REDUKTASE MANGEL BEI HUND UND KATZE 35
2.2.3.2.3 Infektionen 36
2.2.3.2.4 Andere 39
a) HEINZKÖRPERCHEN 39
b) EXZENTROZYTEN 40
c) HYPOPHOSPHATÄMIE 41
d) ZINK 41
e) MIKROANGIOPATHISCHE HÄMOLYSE 42
f) HÄMOLYSINE 42
2.2.3.3 Nicht regenerative Erkrankungen 42
2.2.3.3.1 Entzündliche Erkrankungen 42
2.2.3.3.2 Chronische Nierenerkrankungen 44
2.2.3.3.3 Knochenmarkshypoplasie oder -aplasie 45
a) MYELITIS 45
b) TOXISCH 45
c) STRAHLUNG 46
d) MARROW REPLACEMENT 46
2.2.3.3.4 Erythroide Hypoplasie oder ineffektive Erythropoese 51
a) PURE RED CELL APLASIA (PRCA) 51
b) FELV-INDUZIERTE ERYTHROIDE HYPOPLASIE 52
c) ERNÄHRUNGSBEDINGT 52
d) ENDOKRIN 52
e) CHRONISCHE LEBERERKRANKUNGEN 53
2.3 MÖGLICHKEITEN ZUR BEURTEILUNG DER REGENERATIONSFÄHIGKEIT 54
2.3.1 Blutausstrich 54
a) MORPHOLOGIE 54

b) SUPRAVITALFÄRBUNGEN ... *56*
2.3.2 Automatisierte Verfahren ... 57
a) RETIKULOZYTEN ... *57*
b) MCV, MCHC, RDW ... *58*
c) GRAFISCHE DARSTELLUNGEN ... *59*
2.3.3 RI, RPI ... 60

3. MATERIAL UND METHODEN ... 62

3.1 PATIENTENGUT ... 62
3.2 BLUTPROBENENTNAHME ... 63
3.3 PROBENVERARBEITUNG ... 63
3.3.1 ADVIA® 120 ... 64
3.3.2 LaserCyte® ... 66
3.3.3 Hämatokritzentrifuge ... 69
3.3.4 Retikulozytenfärbung (Supravitalfärbung) ... 69
3.3.5 RI, RPI ... 70
3.4 VERSUCHSPROTOKOLL ... 71
3.4.1 Präzision innerhalb einer Serie ... 71
3.4.2 Methodenvergleich ... 71
3.4.3 Referenzwerte ... 71
3.4.4 Grafische Darstellungen ... 72
3.5 STATISTIK ... 75
3.5.1 Varianzanalyse ... 75
3.5.2 Korrelationsanalyse ... 75

4. ERGEBNISSE ... 77

4.1 PRÄZISION INNERHALB DER SERIE ... 77
4.1.1 ADVIA® 120 ... 77
4.1.2 LaserCyte® ... 77
4.2 METHODENVERGLEICH ... 82
4.3 GESUNDE TIERE ... 98
4.3.1 Referenzwerte ... 98
4.3.2 Morphologie gesunder Hunde und Katzen ... 101
4.4 KRANKE TIERE ... 103
4.4.1 Krank ohne Anämie ... 103
4.4.1.1 Hunde ohne Anämie ... *103*
4.4.1.2 Katzen ohne Anämie ... *106*
4.4.2 Krank mit Anämie ... 108
4.4.2.1 Hunde mit Anämie ... *108*
4.4.2.2 Katzen mit Anämie ... *116*
4.4.2.3 Anämieklassifikation ... *119*
4.4.3 Grafische Darstellungen mit Fallbeispielen ... 124

5. DISKUSSION ... 131

5.1 PRÄZISION INNERHALB DER SERIE ... 131
5.2 METHODENVERGLEICH ... 133
5.3 GESUNDE TIERE ... 144
5.3.1 Referenzbereiche ... 144
5.4 KRANKE TIERE ... 148
5.4.1 Tiere ohne Anämie ... 148
5.4.2.1 Tiere mit Anämie ... 150
5.4.2.2 Anämieklassifikation ... 155
5.4.3 Grafische Darstellungen ... 157

6. ZUSAMMENFASSUNG ... 163

7. SUMMARY ... 166

8. ABKÜRZUNGEN ... 168

9. ANHANG 170
10. LITERATURVERZEICHNIS 171
11. DANKSAGUNG 183

1. Einleitung

Eine Anämie bei Hund und Katze stellt einen häufigen Vorstellungsgrund in der Kleintierpraxis dar. Dabei kann die Anämie nicht als eigenständige Krankheit angesehen werden, sondern als ein Symptom zahlreicher pathophysiologischer Veränderungen, welches im Verlauf vieler Erkrankungen auftreten kann.

Um die Grundursache der Anämie herauszufinden und eine effektive Therapiemöglichkeit wählen zu können, ist eine Charakterisierung des Anämietyps essentiell. Dabei ist es wichtig, die Regenerationsfähigkeit des Knochenmarks zu bestimmen, die die erythropoetische Aktivität des Knochenmarks reflektiert. Dazu werden verschiedene Methoden der Retikulozytenzählung angewandt, die von der manuellen Auszählung der Retikulozyten auf supravitalgefärbten Blutausstrichen bis hin zur automatisierten Retikulozytenmessung durch Laborgeräte mittels Lasertechnik reichen. Außerdem können morphologische Erythrozyten-veränderungen Hinweise auf die Ätiologie der Anämie geben. Dafür werden z.B. die Erythrozytenindizes Mittleres Erythrozytenvolumen (mean corpuscular volume, MCV), Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC) und Erythrozytenverteilungsbreite (red cell distribution width, RDW) sowie grafische Darstellungen der Erythrozyten herangezogen.

Ziel dieser Studie ist es, Hunde und Katzen mit Anämie und Tiere ohne Anämie, aber mit abweichender Erythrozytenmorphologie durchflusszytometrisch zu untersuchen und auszuwerten. Als Laser-gestützte Hämatologiegeräte kommen das Großlaborgerät ADVIA® 120 und das In-House-Gerät LaserCyte® zum Einsatz.

Zur Beurteilung der Geräte bezüglich der Parameter des roten Blutbildes wird ein Methodenvergleich durchgeführt. Anhand einer Population von 60 gesunden Hunden und 44 gesunden Katzen werden eigene Referenzwerte bestimmt. Zusätzlich erfolgt eine vergleichende Retikulozytenanalyse mittels manueller Retikulozytenzählung und durchflusszytometrischer Verfahren zur Anämieklassifikation.

Ein weiterer Schwerpunkt wird auf die Auswertung der morphologischen Veränderungen gelegt. Dafür werden die Parameter MCV, MCHC und RDW aus der automatisierten Zellzählung mit grafischen Darstellungen von beiden Geräten verglichen. Die Vor- und Nachteile der jeweiligen Methode werden anhand einiger Fallbeispiele verdeutlicht und anschließend diskutiert.

Zur Veranschaulichung jeder einzelnen Messung wurde eine PowerPoint-Präsentation mit den grafischen Darstellungen beider Geräte angefertigt, welche sich im Anhang befindet.

2. Literaturübersicht

2.1 Erythropoese bei Hund und Katze

Unter der Erythropoese versteht man die Bildung und Entwicklung von Erythrozyten aus der pluripotenten Stammzelle über kernhaltige Vorläuferzellen (Pschyrembel 2007).

Das Blut befindet sich in vier unterschiedlichen Kompartimenten: Den Stammzellen, den Progenitorzellen, den Präkursorzellen und den reifen Erythrozyten. Die Kompartimente werden unter dem Begriff „Erythron“ zusammengefasst, um die Idee zu bekräftigen, dass sie als gemeinsames Organ funktionieren (Car 2000, Erslev 1997).

Aus einer pluripotenten Stammzelle entwickelt sich unter dem Einfluss von Interleukin 3 eine frühe erythroide Vorläuferzelle, BFU-E (burst-forming units-erythroid) genannt. Durch Teilung entsteht die CFU-E (colony-forming units-erythroid), welche zusammen mit der BFU-E das Kompartiment der Progenitorzellen darstellt. Aus der CFU-E bildet sich unter dem Einfluss von Erythropoetin durch Teilung und Differenzierung der Proerythroblast (=Rubriblast). Aus diesem entwickeln sich frühe Normoblasten (=Prorubrizyten, basophile Erythroblasten), intermediäre Normoblasten (Rubrizyten, polychromatische Erythroblasten) und späte Normoblasten (Metarubrizyten, orthochromatische Erythroblasten) (Harvey 2008b, Villiers 2007).

Auf der Stufe der Metarubrizyten sind die Zellen nicht mehr teilungsfähig (Harvey 2001). Während der Teilungen und Ausdifferenzierung werden die Zellen kleiner, verlieren Nukleoli, Golgi-Apparat, Mitochondrien und Ribosomen und beherbergen wachsende Mengen an Hämoglobin. Wenn eine kritische Hämoglobinkonzentration erreicht ist, kommt es zur Kernausstoßung und ein Retikulozyt ist entstanden (Harvey 2001, Harvey 2008b, Villiers 2007). Aus einem Prorubrizyten entstehen 16-32 Retikulozyten und alle Zellen dieser Reifungsstadien befinden sich im Kompartiment der Präkursorzellen (Car 2000).

Die Entwicklung von BFU-E bis zum Retikulozyten benötigt ca. 7 Tage. Retikulozyten verbleiben für 24-48 Stunden im Knochenmark, bevor sie in die Zirkulation abgegeben werden. Retikulozyten haben keine Fähigkeit zur Zellteilung mehr, können aber durch zytoplasmatische Ribosomen, Polyribosomen und Mitochondrien

weiterhin Hämoglobin synthetisieren (Giger 2005, Harvey 2008b, Villiers 2007). Ca. 30% des Hämoglobins werden nach der Kernausstoßung synthetisiert (Geminard *et al* 2002). Retikulozyten werden zu einem reifen Erythrozyten, wenn die Hämoglobinsynthese abgeschlossen ist und die Zellgröße auf die adulte Größe reduziert wurde (Giger 2005, Harvey 2008b, Villiers 2007). Die Ausreifung des Retikulozyten beginnt bei Mensch, Hund und Katze im Knochenmark und wird im peripheren Blut und in der Milz beendet (Car 2000, Harvey 2001). Retikulozyten können sich während der Ausreifung mehr und mehr verformen, sodass sie die Fähigkeit erlangen, das Knochenmark zu verlassen (Harvey 2001). Während einer gesteigerten Erythropoese können die Retikulozyten in einem früheren Reifungsstadium aus dem Knochenmark in das Gefäßsystem freigesetzt werden. Diese Zellen sind makrozytär, weniger entwickelt und benötigen eine längere Reifungszeit in der Zirkulation (Giger 2005). Bei der Katze werden Retikulozyten bei gesunden Tieren nicht aus dem Knochenmark in die Peripherie gegeben, bevor diese zur punktierten Form gereift sind. Es werden also keine und nur wenige aggregierte Retikulozyten (<0,5 %) und bis zu 10% punktierte Retikulozyten im Blut von adulten gesunden Katzen gefunden (Harvey 2001). Bei den meisten Tierarten sind Retikulozyten 3-4 Tage nach der Einwirkung des Erythropoetins auf das Knochenmark zu erwarten; der Höhepunkt der Retikulozytenproduktion liegt nach 7-10 Tagen vor. Hunde haben die größte Möglichkeit zur Produktion einer Retikulozytose (6-8facher Anstieg der Retikulozytenzahl), Katzen können die Retikulozytenzahl 3-5fach erhöhen und Kühe nur wenig (Stockham and Scott 2008).
Reife Erythrozyten überleben im Blut bei Hunden im Durchschnitt 110 Tage und bei Katzen ca. 70 Tage (Villiers 2007).

Beim adulten Säugetier sind das Knochenmark und die Milz zur Erythropoese fähig. Die Haupterythropoese wird durch die erythropoetische Mikroökologie („microenvironment“) reguliert und findet in den sog. „erythroblasic islands“ statt. Dies sind spezialisierte „Nester“ im Knochenmark, in denen erythroide Vorläufer wachsen, sich differenzieren und wo die Kernausstoßung erfolgt. Sie bestehen aus einem zentralen Makrophagen, der von einem Ring aus sich differenzierenden erythroiden Vorläuferzellen in verschiedenen Reifungsstadien und angrenzenden retikulären Zellen umgeben ist (Car 2000, Carr *et al* 2002, Chasis and Mohandas 2008, Lee *et al* 2006). Während der Erythropoese werden verschiedene Adhäsionsmoleküle sowohl

von den Erythroblasten als auch von den Makrophagen exprimiert. Diese Proteine mediieren Verbindungen zwischen den einzelnen Erythroblasten, Adhäsionen zwischen Erythroblast und Makrophage (z.B. $\alpha_4\beta_1$-VCAM-1; ICAM-4 – α_v Integrin; Emp) und auch Interaktionen mit extrazellulärer Matrix wie Fibronektin und Laminin (Chasis and Mohandas 2008, Lee *et al* 2006).
Neben den Interaktionen mit den erythroiden Vorläuferzellen phagozytiert der zentrale Makrophage den gegen Ende der Differenzierung ausgestoßenen Zellkern. Desweiteren wird vermutet, dass der Makrophage beim Eisen-Transfer eine Rolle spielt und das Eisen damit den Erythroblasten zur Hämsynthese zur Verfügung steht (Chasis and Mohandas 2008).

Regulation der Erythropoese:
Hauptregulator der Erythropoese ist das Erythropoetin (EPO), ein Glykoprotein, welches beim Erwachsenen vor allem in der Niere (peritubuläre interstitielle Zellen der inneren Nierenrinde und äußere Medulla) synthetisiert wird (Car 2000, Fisher 2003, Giger 2005). Allerdings kann der Anteil des in der Leber in zentroazinären Hepatozyten und Ito-Zellen gebildeten EPOs bis zu 10-15 % des Plasma-Erythropoetins ausmachen. EPO kann weder in der adulten Niere noch in der Leber gespeichert werden. Es hat eine Halbwertszeit von 6-10 Stunden. Der spezielle Stimulus für die EPO-Sythnese stellt ein niedriger arterieller Sauerstoffpartialdruck und damit eine Gewebehypoxie dar (Car 2000). Die EPO-Genexpression in der Niere erfolgt vermutlich über HIF-1 und HIF-2α, den sog. Hypoxia-inducible factors (Fandrey 2008, Fisher 2003). EPO wird innerhalb von Minuten bis Stunden gebildet und in Knochenmark und Milz transportiert (Car 2000).
Die primären Zielzellen von EPO sind die BFU-E- und v.a. die CFU-E-Zellen, welche die größte Anzahl an EPO-Rezeptoren an ihrer Oberfläche aufweisen (Fisher 2003, Harvey 2008b). Durch die Bindung des EPO am Rezeptor erfolgt die Signaltransduktion über JAKs, RAS und STATs (Fisher 2003) und führt zur Hemmung der Apoptose von neu gebildeten Progenitorzellen und Prorubrizyten, sodass diese sich zu adulten Erythrozyten differenzieren können (Car 2000, Fisher 2003).
Zusätzlich zum antiapoptotischen Effekt von EPO kann auch durch direkte Zell-zu-Zell-Interaktionen die Erythropoese gesteigert werden, sodass dass ein bis zwei

zusätzliche Zellteilungen zu einer größeren Anzahl an Retikulozyten führen. Die Mechanismen sind noch nicht genau beschrieben (Chasis and Mohandas 2008).
Das Kompartiment der Stammzellen hat wenig Einfluss auf eine gesteigerte Erythropoese. Bei sehr schweren Anämien wurde allerdings eine gesteigerte und bei einer aplastischen Anämie eine verminderte Rate der Differenzierung von Stammzellen in Progenitorzellen beschrieben (Car 2000).

Durch die direkte Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und Interleukinen durch die zentralen Makrophagen erreichen diese hohe Konzentrationen innerhalb der erythroiden Nestern (Chasis and Mohandas 2008) und können steigernd als auch hemmend auf die Erythropoese einwirken.
Einige Zytokine bzw. Hormone wie Thyroxin, Wachstumshormone (Kit ligand, GM-CSF, IL-3, IL-6, IL-11, Insulin-like growth factor-1, Hepatocyte growth factor), Thrombopoetin, Testosteron und Kortikosteroide wirken durch Verstärkung der Vermehrung und Ausreifung der erythroiden Vorläuferzellen synergistisch zu Erythropoetin (Car 2000, Fisher 2003, Villiers 2007).
Desweiteren sind hemmende Faktoren der Erythropoese beschrieben. Dazu gehören z.B. TNFα, IL-1β, IFNγ, TGFβ, MIP-1α und IL-2 (Car 2000, Chasis and Mohandas 2008, Villiers 2007).

Abnormale Erythropoese:
Im Kompartiment der Präkursorzellen (Rubriblasten) entstehen normalerweise 16-32 Retikulozyten aus einem Prorubrizyten. Der Impuls für die Kernausstoßung aus den Normoblasten ist eine bestimmte intrazytoplasmatische Konzentration an Hämoglobin (Harvey 2008b, Villiers 2007). Ist die Hämoglobinsynthese gestört, wie z.B. im Rahmen eines Eisenmangels, verbleibt der Nukleus in der Vorläuferzelle und weitere Zellteilungen können stattfinden. Daraus resultieren mikrozytäre Zellen (Villiers 2007). Der molekulare Mechanismus für dieses Phänomen ist bisher nicht identifiziert (Han *et al* 2001). Bisher ist die Funktion von HRI (Heme-regulated eIF2alpha kinase) erforscht, welches v.a. von erythroiden Zellen exprimiert wird und die Synthese der alpha- und beta-Globuline der RBC-Vorläuferzellen durch die Hemmung des eIF2 (general translation initiation factor) reguliert (siehe Abb. 2.1).
Die Hemmung durch eine Aktivierung von HRI kommt zustande, wenn die intrazelluläre Konzentration von Häm z.B. im Zusammenhang mit einem

Eisenmangel sinkt, sodass eine übermäßige Proteinsynthese für Häm verhindert wird. Die Folge einer übermäßigen Hämsysthese wäre eine hyperchrome, normozytäre Anämie, eine kompensatorische erythroide Hyperplasie und eine beschleunigte Apoptose der späten erythroiden Vorläufer in Knochenmark und Milz. Durch HRI werden diese Folgen verhindert und es entstehen mikrozytäre, hypochrome Erythrozyten, welche besser toleriert werden können.
Bei steigendem Hämgehalt hemmt das Häm durch reversible Bindung die HRI-Kinase-Aktivität, sodass die HRI-Aktivität je nach intrazellulären Häm-Konzentrationen reguliert werden kann.

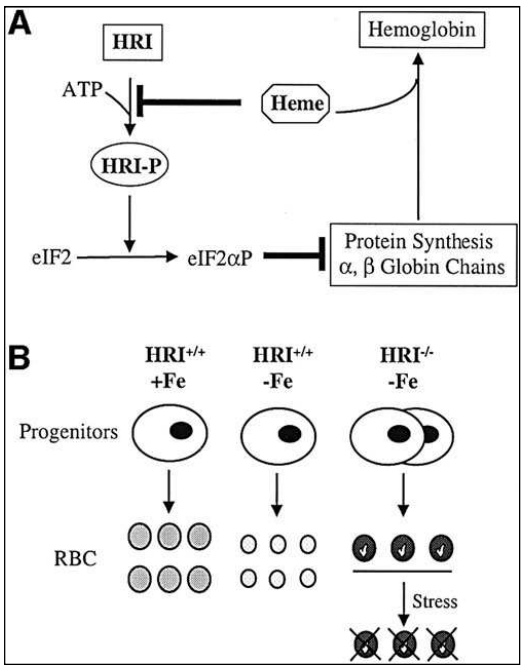


Abbildung 2.1: *Funktion HRI aus Han et al, 2001*

Im Jahr 1964 veröffentlichten Seno und Mitarbeiter die Entstehung einer Makrozytose 3-4 Tage nach Induktion einer akuten Anämie bei Kaninchen. Analog dazu war die Anzahl der Retikulozyten angestiegen, wobei makrozytäre Retikulozyten mit einem höheren Rest-RNA-Gehalt gebildet wurden. Es wurde postuliert, dass durch eine erythropoetischen Stimulation in „Notfallsituationen“ die Denukleation der roten Blutzellen auf der Ebene der polychromatischen Normoblasten stattfindet und nicht wie bei nicht anämischen Tieren bei den orthochromatischen Normoblasten. Dadurch wird die letzte Zellteilung im Knochenmark nicht mehr vollzogen, wodurch makrozytäre Zellen entstehen (Seno *et al* 1964). Heute ist bekannt, dass hohe Konzentrationen von Erythropoetin den

Eintritt eines Rubriblasten in die erste mitotische Teilung beschleunigen können, sodass die Reifungszeit im Knochenmark verkürzt wird und sie als „Stress-Retikulozyten“ früher aus dem Knochenmark freigesetzt werden (Harvey 2008b).

In der Humanmedizin ist eine Vielzahl von Medikamenten bekannt, die eine Makrozytose der Erythrozyten verursachen: U.a. sind antiretrovirale und antiepileptische Medikamente, Immunsuppressiva, Psychopharmaka und Medikamente zur Krebsbehandlung beschrieben (Aslan *et al* 2008, Kaferle and Strzoda 2009, Kim *et al* 1998, Romanelli *et al* 2002, Schallier *et al* 2009, Tsivkin *et al* 2005). Schallier und Mitarbeiter beschreiben die Hemmung des c-KIT abhängigen Signalweges der erythroiden Progenitorzellen des Knochenmarks und andere noch unbekannte Signaltransduktionswege als Ursache der Makrozytose durch Tyrosin-Kinase-Inhibitoren zur Krebsbehandlung (Schallier *et al* 2009).

Außerdem haben Infektionen mit FeLV, FIV und Mykobakterien Einfluss auf die Anzahl der Zellteilungen (Jordan *et al* 1994, Shelton *et al* 1990) und auch Erkrankungen des Knochenmarks wie beispielsweise eine Myelofibrose oder eine Dysmyelopoese (Weiss 2006b, Weiss and Smith 2002) können zu einer Makrozytose führen.

2.2 Klassifikation von Anämien

Eine Anämie ist definiert als ein Abfall der Erythrozytenmasse, was sich in einer Abnahme der Anzahl der zirkulierenden Erythrozyten, des Hämatokrits und des Hämoglobins zeigt (Giger 2005).

Üblicherweise werden Anämien nach einem der folgenden drei Schemata eingeteilt, die je nach Fragestellung ihre Vor- und Nachteile haben (Stockham and Scott 2008):

1) Klassifikation nach der Knochenmarkansprechbarkeit
2) Morphologische Klassifikation
3) Pathophysiologische Klassifikation

2.2.1 Klassifikation nach der Knochenmarkansprechbarkeit

Bei dieser Klassifikation wird festgestellt, ob eine Anämie regenerativ ist und Retikulozyten vorhanden sind oder ob eine nicht regenerative Anämie vorliegt.

Eine regenerative Anämie kann z.B. durch Blutverlust oder Hämolyse entstehen. Das Knochenmark ist durch die Bildung einer neuen Erythrozytengeneration in der Lage, die verlorenen oder zerstörten Erythrozyten zu ersetzen (Tvedten and Weiss 2000).
Bei einer nicht regenerativen Anämie kann das Knochenmark keine oder eine verminderte Anzahl an Retikulozyten bilden. Als Ursache kommt eine primäre oder sekundäre Knochenmarkserkrankung in Frage, bei der es z.B. zu einer Zerstörung der Erythrozyten-Vorläuferzellen kommt (Stockham and Scott 2008).

2.2.2 Morphologische Klassifikation:

2.2.2.1 Wintrobe-Indizes

Die morphologische Klassifikation basiert auf den Wintrobe-Indizes MCV, MCH und MCHC.

<u>MCV (Mean corpuscular volume, mittleres Erythrozytenvolumen)</u>
Das mittlere Volumen eines einzelnen Erythrozyten wird in Femtolitern (fl) angegeben und wird wie folgt errechnet:

$$\text{MCV (fl)} = \frac{\text{Hämatokrit (\%) x 10}}{\text{Erythrozytenzahl (10^12/l)}}$$

Ein erhöhter MCV deutet auf makrozytäre, ein erniedrigter MCV auf mikrozytäre Erythrozyten hin.

<u>MCH (Mean corpuscular hemoglobin, mittlerer Hämoglobingehalt der Einzel-erythrozyten)</u>

Die mittlere Hämoglobinkonzentration pro Erythrozyt wird in Femtomol (fmol) angegeben und ist weniger akkurat als MCHC oder MCV, da sie aus den weniger exakten Messungen der Hämoglobinkonzentration und der Erythrozytenzahl folgendermaßen berechnet wird:

$$\text{MCH (fmol)} = \frac{\text{Hämoglobin (mmol/l) x 10}}{\text{Erythrozytenzahl (10^12/l)}}$$

<u>MCHC (Mean corpuscular hemoglobin concentration, mittlere Hämoglobin-konzentration der Erythrozyten)</u>

Die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration gibt das Hämoglobingewicht pro 100 ml Erythrozyten an und wird nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{MCHC (mmol/l)} = \frac{\text{Hämoglobin (mmol/l) x 100}}{\text{Hämatokrit (\%)}}$$

Zellen mit einer erniedrigten Hämoglobinkonzentration werden als hypochrom bezeichnet.

Erhöhte MCHC-Werte durch hyperchrome Erythrozytenwerte zu erreichen, ist physiologischerweise nicht möglich, weil die Hämoglobin-Synthese in einem Erythrozyten-Vorläufer gestoppt wird, wenn eine optimale Hämoglobinkonzentration im Zytoplasma erreicht ist.

Artifiziell erhöhte MCHC-Werte können durch eine Hämoglobinämie auftreten, wobei sowohl das Hämoglobin der Erythrozyten als auch das freie Hämoglobin im Plasma gemessen wird. Durch die Entstehung von spektralen Interferenzen können

Lipidtröpfchen in lipämischen Proben, Farbpigmente in ikterischen Proben, Kerne oder intakte Leukozyten in Proben mit extremer Leukozytose oder Heinzkörperchen durch eine inkomplette erythrozytäre Lyse zu falsch hohen MCHC-Werten führen.
In seltenen Fällen können Exzentrozyten, Pyknozyten und Sphärozyten durch einen Verlust an Zellvolumen ohne entsprechenden Hämoglobinverlust einen tatsächlich zu hohen MCHC bilden (Stockham and Scott 2008).

Die Bewertung der Wintrobe-Indizes sollte durch die Beurteilung der Erythrozyten auf einem gefärbten Blutausstrich abgesichert werden. Da es sich bei den Wintrobe-Indizes um Mittelwerte der Erythrozytenpopulation handelt, ist die Beurteilung der Zellen auf einem Ausstrich sensitiver, um makrozytäre, mikrozytäre oder hypochrome Zellen zu erkennen.

2.2.2.2 Normozytär-normochrome Morphologie

Im Blutausstrich sind kaum morphologische Abnormalitäten nachweisbar. Die meisten Anämien beginnen als normozytär-normochrome Anämie, da aufgrund der Knochenmarkdurchlaufzeit von 3-4 Tagen eine Regeneration nicht von Anfang an wahrnehmbar ist. Eine persistierende normozytär-normochrome Anämie ist i.d.R. nicht regenerativ (Stockham and Scott 2008).

2.2.2.3 Normozytär-hypochrome Morphologie

Eine rein normozytär-hypochrome Erythrozytenveränderung ist ein ungewöhnlicher Befund (Stockham and Scott 2008).

2.2.2.4 Makrozytär-hypochrome Morphologie

Unreife Erythrozyten im Rahmen einer Regeneration sind größer als reife Erythrozyten und hypochrom, da ihre Hämoglobinsynthese noch nicht abgeschlossen ist (Weiss and Tvedten 2006). Makrozytär-hypochrome Zellen repräsentieren daher i.d.R. einen regenerativen Prozess, wie z.B. bei Blutverlust oder Hämolysen (Stockham and Scott 2008).

2.2.2.5 Makrozytär-normochrome Morphologie

Eine makrozytär-normochrome Anämie ist wie eine makrozytär-hypochrome Form bei einer Regeneration als Antwort auf Blutungen oder Hämolysen üblich. In einigen Fällen sprechen makrozytär-normochrome Erythrozyten aber auch für eine defekte erythroide Ausreifung (Stockham and Scott 2008).

a) Felines Leukämievirus (FELV)

Bei der Katze weist eine makrozytäre, normochrome Anämie mit MCV-Werten über 50 fl ohne Retikulozytose auf eine FeLV-Infektion oder Myelodysplasie hin (Christopher 2000, Weiss and Tvedten 2006). FeLV-infizierte Katzen können eine gestörte Ausreifung der Erythrozyten haben, was zur Ausbildung von megaloblastischen Zellen mit defekter DNA-Synthese und somit zu einer verminderten Mitose im Knochenmark führt (Christopher 2000, Linenberger and Abkowitz 1995, Stockham and Scott 2008). Die megaloblastischen Zellen reifen zu Makrozyten (Stockham and Scott 2008) und können als makrozytäre Erythrozyten im peripheren Blut nachgewiesen werden (Raskin and Krehbiel 1985, Yates *et al* 1984). Diese ineffektive Hämotopoese wird als FeLV-induziertes myelodysplastisches Syndrom angesehen (Grondin *et al* 2006, Linenberger and Abkowitz 1995). Die erythroide Makrozytose kommt bei anämischen und nicht anämischen Katzen vor, die natürlicherweise mit FeLV infiziert sind (Carmichael *et al* 2002, Weiser and Kociba 1983a). Sie persistiert über Monate nach einer regenerativen Antwort auf eine Anämie (Weiser and Kociba 1982). Da die Makrozytose bei natürlich infizierten Tieren deutlicher ausfällt als bei experimentell infizierten Katzen, sehen mehrere Autoren die Entstehung der Makrozytose bei FeLV-infizierten Katzen nicht nur als erythroide Hypoplasie, sondern auch als ein Ergebnis der Knochenmarkantwort auf eine milde Hämolyse oder einer regenerativen Anämie, die als Ursache eine Koinfektion mit Mykoplasmen bzw. einer regenerativen Anämie anderer Ursache vorkommen könnte (George *et al* 2002, Harrus *et al* 2002, Weiser and Kociba 1983a). Bobade und Mitarbeiter fanden ebenfalls eine hohe Inzidenz einer makrozytär-normochromen Anämie bei Katzen mit gleichzeitiger Mykoplasma hämofelis- und FeLV-Infektion, was für einen synergistischen Effekt in der Pathogenese der beiden Infektionen spricht (Bobade *et al* 1988). Katzen mit einer FeLV-Infektion haben ein höheres Risiko mit Mykoplasmen infiziert zu werden (Bobade *et al* 1988). Infektionen

mit hämotrophen Mykoplasmen können eventuell außerdem myeloproliferative Erkrankungen bei FeLV-infizierten Katzen induzieren, welche sich in der Erholungsphase einer akuten Erkrankung zeigten (George *et al* 2002).

b) FOLSÄURE- UND COBALAMIN-MANGEL

Beim Menschen verursacht ein Folsäure- und Vitamin B_{12}-Mangel eine megaloblastische Anämie, die durch eine unzureichende DNA-Synthese und ausgeprägte morphologische Veränderungen im Blut und im Knochenmark charakterisiert ist. Vitamin B_{12} und Folsäure sind Coenzyme, die für die Synthese von Thymidin, einer der vier Basen in der DNA, benötigt wird. Durch einen Mangel kommt es zu einer fehlerhaften Zellkernreifung durch gestörte oder mangelhafte DNA-Synthese und zu einer Verzögerung der Zellteilung. Die erythroiden Vorläufer und Erythrozyten sind dadurch abnormal groß (Harvey 2008b).

Beim Hund kommt eine Makrozytose in Kombination mit einem Cobalamin-Mangel selten vor (Watson and Canfield 2000). Dementsprechend fanden Bunch und Mitarbeiter bei Hunden mit einem durch Phenytoin induzierten Folsäure-Mangel keine makrozytären Erythrozyten (Bunch *et al* 1990).

Beim Riesenschnauzer gibt es eine selektive Vitamin B_{12}-Malabsorption, welcher in einer normozytär-normochromen, aber auch selten in einer makrozytären Anämie resultiert (Fyfe 1989). Fyfe und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass es sich um einen autosomal rezessiven Erbgang handelt und ein Defekt im Cobalaminrezeptor der Enterozyten im Ileum vorliegt. Die hämatologischen Effekte des Cobalaminmangels dieser Hunde sind vergleichbar mit dem megaloblastischen Knochenmark beim Menschen. Allerdings haben die myeloischen Zellen mehr megaloblastische Veränderungen als die erythroiden Zellen. Bei den betroffenen Hunden ist eine geringere Anzahl an makrozytären Erythrozyten im peripheren Blut als beim Menschen zu finden, was sich allerdings durch das gleichzeitige Vorhandensein von mikrozytären Erythrozyten nicht in den Wintrobe-Indizes zeigt (Fyfe *et al* 1991). Bei einigen Tieren mit einem Cobalamin-Mangel durch gastrointestinale Erkankungen sind ebenfalls makrozytäre Erythrozyten nachweisbar (Simpson *et al* 2001).

Desweiteren gibt es einen Fallbericht über eine makrozytäre Anämie mit Dyserythropoese bei einer Katze mit Folsäuremangel (Myers and Giger 1995).

c) MAKROZYTOSE DES PUDELS

Die Makrozytose des Pudels ist in jedem Alter und sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Tieren beschrieben. Es besteht kein Zusammenhang mit anderen Krankheitssymptomen und die meisten Tiere zeigen keine klinischen Beschwerden. Im Blut sind die meisten Erythrozyten makrozytär ohne das Vorhandensein einer Anämie und es ist eine geringgradige Anisozytose und Polychromasie nachweisbar. Im Knochenmark finden sich viele abnormale erythroide Zellen, Megaloblasten, viele Mitosen mit z.T. abnormalen Mitosen (wie z.B. inkomplette Chromosomenkondensation) und es kommt zu einer frühzeitigen Kernausstoßung. In der ultrastrukturellen Knochenmarksanalyse fallen zusätzlich inkomplette Kernmembranen auf. Beim Pudel ist es bislang unklar, ob eine angeborene dyserythropoetische Abnormalität oder eine echte megaloblastische Erkrankung vorliegt (Canfield and Watson 1989).

d) GREYHOUND

Greyhounds haben signifikant höhere Hämoglobinkonzentrationen, einen höheren MCV sowie niedrigere Thrombozytenzahlen als Hunde anderer Rassen. Desweiteren wurde eine verkürzte Lebenszeit der Erythrozyten beim Greyhound nachgewiesen, wodurch die Autoren die Makrozytose durch ein jüngeres Durchschnittsalter der roten Blutzellen vermuten. Allerdings wäre auch ein von der Lebensdauer der Erythrozyten unabhängiger Mechanismus wie Veränderungen in der Erythrozyten-Membran als Ursache der Makrozytose denkbar, die zu einem vorzeitigen Abbau der Zellen führen (Novinger *et al* 1996, Shiel *et al* 2007).

e) ANDERE

Eine Makrozytose kann außerdem durch eine Agglutination der Erythrozyten z.B. bei immunbedingten Erkrankungen vorgetäuscht werden. Dabei entstehen Duplets oder Triplets von Erythrozyten, die vom Hämatologiegerät evtl. als ein großer Erythrozyt gezählt werden.

Eine Zellschwellung durch Lagerung der Blutprobe kann bei gleichzeitig vermindertem MCHC zu einer Makrozytose führen. Außerdem können hyperosmolare Zustände wie z.B. durch eine Hypernatriämie zu erhöhter

intrazellulärer Osmolalität führen, sodass Wasser in die Zellen gezogen wird (Stockham and Scott 2008).
In der ersten Lebenswoche sind makrozytäre Erythrozyten bei Katzenwelpen vorhanden, welche bis zur 5. Lebenswoche nicht mehr nachzuweisen sind. In einer Studie von Weiser und Kociba wurden die Makrozyten bei einem Teil der Tiere durch normozytär-normochrome Erythrozyten ersetzt, bei anderen Welpen traten mikrozytäre Erythrozyten auf, was durch den Beginn eines Eisenmangels während der Laktationsphase erklärt wurde (Weiser and Kociba 1983b).

2.2.2.6 Mikrozytär-hypochrome/normochrome Morphologie

Eine mikrozytäre Anämie kann durch einen Defekt in der Hämoglobinsynthese entstehen.

a) EISENMANGEL

Der Eisengehalt des Körpers ist abhängig vom Körpergewicht, er beträgt ca. 20-40 mg/kg KGW. Der größte Teil des Eisens (60-70%) befindet sich im Hämoglobin (2 ml Blut enthalten ca. 1 mg Eisen), weitere Anteile sind im Myoglobin und in Enzymen (Cytochrome) enthalten. Eisen wird in seiner reduzierten Form (Fe^{2+}) aus dem Dünndarm resorbiert und im Blut an Transferrin gebunden transportiert. Die Speicherformen von Eisen sind das lösliche Ferritin und das unlösliche Hämosiderin, gespeichert wird es in Milz, Leber und Knochenmark (Andrews and Smith 2000, Harvey 2008a).

Ein Eisenmangel ist der häufigste Grund für eine mikrozytäre Anämie bei Tieren (Laflamme *et al* 1994).
Eine Eisenmangel-Anämie kann aus einem chronischen Blutverlust resultieren, welcher zu einem Verbrauch der Eisenspeicher führen und dadurch das Knochenmark nicht in ausreichendem Maße roten Blutzellen produzieren kann.
Eine Hypochromasie entsteht, weil nicht genügend Eisen zum Einbau in das Häm-Molekül zur Hämoglobinsynthese vorhanden ist. Da das Signal für die Kernausstoßung erst bei einer bestimmten Hämoglobinkonzentration erfolgt, werden erythroide Vorläuferzellen zusätzlichen Teilungen unterworfen, um eine möglichst optimale Hämoglobinkonzentration im Zytoplasma zu erreichen. Dadurch entstehen

mikrozytäre Zellen (mikrozytär-normochrome Anämie). Liegt ein schwerer Eisenmangel vor, ist das Erreichen der idealen Hämoglobinkonzentration eventuell gar nicht möglich, sodass dann hypochrome Zellen gebildet werden (mikozytär-hypochrome Anämie) (Harvey 2008a, Stockham and Scott 2008).
Im Gegensatz zum Menschen kann bei einer Eisenmangelanämie der Haustiere eine Retikulozytose vorliegen (Giger 2005). In fortgeschrittenem Stadium, wenn mikrozytär-hypochrome Erythrozyten entstehen, wird die Anämie i.d.R. nicht regenerativ (Weiss and Tvedten 2006)

b) SIDEROBLASTISCHE ANÄMIE

Die sideroblastische Anämie ist durch eine chronische hypochrome, z.T. mikrozytäre Anämie und das Vorhandensein von großen Eisenablagerungen in den erythroiden Zellen charakterisiert. Die Anämie ist mittel- bis hochgradig, nicht regenerativ und geht mit Dysplasien vor allem der erythroiden Reihe einher. In den meisten Fällen ist die sideroblastische Anämie mit entzündlichen Erkrankungen wie akuter Hepatitis, Pankreatitis, Sepsis, Glomerulonephritis und Myelofibrose vergesellschaftet. Sie wird aber auch als idiopathische Form im Zusammenhang mit einem myelodysplastischen Syndrom beschrieben.
Diese Form der Anämie kommt selten vor und muss von der Eisenmangel-Anämie abgegrenzt werden (Weiss 2005d).

c) LEBERFUNKTIONSSTÖRUNG

Portosystemischer Shunt:
60-100% aller Hunde mit einem portosystemischen Shunt zeigen eine Mikrozytose im peripheren Blut, meist mit einem erniedrigten MCHC, mit oder ohne das gleichzeitige Vorhandensein einer Anämie (Bunch *et al* 1995, Bunch 1992, Ferrell *et al* 2003, Laflamme *et al* 1994, Levy and Bunch 1992, Meyer and Harvey 1994). Levy und Mitarbeiter fanden bei 36% der Katzen mit kongenitalem portosystemischem Shunt eine Mikrozytose (Levy and Bunch 1992) .
Die diskutierten pathophysiologischen Mechanismen der Mikrozytose beim portosystemischen Shunt beinhalten eine reduzierte Hämoglobinsynthese und einen

Eisenmangel (Bunch *et al* 1995), der durch chronischen Blutverlust oder schlechte Eisenabsorption und einen Verbrauch zu erklären ist (Laflamme *et al* 1994).
Ein absoluter Eisenmangel als Ursache der Mikrozytose ist unwahrscheinlich (Laflamme *et al* 1994), ein veränderter Eisenstoffwechsel scheint aber vorhanden zu sein. Mehrere Autoren sehen einen relativen Eisenmangel mit reduzierter Verfügbarkeit von Eisen für die Erythropoese in Zusammenhang mit einem veränderten Eisentransportmechanismus als Ursache für die mikrozytären Erythrozyten bei Lebershunt-Hunden an (Bunch *et al* 1995, Meyer and Harvey 1994, Simpson *et al* 1997). Dieser funktionelle Eisenmangel geht mit einer erhöhten Eisenkonzentration in der Leber, aber normalerweise einer niedrigen Konzentration im Serum, einer normalen totalen Eisenbindungskapazität und einer niedrigen prozentualen Eisensättigung einher (Meyer and Harvey 1994).
Laflamme und Mitarbeiter fanden heraus, dass entsprechende Veränderungen der Erythrozyten und des Eisenstatus auch durch eine chirurgische Induktion eines Lebershunts hervorzurufen ist. Das schnelle Auftreten der Mikrozytose zwei Wochen nach Induktion des Shunts lässt vermuten, dass eine Veränderung der zirkulierenden Erythrozyten einen Beitrag zu den hämatologischen Veränderungen geleistet hat (Laflamme *et al* 1994). Meyer und Harvey sehen den veränderten portalen Blutfluss in der Leber in direktem oder indirektem Zusammenhang mit der Speicherung und der Freisetzung des Eisens aus der Leber (Meyer and Harvey 1994).
Aufgrund der Normalisierung des Eisenstatus und der hämatologischen Veränderungen nach entsprechender Therapie, ist davon auszugehen, dass diese Abweichungen als direkte Konsequenz des portosystemischen Shunt zu sehen sind (Simpson *et al* 1997).

Leberinsuffizienz:
Rutgers und Mitarbeiter beschreiben das Auftreten von mikrozytären Erythrozyten bei Hunden mit einer idiopathischen Leberfibrose in ähnlicher Häufigkeit wie bei Hunden mit einem portosystemischen Shunt (Rutgers *et al* 1993). Auch hier ist die Ursache nicht geklärt, diskutiert wird eine Abnormalität in der Fettzusammensetzung der Erythrozytenmembran, die durch den veränderten Fettstoffwechsel in der Leber zustande kommen könnte (Rutgers *et al* 1993).
Bei der Kupferspeicherkrankheit des Bedlington Terriers handelt es sich um eine autosomal rezessive Erkrankung, bei der die biliäre Ausscheidung nicht funktioniert

und sich dadurch Kupfer in der Leber anreichert und diese schädigt. Durch eine zu starke Restriktion an Kupfer in der diätetischen Therapie kann es in Einzelfällen zu einer Leberinsuffizienz mit Entstehung einer nicht regenerativen, mikrozytär hypochromen Anämie ungeklärter Ursache kommen (Seguin and Bunch 2001).

d) DYSERYTHROPOESE DES ENGLISH SPRINGER SPANIELS

1991 beschrieben Holland und Mitarbeiter eine polysystemische Erkrankung bei drei verwandten English Springer Spaniels, die mit einer mittelgradigen Dyserythropoese und Anämie, einer Polymyopathie mit Megaösophagus und verschiedenen Graden einer Kardiomegalie einhergingen. Die betroffenen Tiere zeigten eine mittelgradige, deutlich mikrozytär-normochrome Anämie mit starken Abweichungen der Erythrozytenmorphologie (Mikrozyten, Sphärozyten, Kodozyten, vakuolisierte Erythrozyten). Außerdem war eine deutliche Normoblastämie ohne starke Retikulozytose nachweisbar. Damit hat die Anämie bei betroffenen English Springer Spaniels morphologische Ähnlichkeit mit der HCDA (human congenital dyserythropoietic anemia). Die Veränderungen im Knochenmark mit Doppelkernigkeit, atypischen Mitosefiguren, Kernfragmentation und degenerierten erythroide Zellen passen zu einem Defekt in der DNA-Synthese und -Replikation und ähneln den Knochenmarksbefunden bei Pudeln mit „Pudel- Makrozytose“ (Holland *et al* 1991).

e) AKITA UND SHIBA INU

Bei der Rasse Akita Inu ist das gehäufte Vorkommen einer Mikrozytose ohne gleichzeitige Anämie und ohne klinische Relevanz beschrieben (Degen 1987). In einer Studie von 1998 wurden 18 Shiba Inus auf das Vorkommen einer Mikrozytose untersucht. Dabei konnte bei 2/3 der Hunde beiden Geschlechts ebenfalls eine Mikrozytose nachgewiesen werden. Da beide Rassen einen japanischen Ursprung haben, ist von einer erblichen Ursache für die Mikrozytose auszugehen (Gookin *et al* 1998). Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt. Allerdings ist eine weitere Abnormalität der Erythrozyten bei Akitas und Shibas beschrieben: Diese verfügen über eine hohe Natrium-Kalium-ATPase-Aktivität, sodass es zu hohen intrazellulären Kalium- und niedrigen Natriumkonzentrationen kommen kann. In vitro kann es durch

einen Austritt von Kalium aus den Erythrozyten zu einer Pseudohyperkaliämie kommen (Degen 1987, Maede *et al* 1991). Ein Zusammenhang der Pseudohyperkaliämie mit der Mikrozytose konnte bislang nicht hergestellt werden (Degen 1987).

2.2.3 Pathophysiologische Klassifikation

Übersicht modifiziert nach Stockham und Scott (Stockham and Scott 2008)

2.2.3.1 BLUTUNGSANÄMIE

2.2.3.2 HÄMOLYSE

2.2.3.2.1 Immunhämolyse

2.2.3.2.2 Erythrozytendefekte und Hämolysen durch erhöhte osmotische Fragilität

a) Phosphofruktokinase-Mangel

b) Pyruvatkinase-Mangel

c) Hämolyse bei Abessiniern und Somali-Katzen

d) Stomatozytose

e) Cytochrom b5-Reduktase-Mangel

2.2.3.2.3 Infektiös

2.2.3.2.4 Andere

a) Heinzkörperchen

b) Ekzentrozyten

c) Hypophosphatämie

d) Zink

e) Mikroangiopathische Hämolyse

f) Hämolysine

2.2.3.3 NICHT REGENERATIVE ANÄMIE

2.2.3.3.1 Entzündliche Erkrankungen

2.2.3.3.2 Chronische Nierenerkrankungen

2.2.3.3.3 Knochenmarkshypoplasie oder -aplasie

a) Myelitis

b) Toxisch

c) Strahlung

d) Marrow replacement: Neoplasie, Myelofibrose, Osteopetrose

2.2.3.3.4 Erythroide Hypoplasie oder ineffektive Erythropoese

a) Pure red cell aplasia

b) FeLV-induzierte erythroide Hypoplasie

c) Ernährungsbedingt

d) Endokrin

e) Leberinsuffizienz

2.2.3.1 Blutungsanämie

Ein Blutverlust entsteht durch Blutungen, die durch das Zerstören von Blutgefäßen durch z.B. Neoplasien, Traumata, Operationen oder Ulzera hervorgerufen werden. Außerdem kommen erworbene oder kongenitale Gerinnungsstörungen, ein v.-Willebrandfaktor-Mangel sowie Thrombozytopenien in Frage.
Zusätzlich können Parasiten wie Hakenwürmer oder Peitschenwürmer, Kokzidien, Zecken, Flöhe und Fliegen zu einem Blutverlust führen (Giger 2005, Stockham and Scott 2008).

Akute Blutungsanämie:

Eine akute Blutungsanämie entsteht beim Verlust von Blut aus den Blutgefäßen innerhalb von einigen Stunden. Direkt nach dem Blutverlust ändern sich der Hämatokritwert und die Blutplasmakonzentration des Totalproteins nicht, da Erythrozyten und Plasma im gleichen Verhältnis verloren gehen; nur das Blutvolumen ist vermindert. Durch diese Hypovolämie wird Volumen vom extrazellulären Raum in den intrazellulären Raum umverteilt, um den Volumenmangel auszugleichen. Durch diese Verdünnung der Erythrozyten und des Plasmaproteins entsteht eine Anämie und Hypoproteinämie (Moritz *et al* 2006, Stockham and Scott 2008).
In den ersten Stunden entlässt die Milz durch Kontraktion die gespeicherten Erythrozyten in die Zirkulation, was den Schweregrad der Anämie verschleiern kann (Weiss and Tvedten 2006).
Der Blutverlust kann ins Körperinnere (Hämothorax, Hämaskos, Hämoperikard) oder nach außen (über die Haut, Magen-Darm-Trakt, Urogenitaltrakt) erfolgen. Eine plötzliche Anämie verursacht eine Gewebehypoxie, die die Produktion von Erythropoetin stimuliert. Bei funktionierendem Knochenmark sollte 3-4 Tage (Knochenmarkdurchlaufzeit) nach initialem Blutverlust eine Retikulozytose im peripheren Blut zu sehen sein (Giger 2005, Moritz *et al* 2006, Stockham and Scott 2008). Die häufigsten Ursachen für eine akute Blutung sind Traumata, chirurgische Eingriffe, Rodentizid-Intoxikationen, Thrombozytopenien und eine DIC (Squires 1993).

Chronische Blutungsanämie:

Ein chronischer Blutverlust über mehrere Wochen oder Monate führt zu einer Eisenmangel-Anämie.

Zu Beginn der Erkrankung steht ein kontinuierlicher Verlust von kleinen Blutmengen über einen längeren Zeitraum. Es entwickelt sich zunächst noch keine Anämie, solange der gesteigerten Erythropoese noch gespeichertes Eisen zur Bildung von neuen Erythrozyten zu Verfügung steht. Wenn die Eisenspeicher aufgebraucht sind, entwickelt sich ein Eisenmangel, der zu einer insuffizienten Erythropoese führt. Nicht alle der verlorenen Erythrozyten können adäquat ersetzt werden und es entwickelt sich eine Anämie. Induziert durch den Eisenmangel kommt es zu einer fehlerhaften Hämoglobinsynthese und dadurch zu mikrozytären und hypochromen Erythrozyten (Stockham and Scott 2008).

Ursachen für chronischen Blutverlust bei erwachsenen Tieren sind in der Regel gastrointestinale Blutungen durch z.B. Ulzera oder Neoplasien, Methropathien, chronische Urogenitalblutungen und Hämophilien (Marchetti *et al* 2005, Moritz *et al* 2006, Squires 1993, Weiss 2006a). Aber auch im Rahmen einer schweren IBD (Inflammatory Bowel Disease) kann bei Hunden eine mikrozytär-hypochrome Anämie entstehen (Ristic and Stidworthy 2002).

Bei Jungtieren oder bei einem enormen Befall bei adulten Tieren können Fliegen, Flöhe oder Hakenwürmer ebenfalls zu langanhaltenden Blutungen mit Eisenmangel führen. Da Milch einen niedrigen Eisengehalt aufweist, können säugende Welpen leicht einen Eisenmangel entwickeln (Aldavood *et al* 2006). Allerdings ist der Nachweis des Eisenmangels meist nicht durch ein erniedrigtes MCV möglich, weil die hohen MCV-Werte von Welpen nach der Geburt durch fetale Makrozyten die Mikrozytose verschleiern können (Harvey 2008a, Squires 1993, Weiser and Kociba 1983b). Aufgrund der geringeren Eisenreserven und durch einen hohen Eisenverbrauch im Wachstum kommt es bei Jungtieren durch Blutungen schneller zur Erschöpfung der Eisenvorräte (Weiss and Tvedten 2006).

Innere Blutungen führen nicht zu einem Eisenmangel, weil die Erythrozyten entweder als intakte Zellen wieder in den Blutstrom aufgenommen werden oder das Hämoglobin bei einer Zerstörung der Zellen recycled wird (Squires 1993).

2.2.3.2 Hämolytische Anämie

Eine Hämolyse ist definiert als die Auflösung von Erythrozyten infolge Zerstörung ihrer Zellmembran. Im pathologischen Sinn hat dies eine verkürzte Lebensdauer der Erythrozyten zur Folge (Pschyrembel 2007). Der Grad der Anämie hängt von der Balance zwischen der Zerstörungsrate roter Blutzellen und der Rate der Knochenmarksantwort zur Ersetzung der zerstörten Erythrozyten ab (Jones and Gruffydd-Jones 1991).

Eine Hämolyse kann intravaskulär oder extravaskulär erfolgen. Bei der intravaskulären Hämolyse werden Erythrozyten im Blut innerhalb des Blutgefäßes oder im Herzen zerstört (Squires 1993). Sichtbar wird diese Form der Hämolyse durch eine Hämoglobinämie mit nachfolgender Hämoglobinurie (Stockham and Scott 2008).

Bei der wesenlich häufigeren extravaskulären Hämolyse findet die Erythrozytenzerstörung außerhalb des Blutsystems in Makrophagen nahe der venösen Sinusoide von Milz, Leber und Knochenmark statt, weshalb diese Form der Hämolyse auch intrazelluläre Hämolyse genannt wird (Stockham and Scott 2008, Weiss and Tvedten 2006). Die Milzmakrophagen haben in der roten Pulpa den größten Kontakt zu den Erythrozyten. Hierbei kommt es nicht zu einer Hämoglobinämie und Hämoglobinurie, da das Hämoglobin nicht in den Kreislauf gelangt, sondern zu Bilirubin verstoffwechselt wird (Balch and Mackin 2007a, Stockham and Scott 2008).

Die intravasale Hämolyse wird oft von schwerwiegenderen, lebensbedrohlichen Erkrankungen ausgelöst und hat somit meist eine schlechtere Prognose (Stockham and Scott 2008).

Ein Ikterus kann sowohl bei einer intra- als auch bei einer extravasalen Hämolyse auftreten (Weiss and Tvedten 2006). Durch die Zerstörung der Erythrozyten entsteht vermehrt unkonjugiertes Bilirubin. Durch die hohe Menge an Bilirubin und durch Hypoxie und Toxine entstandene Leberschädigungen kann die Reservekapazität der Leber zum Bilirubinabbau überschritten werden. Durch die schnellere Hämolyserate ist die Bilirubinkonzentration bei einer intravasalen Hämolyse häufig höher als bei einer extravasalen Form (Weiss and Tvedten 2006).

2.2.3.2.1 Immunhämolyse

Die immunvermittelte Anämie (IMHA = immune-mediated hemolytic anemia) ist bei Hunden und Katzen die häufigste nicht-traumatische Anämieform (Balch and Mackin 2007a, Squires 1993). Aus diesem Grund soll sie hier ausführlich besprochen werden.

Die IMHA kommt bei Hunden häufiger vor als bei Katzen (Balch and Mackin 2007a, Kohn *et al* 2006). Beim Hund ist für die Rassen Cocker Spaniel, English Springer Spaniel, Pudel, Old English Sheepdog, Irish Setter und Collie eine Prädisposition für die primäre IMHA beschrieben (Balch and Mackin 2007a, Burgess *et al* 2000, Carr *et al* 2002, Mason *et al* 2003, McManus and Craig 2001, Miller *et al* 2004, Weinkle *et al* 2005). In den meisten Studien sind mehr Hündinnen als Rüden von einer IMHA betroffen (Burgess *et al* 2000, Carr *et al* 2002, Mason *et al* 2003, Miller *et al* 2004). Im Gegensatz dazu weisen Kohn und Mitarbeiter eine Überrepräsentation von männlichen Katzen nach (Kohn *et al* 2006). Das durchschnittliche Alter bei Hunden beträgt etwa 6 Jahre, es sind aber Fälle zwischen einem Jahr und 13 Jahren beschrieben (Balch and Mackin 2007a, Carr *et al* 2002, McManus and Craig 2001, Weinkle *et al* 2005). Katzen scheinen mit einem durchschnittlichen Alter von 2 Jahren jünger zu sein als betroffene Hunde (Kohn *et al* 2006).

Diagnostisch hinweisend ist das Vorliegen von Sphärozyten (94%), eine Erythrozytenagglutination (42%), ein positiver direkter Coombs-Test (77%) sowie keine nachweisbare andere Ursache für eine hämolytische Anämie (Carr *et al* 2002, Piek *et al* 2008). Aufgrund einer Sensitivität des Coombs-Tests von 60-89% kann eine IMHA bei einem negativen Test allerdings nicht ausgeschlossen werden (Balch et Mackin, 2007a).

Zusätzlich zu einer Anämie liegen labordiagnostisch typischerweise eine Thrombozytopenie (70% der Hunde) und Hinweise auf eine DIC (32%-58%) vor (Carr *et al* 2002). Eine Leukozytose mit Linksverschiebung ist ebenfalls ein üblicher Befund bei Hunden mit IMHA. Ursächlich werden hierfür eine verstärkte Freisetzung aus dem Knochenmark während einer Erythrozytenregeneration, zytokinstimulierte myeloide Hyperplasie, Demargination von Neutrophilen sowie verminderte Migration in schlecht durchblutete nekrotische Gewebe verantwortlich gemacht (McManus and Craig 2001).

Normalerweise werden gealterte Erythrozyten in der Leber und in der Milz durch das mononukleäre Phagozytosesystem (MPS) abgebaut. Dieses System ist in der Lage, Antikörper, welche sich gegen gealterte Membranantigene richten, zu erkennen und die Zellen aus der Blutbahn zu entfernen (Balch and Mackin 2007a). Die IMHA ist ein pathologischer Prozess, der zu einer frühzeitigen Zerstörung der Erythrozyten führt, indem sich eine Immunantwort direkt oder indirekt gegen rote Blutkörperchen aller Altersstufen richtet (Giger 2005). Antierythrozytäre Antikörper (IgG, IgM und IgA) heften sich an verschiedene Bestandteile der Erythrozytenmembran (Giger 2005), wodurch eine intravaskuläre Hämolyse, eine extravaskuläre Hämolyse, eine Agglutination von Erythrozyten und Sphärozyten entstehen können. Bei der intravaskulären Hämolyse kommt es zu einer ausgeprägten Immunreaktion mit Bindung von vielen Antikörpern an die Erythrozytenmembran, wodurch die Komplementkaskade aktiviert wird. Hierdurch entsteht der sog. „membrane attack complex“ (MAC), der die Zellmembran direkt schädigt. So kann extrazelluläre Flüssigkeit in die Erythrozyten strömen und die Zellen platzen innerhalb der Zirkulation (Giger 2005, Weiss 2005a).
Bei der extravaskulären Hämolyse findet eine weniger starke Immunreaktion mit minimaler komplementvermittelter Zellwandschädigung statt (Giger 2005). Durch die Bindung der Antikörper kommt es zu einem Abbau der betroffenen Erythrozyten durch das MPS außerhalb des Blutkreislaufsystems (Giger 2005, Weiss 2005a).

Die IMHA kommt als primärer Zustand vor, wenn keine zugrunde liegende Ursache für die Anämie gefunden werden kann (Balch and Mackin 2007a, Jones and Gruffydd-Jones 1991). Dabei liegt eine autoimmune Störung vor, bei der Autoantikörper gegen die Membranantigene der eigenen Erythrozyten gebildet werden (Balch and Mackin 2007a). Als Ursache werden ein überstimuliertes Immunsystem oder eine gestörte Funktion der T-Suppressor-Zellen diskutiert, die normalerweise eine Reaktion zwischen Autoantikörpern und körpereigenem Gewebe verhindert (Balch and Mackin 2007a).
Bei der sekundären IMHA reagiert das Immunsystem auf körperfremde Antigene. Erythrozyten können z.B. durch die Infektion mit Erregern oder durch die Besetzung mit fremdem Antigen verändert sein (Balch and Mackin 2007a, Giger 2005). Die sekundäre Form der IMHA kann einhergehen mit Thrombozytopenien, lymphoproliferativen Erkrankungen, Neoplasien (z.B. Lymphom),

Fremdkörpergastritis, chronisch infektiösen Erkrankungen, Blutparasiten (z.B. Babesia spp), bei Katzen mit Felinem Leukämie-Virus (FeLV), Feliner Infektiöser Peritonitis (FIP) oder Infektionen mit Mykoplasmen und anderen immunmediierten Erkrankungen wie dem Systemischen Lupus Erythematosus (Jones and Gruffydd-Jones 1991, Kohn *et al* 2006, Piek *et al* 2008, Squires 1993).
In der Studie von Jones und Gruffydd-Jones wurden 42,9% der Fälle als primäre IMHA und 57,1% als sekundäre IMHA klassifiziert. Die Tiere mit einer primären IMHA wiesen signifikant niedrigere Hämoglobinwerte auf (Jones and Gruffydd-Jones 1991). Außerdem wird ein Zusammenhang zwischen einer kurz zuvor erfolgten Impfung (innerhalb 4 Wochen) und dem Auftreten einer IMHA diskutiert. Durch die Impfung kann die Bildung von Autoantikörpern induziert werden oder es können Makrophagen oder das Immunsystem aktiviert werden, rote Blutkörperchen zu zerstören (Duval and Giger 1996). ¼ der Hunde mit idiopathischer IMHA waren innerhalb eines Monats vor Diagnosestellung geimpft worden, ein direkter Zusammenhang ließ sich allerdings nicht sicher nachweisen (Duval and Giger 1996). In anderen Studien konnte keine Assoziation zwischen Impfung und IMHA erkannt werden (Carr *et al* 2002).
Verschiedene Arzneimittel wie Sulfonamide, Penizilline, Cephalosporine, Levamisol, Insulin, Acetaminophen, Tetrazykline, Phenylbutazon, Chinidin, Chlorpromazin, Propylthiouracil sollen eine IMHA auslösen können (Balch and Mackin 2007a, Kohn *et al* 2006). Je nach Medikament erfolgt eine Bindung des Arzneistoffes an die Erythrozytenmembran mit folgender Schädigung und Abbau durch das MPS oder es wird eine IgM-Antikörperbildung induziert, welche durch die Aktivierung des Komplementsystems zu einer intravasalen Hämolyse führt (Balch and Mackin 2007a).

Das klassische Bild einer IMHA besteht in einer stark regenerativen Anämie infolge einer kompensatorischen erythroiden Hyperplasie im Knochenmark (Jones and Gruffydd-Jones 1991). Ein hoher Prozentsatz von Hunden und Katzen mit IMHA hat zum Zeitpunkt der Diagnose der Erkrankung jedoch keine Retikulozytose (Burgess *et al* 2000, Jones and Gruffydd-Jones 1991, Kohn *et al* 2006, Stokol *et al* 2000, Weinkle *et al* 2005, Weiss 2008). Ein Grund kann eine perakute Anämie sein, in der das Knochenmark 3-4 Tage Zeit für die Bildung von Retikulozyten benötigt (Stockham and Scott 2008). Bei nicht regenerativen Anämien, die länger als 5 Tage bestehen, wird eine Immunreaktion direkt gegen erythroide Vorläuferzellen dafür verantwortlich

gemacht (Kohn *et al* 2006, Stokol *et al* 2000). Betroffene Tiere leiden bei einer erythroiden Aplasie des Knochenmarks an einer pure red cell aplasia PRCA (siehe dort) und im Gegensatz dazu bei einer erythroiden Hyperplasie oder einem Reifungsstopp der erythroiden Reihe im Knochenmark an einer nicht regenerativen Form der IMHA (Stokol *et al* 2000, Weiss 2008). Ein erythroider Reifungsstopp wird mit einer möglichen immunbedingten Zerstörung der erythroiden Vorläuferzellen in verschiedenen Reifungsstufen in Verbindung gebracht (Stokol *et al* 2000).

Mindestens die Hälfte der Hunde und Katzen mit nicht regenerativer Anämie haben im Knochenmark eine PRCA oder einen erythroiden Reifungsstopp (Weiss 2008).

Hunde und Katzen mit nicht regenerativer immunhämolytischer Anämie mit einer erythroiden Hyperplasie im Knochenmark könnten einen getrennten Subtypen der IMHA darstellen (Weiss 2008). Dieser ist charakterisiert durch zusätzliche Neutropenien und Thrombopenien, dem Vorhandensein einer Vielzahl an pathologischen Knochenmarksveränderungen (Dysmyelopoese, Myelonekose, Myelofibrose, veränderte vaskuläre Permeabiliät, akute Entzündung, hämophagozytäres Syndrom) und einer schlechteren Überlebenszeit (60-Tage-Überlebenszeit) im Vergleich zu den anderen nicht regenerativen immunhämolytischen Anämien (Weiss 2008). Alle genannten Veränderungen im Knochenmark können zu einer Suppression der Erythropoese führen. Alle Hunde, bei denen ein hämophagozytäres Syndrom diagnostiziert wurde, starben innerhalb von 35 Tagen nach Diagnosestellung (Weiss 2008).

Bei 86% der Katzen mit IMHA war eine lymphozytäre Hyperplasie im Knochenmark und bei 84% der Hunde war eine plasmazelluläre Hyperplasie im Knochenmark zu finden (Weiss 2008), welche auch in früheren Studien im Rahmen einer immunmediierten Erkrankung nachzuweisen war (Weiss 2005a, Weiss 2006a, Weiss 2006b). Dabei scheinen sowohl die antikörpervermittelte Zerstörung von Knochenmark-Vorläuferzellen (Jones and Gruffydd-Jones 1991, Weiss 2008) als auch andere pathologische Ereignisse im Knochenmark wie stromale Knochenmarkserkrankungen eine Rolle zu spielen, welche zu einer ineffektiven Erythropoese führt (Weiss 2006a, Weiss 2008).

Zu bedenken ist, dass sich durch eine chronische IMHA eine Knochenmarksschädigung und sekundäre Myelofibrose entwickeln kann (Weiss and Aird 2001, Weiss and Smith 2002).

Zusammenfassend muss festgehalten werden, dass bei Fehlen einer Regeneration eine IMHA nicht ausgeschlossen werden kann und bei jeder ungeklärten Anämie die IMHA in Betracht gezogen werden sollte (Jones and Gruffydd-Jones 1991).

Zur Differenzierung zwischen einer primären und einer sekundären IMHA ist intensive Diagnostik inklusive biochemischer Bluttests, Gerinnungszeiten, D-Dimere oder Fibrin(ogen)spaltprodukte zur Diagnostik einer DIC, Untersuchungen auf Infektionserreger im Blut, bildgebende Diagnostik wie Röntgen und Sonographie, zum Nachweis einer pulmonalen Thrombembolie oder von Neoplasien, Knochenmarkuntersuchung bei aregenerativen Fällen notwendig (Balch and Mackin 2007a).
Die Unterscheidung, ob eine Hämolyse immunvermittelt ist oder nicht, kann im Einzelfall sehr schwierig sein. Bei einer Babesiose beispielsweise kann die Hämolyse primär durch die direkte Schädigung der Erythrozyten verursacht werden oder durch eine sekundäre IMHA bedingt sein (Balch and Mackin 2007a).

Therapie:
55-90% aller Patienten mit IMHA benötigen eine oder mehrere Bluttransfusionen oder Oxyglobin, um die Gewebeoxygenierung zu verbessern (Balch and Mackin 2007b, Burgess *et al* 2000, Carr *et al* 2002, Kohn *et al* 2006, Scott-Moncrieff *et al* 2001, Weinkle *et al* 2005). Durch das Vorhandensein einer Autoagglutination kann ein Kreuztest vor einer Bluttransfusion schwierig sein. Nach einer blutgruppenfremden Transfusion werden nach ca. 5 Tagen Antikörper gegen die fremde Blutgruppe gebildet. Daher sollte bei Hunden mit Autoagglutination, die vor mehr als 5 Tagen schon einmal eine Bluttransfusion erhalten haben, DEA 1.1 negatives Blut verwendet werden (Balch and Mackin 2007b).
Die Kurz- und Langzeittherapie beinhaltet die Behandlung mit immunsuppressiven Medikamenten, um die Rate an antikörperbedingter Zerstörung von Erythrozyten zu reduzieren. Hierfür kommen Prednisolon alleine oder in Kombination mit Azathioprin oder Ciclosporin in Frage (Balch and Mackin 2007b, Grundy and Barton 2001). Hierbei stellt das Prednisolon aufgrund seines sofortigen Wirkungseintritts die wichtigste Komponente in der initialen Therapie dar, ist allerdings aufgrund seiner potentiell schweren Nebenwirkungen nicht ideal zur Dauertherapie (Al Ghazlat 2009). Eine Kombinationstherapie sollte vor allem dann gewählt werden, wenn eine

Autoagglutination, eine intravaskuläre Hämolyse, eine nicht regenerative Form der IMHA vorhanden oder der Patient transfusionsabhängig ist (Balch and Mackin 2007b).

Die Therapie mit Cyclophosphamid erreicht je nach Studie keine Verbesserung zur herkömmlichen Therapie oder wird mit einer höheren Mortalitätsrate in Verbindung gebracht, was durch eine supprimierte Erythropoese erklärt wird (Grundy and Barton 2001, Mason *et al* 2003). Aufgrund der potentiellen Nebenwirkungen kann Cyclophosphamid nicht mehr als Therapie der IMHA empfohlen werden (Balch and Mackin 2007b, Mason *et al* 2003).

Bei Tieren, die schlecht auf die Therapie ansprechen gibt es die Möglichkeit einer intravenösen Infusion von humanem Immunglobulin, welches am F_c-Rezeptor von Makrophagen bindet, sodass diese nicht mehr an Antikörper-behaftete Erythrozyten binden können (Balch and Mackin 2007b). Humanes Immunglobulin kann bei wiederholter Gabe anaphylaktische Reaktionen hervorrufen und ist sehr teuer (Al Ghazlat 2009). Des Weiteren wird eine Splenektomie als Therapie der IMHA diskutiert, weil in der Milz der Hauptteil der Erythrozyten vom MPS entfernt wird. Toll und Aronsohn haben eine höhere Überlebensrate bei einer Splenektomie innerhalb der ersten 48 Stunden nach Vorstellung im Vergleich zu reiner Therapie mit Prednisolon und Azathioprin gefunden (Toll and Aronsohn 2003). Allerdings beinhaltet diese Operation auch ein hohes Risiko durch die Narkose und die Gefahr einer bakteriellen Sepsis und einer Infektion mit Blutparasiten ist durch das Fehlen der Milz erhöht (Balch and Mackin 2007b). Al-Ghazlat sieht die Splenektomie als mögliche Therapie sowohl in der Initialphase als auch bei Tieren mit Rezidiv oder nur mäßigem Ansprechen auf initiale Therapie bei schweren Anämien an (Al Ghazlat 2009).

Nach Weinkle und Mitarbeitern kann durch den zusätzlichen Einsatz von Low-Dose-Aspirin (0,5 mg/kg/d) zu Prednisolon und Azathioprin eine höhere Überlebensrate erreicht werden (Weinkle *et al* 2005).

Zur Thromboseprophylaxe wird der Einsatz von Heparin in Form von Standard-Heparin oder Low molecular weight heparin (LMWH) empfohlen (Dunn *et al* 2004, Lunsford *et al* 2005).

Mögliche Therapieansätze wie eine Plasmapherese zum Abfangen von potentiell pathogenen Komponenten im Plasma und neueren immunsuppressiven Medikamenten wie Mycophenolate Mofetil (MMF), Leflunomid und Mizoribin sind

vielversprechend, müssen aber in weiteren Studien für den Einsatz bei der IMHA von Hund und Katze geprüft werden (Al Ghazlat 2009).

Komplikationen:
Hunde mit einer IMHA, die adäquat mit Bluttransfusionen versorgt werden, sterben in der Regel nicht an der Anämie. Die häufigste Komplikation bei Hunden mit IMHA sind Thrombemolien, v.a. Lungenthrombembolien (Carr *et al* 2002, Mason *et al* 2003, McManus and Craig 2001, Weinkle *et al* 2005, Weiss and Brazzell 2006). Bei Tieren mit IMHA treten die durch die Virchow'sche Trias beschriebenen prädisponierenden Faktoren für die Bildung eines Thrombus wie Gefäß-endothelschaden, Stase des Blutflusses und Hyperkoagulabilität regelmäßig auf (Balch and Mackin 2007b, Weiss and Brazzell 2006). Weiss und Brazzell konnten nachweisen, dass die Thrombozyten bei den meisten Hunden mit primärer IMHA in einem aktivierten Zustand zirkulieren (Weiss and Brazzell 2006). Neben Thromben sind immunhämolytische Patienten prädisponiert für eine DIC; 58% der Hunde mit einer IMHA haben DIC-Anzeichen während der Behandlungszeit (Burgess *et al* 2000, Carr *et al* 2002, Scott-Moncrieff *et al* 2001).

Die Prognose für Hunde mit IMHA ist vorsichtig. Ein Ansprechen auf Therapie kann Wochen bis Monate dauern und einige Patienten benötigen ihr Leben lang immunsuppressive Therapie (Balch and Mackin 2007b).
Die Mortalität liegt zwischen 44 und 60% (Burgess *et al* 2000, Carr *et al* 2002, Duval and Giger 1996, Grundy and Barton 2001). Katzen mit IMHA haben mit einer Mortalität von 23% und einer niedrigeren Komplikationsrate wie z.B. der Entwicklung einer DIC oder Thrombembolismus insgesamt eine besser Prognose als Hunde. Die Rezidivrate bei Katzen liegt bei 31% (Kohn *et al* 2006).
Die meisten Tiere sterben innerhalb der ersten 2 Wochen nach Diagnosestellung (Burgess *et al* 2000, Duval and Giger 1996, Piek *et al* 2008). Die häufigste Todesursache scheint eine Thrombembolie zu sein (Carr *et al* 2002, McManus and Craig 2001, Weinkle *et al* 2005), auch wenn dies nicht immer klinisch sichtbar wird. So weisen 80-100% der Tiere mit IMHA in der Sektion Thromben in Leber, Niere, Herz, Lunge, Milz und Lymphknoten auf (Carr *et al* 2002, McManus and Craig 2001, Weinkle *et al* 2005).

Negative prognostische Faktoren sind je nach Studie eine persistierende Autoagglutination (Duval and Giger 1996, Mason *et al* 2003), ein Ikterus bzw. eine Hyperbilirubinämie (Duval and Giger 1996, Mason *et al* 2003, Weinkle *et al* 2005), eine intravasale Hämolyse (Mason *et al* 2003) eine Thrombozytopenie (Carr *et al* 2002, Piek *et al* 2008, Weinkle *et al* 2005), eine erhöhte Harnstoffkonzentration im Plasma (Piek *et al* 2008) und/oder eine Leukozytose (McManus and Craig 2001) mit Linksverschiebung (Piek *et al* 2008).
Piek und Mitarbeiter geben eine Überlebensrate nach einem halben Jahr nach Diagnosestellung von 92,5% an, wenn die Tiere die ersten 2 Wochen überlebt haben (Piek *et al* 2008).
Um die Prognoseabschätzung besser zu objektivieren, wurde von Whelan und Mitarbeitern die Anwendung des canine hemoytic anemia objective score (CHAOS) veröffentlicht (Whelan *et al* 2006).

Neonatale Isoerythrolyse und Transfusionsreaktion:
Bei der neonatalen Isoerythrolyse und bei einer Transfusionsreaktion bei Blutgruppenunverträglichkeit kann eine alloantigene hämolytische Anämie ausgelöst werden. Alloantikörper sind Antikörper eines Individuums, die mit Antigenen eines anderen Indiviuums derselben Art reagieren (Balch and Mackin 2007a).
Die neonatalen Isoerythrolyse entsteht bei Katzenrassen mit Individuen der Blutgruppe B. Welpen aus Würfen mit einer Mutter der Blutgruppe B und einem Vater der Blutgruppe A haben das Risiko einer neonatalen Isoerythrolyse. Diese resultiert aus der Absorption von anti-A Alloantikörpern über das Kolostrum der Typ-B-Katze durch die Welpen mit Blutgruppe A oder AB während des ersten Lebenstages. Dies verursacht die Zerstörung von Typ A oder AB Erythrozyten bei Typ A oder AB Welpen. Die klinischen Symptome einer neonatalen Isoerythrolyse beinhalten Pigmenturie, Anämie, Lethargie bis zum Tod der Tiere (Arikan *et al* 2003, Arikan *et al* 2006, Barrs *et al* 2009, Giger *et al* 1991).
Blutgruppenunverträglichkeiten können zu akuten hämolytischen Transfusionsreaktionen bei Katzen führen, v.a. wenn eine Typ B-Katze mit Typ A-Blut transfundiert wird. Diese Reaktion ist vergesellschaftet mit schweren hämolytischen Anämien, anaphylaktischem Schock bis hin zum Tod der Tiere (Arikan *et al* 2003).

2.2.3.2.2 Erythrozytendefekte und Hämolysen durch erhöhte osmotische Fragilität

Erythrozytenenzymdefekte sind seltene Ursachen für Hämolysen bei Hund und Katze (Harvey 2006).

a) PHOSPHOFRUKTOKINASE-MANGEL

Diese Erkrankung ist inzwischen bei drei Familien des English Springer Spaniels, bei einem American Cocker Spaniel und bei zwei Whippets aus einem Wurf beschrieben (Gerber *et al* 2009, Giger *et al* 1986, Giger *et al* 1992). Die Phosphofruktokinase stellt ein Schlüsselenzym in der Glykolyse dar, sodass bei einem Mangel die betroffenen Muskelzellen und Erythrozyten einen gestörten Energiestoffwechsel besitzen und fragiler werden. Die Krankheit entsteht durch eine Punktmutation am carboxylterminalen Ende des M-Typ PKF Gens (Smith *et al* 1991) und wird durch einen autosomal rezessiven Erbgang an die Nachkommen weiter gegeben (Giger *et al* 1986, Giger *et al* 1992). Die Patienten werden wegen chronischer hämolytischer Anämie und sporadischen intravasalen hämolytischen Krisen tierärztlich vorgestellt (Giger *et al* 1985), einige Tiere sind symptomlos (Giger *et al* 1986). Zwischen den Episoden der Hämolysen erscheinen die Tiere klinisch normal, z.T. erscheint die Skelettmuskelmasse reduziert (Harvey 2006). Die Erythrozyten der betroffenen Tiere zeigen eine schnellere Lyse in alkalischem Medium. Intravasale hämolytische Krisen können durch die Entstehung einer leichten respiratorischen Alkalose bei Hyperventilationen im Rahmen von körperlicher Leistung, erhöhter Umgebungstemperatur oder Atemstimulation ausgelöst werden (Giger *et al* 1985). Durch den Energiemangel kommt es im Erythrozyten zu einem reduzierten Gehalt an 2,3-Diphosphoglyzerat, was zu einer relativen peripheren Gewebehypoxie führt. Der reduzierte Gehalt an 2,3-Diphosphoglyzerat und eine erhöhte Chlorid-Konzentration im Erythrozyten zieht einen Anstieg des pH-Werts im Erythrozyten und damit die Anfälligkeit für Hämolysen unabhängig vom pH-Wert im Medium nach sich (Giger *et al* 1985).

Im Gegensatz zum Menschen haben Hunde wenige Symptome einer Myopathie. Der kanine Skelettmuskel ist durch das Fehlen der TypIIB-Muskelfasern weniger abhängig von der anaeroben Glykolyse als die menschliche Muskulatur (Harvey 2006). Allerdings ging die Erkrankung bei beiden beschriebenen Whippets anders als bei den Spanielrassen mit Myopathien durch körperliche Anstrengung und einer

kardialen Erkrankung einher. Dies könnte mit einem abweichenden Muskelaufbau, der athletischen Natur und dem Erbgut der Rasse in Zusammenhang stehen (Gerber *et al* 2009).

Anders als Tiere mit Pyruvatkinase-Mangel können Tiere mit einem Phosphofruktoskinase-Mangel bei entsprechender Behandlung in hämolytischen Krisen und der Vermeidung von Situationen, welche zu Hyperventilation führen, eine normale Lebenserwartung haben (Harvey 2006).

b) PYRUVATKINASE-MANGEL

Ein Pyruvatkinase-Mangel ist bei den Rassen Basenji, Beagle, Cairn Terrier, West Highland White Terrier, Miniaturpudel, Chihuahua, Mops, Dachshund und Toy American Eskimohunden beschrieben (Harvey 2006, Skelly *et al* 1999). Der Enzymmangel führt ähnlich wie der Phosphofruktokinase-Mangel zu schweren hämolytischen Anämien und wird ebenfalls autosomal rezessiv vererbt (Skelly *et al* 1999). Die Pyruvatkinase katalysiert eine wichtige ATP-abhängige Stufe in der Glykolyse, sodass bei einem Mangel der Energiemetabolismus der Erythrozyten stark gestört ist. Dies resultiert in einer verkürzten Lebensdauer der Erythrozyten (Harvey 2006, Kohn and Fumi 2008). Das Knochenmark versucht dies durch eine erythroide Hyperplasie zu kompensieren, was eine deutliche Retikulozytose im peripheren Blut zur Folge hat (Harvey 2006, Kohn and Fumi 2008).

Die klinischen Symptome beinhalten Schwäche, regenerative Anämien und eine Hepatosplenomegalie bei jungen Tieren (Skelly *et al* 1999). Als Reaktion auf eine anhaltende hämolytische Anämie werden auch bei einem erhöhten Eisengehalt im Serum im Darm große Mengen an Eisen absorbiert. Als Folge davon entwickelt sich bei erkrankten Hunden in der Leber eine Hämosiderose, Hämochromatose und Fibrose (Harvey 2006).

Im Gegensatz zu anderen Tierarten mit Phosphofruktoskinase-Mangel entwickeln betroffene Hunde eine progressive Osteosklerose und als Folge der Eisenüberladung und der erhöhten Erythropoese eine Myelofibrose (Harvey 2006, Skelly *et al* 1999). Die Tiere sterben aufgrund der Anämie, einer Myelofibrose oder an Leberversagen innerhalb der ersten 5 Lebensjahre (Harvey 2006, Skelly *et al* 1999).

Ein Pyruvatkinase-Mangel bei Katzen ist bei Abessiniern, Somali-Katzen und selten bei der Hauskatze bekannt. Im Gegensatz zu Hunden zeigen Katzen weniger Symptome der Erkrankung, welche daher als Zufallsbefund in hohem Alter (Barrs *et al* 2009, Harvey 2006, Kohn and Fumi 2008) oder beim Ausbruch konkurriender Erkrankungen (Mansfield and Clark 2005) erkannt wird. Die Erkrankung kann aber auch zu chronischen Anämien und akuten hämolytischen Krisen führen (Barrs *et al* 2009, Kohn and Fumi 2008). Bei 70% der Katzen ist eine gering- bis hochgradige Anämie nachzuweisen und die aggregierten Retikulozyten sind bei 90%-100% der Tiere erhöht, was für einen erhöhten Turnover der RBCs spricht (Barrs *et al* 2009, Kohn and Fumi 2008).

c) HÄMOLYSE BEI ABESSINIERN UND SOMALI-KATZEN

Kohn und Mitarbeiter beschrieben 2000 makrozytäre hämolytische Anämien bei Abessiniern und Somali-Katzen mit deutlich erhöhter osmotischer Fragilität der Erythrozyten, oft kombiniert mit einer Splenomegalie. Aufgrund von Rasse und Verwandtschaft der Tiere und dem Ausschluss anderer Ursachen der Anämie, wird ein neuer hereditärer Erythrozyten-Defekt, am ehesten ein Membrandefekt, vermutet, der zu erhöhter osmotischer Fragilität der Erythrozyten führt. Eine genetische Prädisposition für eine immunbedingte Zerstörung der Erythrozyten kann nicht ausgeschlossen werden. Die Katzen haben eine persistierende Makrozytose, auch wenn der PCV im Referenzbereich liegt und eine Agglutination und eine Retikulozytose nicht vorhanden sind. Die Zahl der absoluten Retikulozyten korreliert nicht mit der Größe der Erythrozyten und die Erythrozyten scheinen verglichen mit den anderen Zellen auf dem Blutausstrich groß (Kohn *et al* 2000).
Diese Erkrankung muss von einem Pyruvatkinase-Mangel abgegrenzt werden, bei dem in der Regel eine normale osmotische Fragilität der Erythrozyten zu finden ist (Kohn and Fumi 2008).

d) STOMATOZYTOSE

Dabei handelt es sich um eine angeborene Erkrankung, die durch eine Stomatozytose im Blut, eine erhöhte osmotische Fragilität der Erythrozyten und häufig einer hämolytischen Anämie charakterisiert ist (Bonfanti *et al* 2004).

Die Erkrankung wurde beim Alaskan Malamute (Bonfanti *et al* 2004, Pinkerton *et al* 1974), beim Drentscher Hühnerhund, beim Schnauzer und beim Zwergschnauzer (Bonfanti *et al* 2004) in unterschiedlicher Ausprägung beschrieben.
Während die Schnauzerrassen klinisch unauffällig sind und eine deutliche Makrozytose im Blut nachzuweisen ist, ist die hochgradige Makrozytose beim Alaskan Malamute oft kombiniert mit einer Chondrodysplasie. Beim Drentscher Hühnerhund handelt es sich um eine polysystemische Erkrankung, meist assoziiert mit einer hypertrophen Gastritis; eine Makrozytose wird nicht ausgebildet.
Beim Schnauzer ruft die hereditäre Stomatozytose nur geringe hämatologische Veränderungen hervor. Die Stomatozyten im Blut sind in höherer Anzahl als beim Alaskan Malamute, aber weniger oft als bei Zwergschnauzern und Drentscher Hühnerhunden vorhanden. Die osmotische Fragilität ist erhöht, allerdings in sehr unterschiedlichem Ausmaß. Die Krankheit entsteht wahrscheinlich durch einen defekten Kationenaustausch in den Erythrozyten, dadurch kommt es zu hohen intrazellulären Natriumkonzentrationen, zu einer Makrozytose durch zu viel Zellwasser und zu einer erhöhter osmotischen Fragilität (Bonfanti *et al* 2004, Pinkerton *et al* 1974).

e) CYTOCHROM b5 REDUKTASE MANGEL BEI HUND UND KATZE

Das Enzym Cytochom b5 Reduktase hält den Gehalt an Methämoglobin im Körper konstant. Bei einem Mangel dieses Enzyms kommt es zu einer persistierenden Methämoglobinämie. Bekannt ist diese Erkrankung beim Chihuahua, Barzoi, English Setter, Terrier-Mischlingen, Cockerpoo, Coonhound, Pudel, Corgi, Cocker Spaniel, Toy American Eskimohund, Pitbullmischlingen und bei Hauskatzen. Die Vererbung erfolgt autosomal rezessiv. Häufig haben betroffene Tiere keine klinischen Symptome, einige zeigen jedoch zyanotische Schleimhäute und Leisungsschwäche. Der Hämatokrit der Hunde ist in der Regel normal, bei den meisten Katzen aber leicht erhöht. Tiere mit einem Cytochrom b5 Reduktase-Mangel benötigen keine Therapie und haben eine normale Lebenserwartung (Harvey 2006).

2.2.3.2.3 Infektionen

Da Infektionen aufgrund vieler Pathomechanismen Anämien auslösen können, sind in diesem Kapitel auch Erreger beschrieben, bei denen es nicht oder nicht nur durch eine Hämolyse, sondern durch andere Mechanismen zu einer Anämie kommt.

BABESIEN:

Babesia canis kann bei Hunden eine schwere Anämie mit akuter intravasaler oder mit extravasaler Hämolyse auslösen (Weiss and Tvedten 2006).

In Europa sind die am häufigsten vorkommenden Arten die durch *Dermacentor reticulatus* übertragenen *Babesia canis canis* und die über *Rhipicephalus sanguineus* verbreiteten *Babesia canis vogeli* (Solano-Gallego *et al* 2008). Während B. c. canis schwerwiegende klinische Symptome mit Lethargie, Anorexie, Fieber, Anämie, Thrombozytopenie und Ikterus verursachen kann, sind bei B. c. vogeli meist milde Krankheitverläufe beschrieben (Caccio *et al* 2002, Solano-Gallego *et al* 2008). Allerdings kann es bei Welpen und adulten Hunden mit Splenektomie, zusätzlichen infektiösen Erkrankungen (z.B. Leishmaniose), schweren Erkrankungen (z.B. chronische Niereninsuffizienz) oder immunsupprimierten Zuständen ebenso zu schweren Verläufen durch B. c. vogeli kommen (Solano-Gallego et al, 2008).

Zum Zeitpunkt der Vorstellung sind je nach Studie 30% (Zygner *et al* 2007), 70% (Furlanello *et al* 2005) bzw. 93% (Solano-Gallego *et al* 2008) der Tiere anämisch. Davon haben 35-37% eine geringgradige, 59% ein mittelgradige und 4-6% eine hochgradige Anämie (Furlanello *et al* 2005, Solano-Gallego *et al* 2008). Die Anämie ist in den meisten Fällen normozytär-normochrom und hypo- oder nicht regenerativ, was in den meisten Patienten durch die akute Infektion zustande kommt. Dies unterstützt die Auswertung der Blutausstriche bei Tieren mit Babesiose, bei der bei 60% eine Anisozytose und bei 25% eine Polychromasie gefunden werden, welche als frühe Anzeichen der Regeneration interpretiert werden kann (Zygner *et al* 2007).

Bei einer Babesiose spielt als Ursache der Hämolyse neben der direkten mechanischen Schädigung der Erythrozyten durch die Parasiten die antikörper-mediierte zytotoxische Zerstörung der zirkulierenden roten Blutzellen eine wichtige Rolle. Die Autoantikörper richten sich gegen Bestandteile der Zellmembran von infizierten und nicht-infizierten Erythrozyten. Dies führt sowohl zu einer intravasalen als auch zu einer extravasalen Hämolyse, welche in einer Anämie und Hämoglobinämie resultieren (Weiss and Tvedten 2006, Zygner *et al* 2007).

Zusätzlich kommt durch die Produktion von Hämolyse-Faktoren durch den Parasiten eine toxische Hämolyse in Betracht (Furlanello *et al* 2005).

HÄMOTROPHE MYKOPLASMEN:

Hämobartonella felis wurde im Jahr 2001 offiziell als Mykoplasma reklassifiziert und heute gelten die drei Spezies *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum* und *Candidatus Mycoplasma turicensis* als die felinen Hämoplasmen (Tasker 2006). Der Erreger kann eine akute bis chronische Krankheit hervorrufen und gilt als die häufigste Ursache einer hämolytischen Anämie bei Katzen (Harrus *et al* 2002). Durch die Anhaftung der Organismen an die roten Blutkörperchen entsteht ein direkter Schaden der Zellmembran, welcher in einer verkürzten Lebenszeit der Erythrozyten resultiert. Durch den Zellschaden kann es zur Exponierung von Antigenen kommen, die zur Produktion antierythrozytärer Antikörper führen. Zusätzlich können sich Antikörper auch direkt gegen die Mikroorganismen richten. Es ist sowohl eine intravasale Hämolyse durch den direkten Zellschaden als auch eine extravasale Hämolyse durch eine Zerstörung der roten Blutzellen in Leber und Milz, Lunge und Knochenmark beschrieben. Die Milzmakrophagen sind in der Lage, Mykoplasmen von der Oberfläche der Erythrozyten zu befreien und die Zellen zurück in die Zirkulation zu geben. Dies kann den plötzlichen Anstieg und Abfall des Levels an Mikroorganismen im Blut erklären.

Infektionen mit Mykoplasmen führen nur bei einigen Patienten zu klinisch relevanten Anämien (Bauer *et al* 2008, Tasker 2006). Katzen, die mit *Candidatus M haemominutum* infiziert sind, haben selten klinisch Symptome, wohingegen Tiere, die mit *M. haemofelis* infiziert sind, eine Vielzahl von Symptomen inklusive schweren Anämien entwickeln (Westfall *et al* 2001). Allerdings können Koinfektionen mit FeLV (*Candidatus M haemominutum*) bzw. mit FIV oder eine iatrogene Immunsuppression (*Candidatus M turicensis*) das pathogene Potential des Erregers erhöhen und zu mittel- bis hochgradigen hämolytischen Anämien führen (Bauer *et al* 2008, George *et al* 2002, Harrus *et al* 2002, Tasker 2006). Die Anämien sind in der Regel von regenerativem Charakter (George *et al* 2002, Harrus *et al* 2002, Tasker 2006), es kommen aber immer wieder hypo- oder nicht regenerative Anämien vor. Dies könnte mit Koinfektionen mit FeLV oder der Freisetzung von Erythrozyten, die von Parasiten befreit sind, durch die Milz und der dadurch schnelleren Erholung von der Anämie

erklärbar sein. Die z.T. festgestellte Makrozytose kann bei einer Regeneration, aber auch der Koinfektion mit FeLV vorkommen.
Auch bei adäquater Therapie geht man davon aus, dass die Erreger aus infizierten Tieren nicht elimiert werden können (Tasker 2006).

FELV:
FeLV kann direkt oder indirekt hämatologische Veränderungen, am häufigsten Anämien verursachen (Gleich and Hartmann 2009). Bei der Entwicklung einer nicht regenerativen Anämie spielen z.B. lymphoide Neoplasien im Knochenmark mit Myelophtise und Myelofibrose, myelodysplastische Erkrankungen oder ernährungsbedingte Mängel eine wichtige Rolle (Hisasue *et al* 2001, Linenberger and Abkowitz 1995, Shelton *et al* 1990, Shimoda *et al* 2000, Weiss 2006b).
FeLV Subtyp C, der bei weniger als 1% der virämischen Katzen nachgewiesen wird (Linenberger and Abkowitz 1995), kann zu einer schweren erythroiden Hypoplasie mit einem Entwicklungsstopp der erythroiden Vorläuferzellen durch die Interaktion des FeLV-C mit einem Zellrezeptor führen (Abkowitz *et al* 1987, Linenberger and Abkowitz 1995, Onions *et al* 1982, Quigley *et al* 2000, Quigley *et al* 2004, Riedel *et al* 1986).
Schließlich können FeLV-inifzierte Katzen durch konkurrierende Infektionen oder Neoplasien eine chronische Begleitanämie mit Veränderungen im Eisenmetabolismus und in der RBC-Überlebenszeit entwickeln, was zu einer nicht-regenerativen Anämie beitragen kann (Linenberger and Abkowitz 1995). Seltener können bei FeLV auch regenerative Anämien vorkommen, die mit Blutverlust oder Hämolyse durch gleichzeitige Infektionen mit Mykoplasmen oder Immunerkrankungen in Verbindung stehen (George *et al* 2002, Harrus *et al* 2002, Kohn *et al* 2006, Linenberger and Abkowitz 1995, Tasker 2006).

Infektionen mit ANAPLASMA PHAGOZYTOPHILUM können in 47% (Granick *et al* 2009) bis 61% (Kohn *et al* 2008) der Fälle zu z.T. regenerativen, gering- bis hochgradigen Anämien führen. Der Mechanimus der Anämie ist bisher unbekannt (Carrade *et al* 2009). Durch hämorrhagische Diathese durch eine Thrombozytopenie kann ein Blutverlust die Anämie verschlimmern (Kohn *et al* 2008). Zusätzlich sind sekundäre immunbedingte hämolytische Anämien bei der Anaplasmose beschrieben (Granick *et al* 2009).

EHRLICHIA CANIS führt neben der typischen Thrombozytopenie in ca. 90% der Fälle zu einer gering- bis hochgradigen aregenerativen Anämie. Meist kommt eine Anämie bei der chronischen Form durch eine Hypozellularität des Knochenmarks vor, sie kann aber auch durch Blutungen entstehen, die meist durch Thrombozytopathien bedingt sind (Weiss and Tvedten 2006).
Patienten mit einer LEISHMANIOSE-Infektion zeigen oft eine normozytär-normochrome, nicht regenerative Anämie (Sellon *et al* 1993).
In der Pathogenese und Virulenz der LEPTOSPIROSE spielen Hämolysine eine wichtige Rolle. Die Hämolysine richten sich gegen Erythrozyten und möglicherweise andere Zellmembranen, die Phospholipide enthalten und führen durch Zytolyse zu einer Zerstörung der Zielzellen. So kann es v.a. bei Leptospira icterohaemorrhagiae zu schweren Hämolysen kommen. Unspezifische Toxine, die z.B. durch Porenbildung zu einer Zytolyse führen, scheinen für die Leber- und Nierenläsionen sowie für die charakteristischen Lungenblutungen im Rahmen einer Leptospirose veranwortlich zu sein (Lee *et al* 2000).

2.2.3.2.4 Andere

a) HEINZKÖRPERCHEN

Heinzkörperchen sind große Aggregate von Präzipitaten der Globinfraktion des Hämoglobins, die durch oxidative Denaturierung entstehen. Sie interagieren mit umliegenden Zellbestandteilen und können diese zerstören (Christopher 2000, Harvey 2006). Dies kann in einer leicht- bis schwergradigen Anämie resultieren, der Grad der Anämie ist abhängig von der Schnelligkeit der Heinzkörperchen-Bildung, deren Größe und Anzahl und dem Grad der Erythrozytenmembranzerstörung (Christopher 2000).
Beim Hund kommen physiologischerweise keine Heinzkörperchen vor, während bei klinisch gesunden Katzen Heinzkörperchen bis zu 10% der Erythrozytenpopulation ausmachen können (Weiss and Tvedten 2006). Christopher ist dagegen der Meinung, dass eine wirklich gesunde Katze weniger als 5% Heinzkörperchen aufweist und ein Tier mit streng kontrollierter Diät nur 1-2% (Christopher 2000).
Felines Hämoglobin enthält eine große Anzahl an freien Thiolgruppen (SH), wodurch es empfindlicher gegenüber oxidativen Schädigungen ist. Außerdem ist die Milz der Katze durch ihre nichtsinusoidale Struktur ineffektiv bei der Beseitigung von

Heinzkörperchen enthaltenden RBCs aus der Zirkulation (Christopher 2000, Weiss and Tvedten 2006).

Oxidative Stoffe, die bei Hund und Katze zur Bildung von Heinzkörperchen führen können, beinhalten u.a. Acetaminophen, Methylenblau, DL-Methionin, Naphthalen in Mottenkugeln und Vitamin K_3 (Balch and Mackin 2007a, Christopher 2000, Desnoyers and Hebert 1995, Kohn *et al* 2006). Außerdem können die Aufnahme von Zwiebeln, Kupfer, Zink, Propylenglykol und bei Katzen einige Diäten auf Fischbasis Heinzkörperchen verursachen (Christopher 2000). Ein Fallbericht ist über eine Katze veröffentlicht, bei der eine Heinzkörperchen-Anämie durch die Aufnahme von Babynahrung mit Zwiebelpulver entstanden ist (Tvedten and Holan 1996).

Neben oben genannten oxidativen Substanzen können bei Katzen auch Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Hyperthyreose, Niereninsuffizienz und Lymphom durch einen veränderten Metabolismus mit erhöhtem Anfall von oxidativen Intermediärprodukten zu einer erhöhten Anzahl von Heinzkörperchen führen (Christopher 2000, Weiss and Tvedten 2006).

Bei allen Katzen mit Heinzkörperchen ist die Bestimmung der Retikulozyten sinnvoll. Eine erhöhte Anzahl an punktierten Erythrozyten gibt Hinweise auf eine chronische Hämolyse (Christopher 2000).

Erythrozyten mit einem hohen Gehalt an Heinzkörperchen werden in der grafischen Darstellung durchflusszytometrischer Hämatologiegeräte als hyperchrome, normozytäre Zellen dargestellt (Tvedten and Holan 1996). Heinz-Körperchen scheinen für den Laser optisch dichter zu sein und zeigen daher eine fälschlicherweise erhöhte Hämoglobinkonzentration und damit einen erhöhter MCHC (Christopher 2000, Tvedten *et al* 2000).

b) EXZENTROZYTEN

Exzentrozyten sind Erythrozyten mit einem dünnen exzentrischen Wulst entlang einer Seite, der durch zwei verschmolzene Membranschichten gebildet wird. Der Membranwulst enthält kein Hämoglobin und erscheint daher im Blutausstrich durchsichtig (Weiss and Tvedten 2006). Exzentrozyten entstehen durch direkte oxidative Schädigung der Erythrozytenmembran und des Zytoskeletts (Caldin *et al* 2005, Harvey 2006). Bei kranken Hunden ist eine Exzentrozytose ein seltener Laborbefund, der bei 2/3 der Patienten mit einer gering- bis mittelgradigen Anämie

einhergeht. Die Induktion zur Bildung von Exzentrozyten wurde durch Medikamente, bei Zwiebel- und Knoblauch-Aufnahme, Vitamin-K-Antagonist-Intoxikation, diabetischer Ketoazidose, Lymphomen und bei schweren Infektionen nachgewiesen. Im Gegensatz zur Katzen scheinen bei Hunden unter oxidativem Stress eher Exzentrozyten als Heinzkörperchen gebildet zu werden (Caldin *et al* 2005).

c) HYPOPHOSPHATÄMIE

Phosphat ist für die Produktion von 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG) und Adenosin-Triphosphat (ATP) notwendig. Beide Stoffe sind für einen normalen Zellstoffwechsel wichtig (Forrester and Moreland 1989). Eine Hypophosphatämie induziert einen Mangel an 2,3-DPG, was zu einer Verformung der Erythrozytenmembran führt. Zusätzlich kommt es durch eine verminderte 2,3-DPG-Konzentration im Erythrozyten zu einer verminderten Versorgung der peripheren Gewebe mit Sauerstoff (Forrester and Moreland 1989). Die Erythrozyten weisen eine erhöhte osmotische Fragilität auf und sind anfällig für oxidative Schäden (Giger 2005).
Bei Serum-Phosphorkonzentrationen unter 0,3 mmol/l beim Hund und unter 0,8 mmol/l bei der Katze kann eine hämolytische Anämie verursacht werden (Weiss and Tvedten 2006). Eine Hypophosphatämie kann bei einer diabetischen Ketoazidose, als Komplikation einer Insulintherapie auftreten oder bei Anfütterung von Katzen mit hepatischer Lipidose entstehen (Forrester and Moreland 1989, Weiss and Tvedten 2006).

d) ZINK

Durch die Aufnahme von zinkhaltigen Gegenständen wird durch eine intravasale Hämolyse eine Anämie ausgelöst. Im sauren Milieu des Magens bildet Zink lösliche Salze und wird absorbiert (Gurnee and Drobatz 2007, Weiss and Tvedten 2006). Durch die adstringierende Wirkung des Zinks entwickelt sich eine Gastroenteritis mit Erbrechen und Durchfall. Mit zeitlicher Verzögerung kann die intravasale Hämolyse, in manchen Fällen aber auch eine Störung in der Hämatopoese festgestellt werden, welche wahrscheinlich durch die antagonisierende Wirkung von Zink auf die Kupfer- und Eisenresorption zustande kommt. In ca. 1/3 der Fälle mit zinkinduzierten

hämolytischen Anämien können Heinz-Körperchen nachgewiesen werden (Willms *et al* 2009).

e) MIKROANGIOPATHISCHE HÄMOLYSE

Bei der mikroangiopathischen hämolytischen Anämie werden Erythrozyten im Blutkreislauf mechanisch geschädigt. Auf ihrem Weg durch Tumoren, Fibringerinnsel oder lädierte Blutgefäße können rote Blutkörperchen zerrissen, fragmentiert oder anderweitig geschädigt werden und werden somit durch das MPS aussortiert (Balch and Mackin 2007a). Als Ursache dieser Form der Hämolyse werden Herzwurmerkrankungen, vaskuläre oder gastrointestinale Neoplasien, Vaskulitiden, Herzklappenerkrankungen, Milzerkrankungen oder -torsionen, Lebererkrankungen sowie die DIC (disseminierte intravasale Coagulopathie) (Balch and Mackin 2007a) genannt.
Als diagnostisches Merkmal können auf dem Blutausstrich Fragmentozyten (Schistozyten) gefunden werden (Moritz *et al* 2006).

f) HÄMOLYSINE

Bakterientoxine (Streptokokken, Staphylokokken, Leptospiren, Clostridien) sowie Schlangen- und Spinnengifte können als Hämolyine wirken und so durch eine direkte Schädigung auf die Erythrozyten eine Hämolyse auslösen (Moritz *et al* 2006).

2.2.3.3 Nicht regenerative Erkrankungen

2.2.3.3.1 Entzündliche Erkrankungen

Entzündliche oder neoplastische Erkrankungen werden häufig von einer Anämie begleitet, die AID („anemia of chronic disease“, „anemia of inflammation“) genannt wird. Diese Form der Anämie stellt die häufigste nicht regenerative Anämieform bei Haustieren dar und weist meist einen geringen bis mittleren Schweregrad auf, der sich nicht verschlimmert (Brady *et al* 2000, Ottenjann *et al* 2006, Weiss 2009). Die Anämie kann in seltenen Fällen allerdings so schwer und klinisch relevant werden, dass der Patient Bluttransfusionen benötigt (Ottenjann *et al* 2006). Typischerweise

sind die Erythrozyten normozytär-normochrom, bei langanhaltenden Erkrankungen können sie auch mikrozytär werden (Harvey 2008a, Rance and Pullman 2005, Sellon and Pullman 2005, Weiss 2009). Im klassischen Fall liegt im Serum eine erniedrigte, in Knochenmark und anderen Geweben eine erhöhte Eisenkonzentration vor.
Alle chronischen Entzündungen, die durch verschiedene Krankheitserreger ausgelöst werden und nicht-infektiöse Erkrankungen wie Immunerkrankungen, toxische oder neoplastische Erkrankungen kommen als Auslöser einer AID in Frage (Stockham and Scott 2008, Wallner *et al* 1976). Als Beispiele werden bei Katzen septische Zustände, Abszesse, ein Pyothorax und Fettgewebsnekrosen genannt (Brady *et al* 2000, Ottenjann *et al* 2006). Neoplastische Erkrankungen, die mit einer Anämie einhergehen können, sind Hämangiosarkome, Leukämien, Lymphome, multiple Myelome und Osteosarkome (Madewell and Feldman 1980, Miller *et al* 2009).
Die Pathogenese umfasst drei Mechnismen, die durch die Entzündung initiiert werden:
1) Durch eine erhöhte IL-1-Konzentration kommt es zu einer verkürzten Überlebenszeit der Erythrozyten (Ottenjann *et al* 2006, Stockham and Scott 2008, Weiss and Tvedten 2006). Des Weiteren ist eine oxidative Zerstörung der Erythrozyten-Membranen und darauffolgend die Bindung von Immunglobulinen beschrieben, sodass die roten Blutkörperchen schneller abgebaut werden können.

2) Beeinträchtigte Eisenmobilisierung und -nutzung:
Die inflammatorischen Zytokine (IL-1, TNF und TGF-β) verursachen eine Sequestration von Eisen in den Makrophagen und führen zu Veränderungen in der Ferritinbildung und im Transferrinrezeptor, sodass es zu einer verminderten Verfügbarkeit des Eisens für die Hämoglobinsynthese kommt (Ottenjann *et al* 2006, Stockham and Scott 2008, Weiss and Tvedten 2006).

3) Beeinträchtige Erythrozytenproduktion:
Durch den Einfluss verschiedener Zytokine (IL-1, INF und TNF) auf erythroide Vorläuferzellen können erythroide Zellen nicht mehr ausreichend auf Erythropoetin ansprechen.

Hepzidin, ein in der Leber gebildetes antibakterielles Peptid, scheint eine wichtige Rolle in der Pathogenese der AID zu spielen.

Durch inflammatorische Zytokine wie IL-6 steigt die Hepzidin-Konzentration an, was zu einer verminderten Eisenabsorption im Darm und zu einer veränderten Mobilisierung von Eisen aus dem Speicher-Pool führt (Means, Jr. 2004, Nemeth and Ganz 2009). Es kommt zu einer Anhäufung des Eisens in den Makrophagen, weil diese weiterhin alte Erythrozyten phagozytieren, das Eisen aber nicht für die Erythropoese zur Verfügung stellen (Agarwal and Prchal 2009). Dies wird im Rahmen von Entzündungen und Infektionen als Abwehrmechnismus des Organismus zur Limitierung der Eisenverfügbarkeit für Mikroorganismen angesehen (Nemeth and Ganz 2009).

Die Anämie erholt sich normalerweise durch die erfolgreiche Behandlung der zugrunde liegenden Erkrankung und spricht in der Regel auf Erythropoetin-Therapie an (Ottenjann *et al* 2006, Weiss 2009).

Bisher ist nicht geklärt, ob die Anämie, die bei Tumorpatienten in der Veterinärmedizin nachzuweisen ist, zur AID gehört oder ob ein eigener Mechanismus wie die Produktion einer Anämie-induzierenden Substanz durch die Tumorzellen oder die Aktivierung von Makrophagen die Anämie auslöst (Miller *et al* 2009).

2.2.3.3.2 Chronische Nierenerkrankungen

Bei Tieren mit chronischen Nierenerkrankungen ist häufig eine gering- bis mittelgradige normozytär-normochrome Anämie nachzuweisen (Feldman 2005, Squires 1993, Weiss 2009).

Eine Zerstörung der Nieren im Rahmen der Erkrankung führt zu einer verminderten Erythropoetin-Produktion (Stockham and Scott 2008, Wallner *et al* 1976, Weiss 2009). Zusätzlich ist die Überlebensdauer der Erythrozyten durch einen ungeklärten Mechanismus reduziert und das Knochenmark spricht schlechter auf das vorhandene Erythropoetin an. Dafür könnte eine noch unbekannte Substanz im Serum von chronisch nierenkranken Patienten verantwortlich sein, welche die Erythropoetin-stimulierte Erythropoese hemmt (Wallner *et al* 1976).

Andere Faktoren wie Blutungen durch urämische Ulzera oder Gefäßverletzungen (Squires 1993), erhöhte Blutungsneigung durch eine Thrombozytopathie, Hemmung der Erythropoese durch eine hohe Parathormonkonzentration (Feldman 2005), chronisch entzündliche Prozesse (AID) und Hämolysen kommen noch hinzu (Moritz *et al* 2006).

Im Endstadium einer Niereninsuffizienz entwickeln manche Hunde und Katzen Panzytopenien, welche durch eine aplastische Anämie hervorgerufen werden (Weiss 2009).

2.2.3.3.3 Knochenmarkshypoplasie oder -aplasie

Eine aplastische Anämie ist durch das Vorhandensein von Bizytopenien oder Panzytopenien im Blut und im Knochenmark definiert, bei denen mehr als 95% des hämatopoetischen Gewebes durch Fettgewebe ersetzt ist. Als Ursache beim Hund werden infektiöse Ursachen wie eine chronische monozytäre Ehrlichiose sowie verschiedene Medikamentenintoxikationen (s.u.), ionisierende Strahlung und idiopathische Gründe genannt (Weiss 2006a, Weiss 2009). Parvovirose bei Hunden und Katzen verursacht durch die virale Vermehrung in Knochenmarkszellen eine akute aplastische Panzytopenie. Knochenmarksschädigungen durch Septikämien und Endotoxämien im Zusammenhang mit einer Parvovirose können nicht ausgeschlossen werden (Feldman 2005).
Bei Katzen kann eine aplastische Anämie im Rahmen einer chronischen Niereninsuffizienz, einer FeLV-Infektion, bei Metamizol- und Griseofulvinintoxikationen und als idiopathische Form entstehen (Weiss 2009).

a) MYELITIS

Eine Entzündung des Knochenmarks (Myelitis) kann durch bakterielle Septikämien, Systemmykosen (z.B. disseminierte Histoplasmose), virale Infektionen (FIP) oder durch Infektionen mit Protozoen (z.B. Leishmanien) hervorgerufen werden (Stockham and Scott 2008, Weiss 2009). Neben einer Neutrophilie, einer Linksverschiebung und toxischen Veränderungen im Blut zeigen betroffene Tiere eine mittelgradige bis hochgradige Anämie (Weiss 2009).

b) TOXISCH

Weiss beschreibt die Behandlung von Chemotherapeutika als eine der häufigsten Ursachen für eine Knochenmarkshypo- oder aplasie. Diese kann isoliert die granulozytäre Zellreihe betreffen, aber auch zu einer Panhypoplasie führen (Weiss 2006a). Aber auch andere Medikamente wie nichtsteroidale Antiphlogistika (z.B.

Phenylbutazon), Sulfadiazin, Cefalosporine, Albendazol, Azathioprin, Phenobarbital und Griseofulvin sind als Auslöser einer Knochenmarksaplasie beschrieben (Moritz *et al* 2006, Weiss 2009).

Ein Hyperöstrogenismus entsteht beim Hund durch exogene Zufuhr zu therapeutischen Zwecken oder endogen bei weiblichen Tieren durch Ovarialzysten oder Granulosazelltumoren und bei männlichen Individuen v.a. durch Sertolizelltumoren (Moritz *et al* 2006, Sontas *et al* 2009). Die hämatopoetischen Stammzellen beim Hund sind besonders empfindlich gegenüber Östrogenen (Moritz *et al* 2006). Die Effekte des Östrogens auf das hämatopoetische System können in drei Phasen eingeteilt werden. In der ersten Phase innerhalb von zwei Wochen nach dem Östrogenkontakt wird nach einem kurzen Anstieg der Thrombozytenzahl eine schwere Thrombozytopenie festgestellt. Phase zwei ist durch eine Neutrophilie gekennzeichnet. In der letzten Phase (21-45 Tage nach Östrogenkontakt) kann sich das Knochenmark erholen oder es kann sich eine Knochenmarksaplasie mit Panzytopenie entwickeln. Der komplette Mechanismus ist nicht genau bekannt, es wurde jedoch die östrogeninduzierte Bildung eines Myelopoese-hemmenden Faktors durch Stromazellen des Thymus bei Hunden nachgewiesen (Sontas *et al* 2009).

c) STRAHLUNG

Durch Ganzkörperbestrahlung oder der Aussetzung von Röntgen-, Gamma- oder Betastrahlung kann das Knochenmark geschädigt werden.

d) MARROW REPLACEMENT

Bei den sog. Anämien mit Myelophtisis werden die hämatopoetischen Zellen im Knochenmark durch andere Strukturen ersetzt oder verdrängt. Myelo- oder lymphoproliferative Erkrankungen (Weiss 2006a) kommen genauso wie Metastasen von z.B. Lymphomen, Multiplen Myelomen, Maligner Histiozytose, Mastzelltumoren, Karzinomen und Sarkomen als Ursache in Frage (Weiss 2006a). Außerdem können die hämatopoetischen Zellen auch durch Bindegewebe wie bei der Myelofibrose oder durch Knochengewebe wie bei der Osteopetrose verdrängt werden (Weiss 2006a).

Myelofibrose:

Die Myelofibrose ist eine Knochenmarkerkrankung mit einer Proliferation von Fibroblasten im Knochenmark mit unterschiedlichen Mengen an Kollagenablagerung, was meist zu einer nicht regenerativen Anämie führt (Villiers and Dunn 1999, Weiss 2006a, Weiss and Smith 2002). In den meisten Fällen scheint sich die Myelofibrose sekundär zu einer Grunderkrankung zu entwickeln. Als Ursachen hierfür sind Toxine, immunmediierte hämolytische Anämien, intra- und extramedulläre Neoplasien und Medikamente wie Phenobarbital, Phenytoin, Phenylbutazon und Colchizin beschrieben. Viel seltener kann eine primäre idiopathische Myelofibrose nachgewiesen werden, eine chronische myelodysplastische Erkrankung der erythroiden, myeloiden und megakaryozytären Zelllinie (Weiss and Smith 2002). Die Abgrenzung zu einer akuten megakaryozytären Leukämie und einem myelodysplastischen Syndrom ist aufgrund dem möglichen Vorkommen von megakaryozytärer Dysplasie und Hyperplasie sowie erhöhten Blastenzahlen bei der Myelofibrose nicht immer einfach (Weiss and Smith 2002).

Tiere mit IMHA scheinen prädisponiert für eine Myelofibrose zu sein, sodass eine Myelofibrose als eine der Ursachen für eine nicht regenerative Antwort bei Tieren mit einer IMHA anzusehen ist (Weiss and Smith 2002).

Als Neoplasien sind Tumoren wie Lymphome oder Leukämien beschrieben, welche das Knochenmark infiltrieren, aber auch extramedulläre Tumoren wie Karzinome und Sarkome. Bei beiden Typen von Tumoren wird die Myelofibrose mit multifokalen Nekrosen im Knochenmark in Verbindung gebracht (Weiss and Smith 2002). Bei extramedullären Tumoren kann nicht immer eine Metastasierung ins Knochenmark nachgewiesen werden, sodass man wie beim Menschen von der Produktion eines Faktors durch die Tumoren ausgeht, welcher zur Entstehung einer Myelofibrose führt (Villiers and Dunn 1999).

Die Hälfte aller Tiere mit sekundärer Myelofibrose erholt sich von der Anämie, wobei die Patienten mit Neoplasien kurze Überlebenszeiten aufweisen.

Eine schwere Anämie und hypozelluläres Knochenmark scheinen ein negativer prognostischer Faktor zu sein (Weiss and Smith 2002), wohingegen das Vorhandensein einer Makrozytose bei initialer Vorstellung einen guten prognostischen Faktor darstellt (Villiers and Dunn 1999). Die Schwere der Knochenmarksfibrose scheint keinen Einfluss auf die Dauer der Symptomatik und die Prognose zu haben (Villiers and Dunn 1999).

Knochenmarksnekrose:

Eine Knochenmarksnekrose mit einer nicht regenerativen normozytär-normochromen Anämie wird bei Hunden mit hämatologischen Erkrankungen beobachtet. Bei den meisten Hunden mit einer Knochenmarksnekrose ist eine zugrunde liegende Erkrankung oder die Behandlung mit verschiedenen Medikamenten nachzuweisen (Weiss 2005a), sie kommt aber auch als idiopathische Form vor. Erkrankungen, die mit einer Knochenmarksnekrose in Verbindung gebracht werden, beinhalten eine Sepsis, immunmediierte Anämien, Lymphome, ein Systemischer Lupus Erythematosus, eine Parvovirose und eine monozytäre Ehrlichiose (Weiss 2005a, Weiss 2006a). Medikamente, die zu einer Knochenmarksnekrose führen können sind Chemotherapeutika, Phenobarbital, Östrogene, Carprofen, Metronidazol, Fenbendazol und Mitotane (Weiss 2005a, Weiss 2006a).

Dabei scheinen Hunde mit idiopathischer Knochenmarksnekrose schwerere Anämien und seltener Neutropenien und Thrombozytopenien zu haben.

Bei beiden Formen erholen sich die meisten Hunde gut (Weiss 2005a).

Myelodysplastisches Syndrom/Dysmyelopoese:

Die Dysmyelopoese ist ein Oberbegriff zur Beschreibung von morphologischen Abnormalitäten in einer oder mehreren Zelllinien im Blut oder im Knochenmark (Weiss 2006a). Diese Erkrankungen sind u.a. durch eine nicht regenerative Anämie charakterisiert (Weiss and Aird 2001).

Drei Typen der Dysmyelopoese sind bei Hund, Katze und Mensch bekannt (Weiss 2005c, Weiss 2006b):

1) Myelodysplastisches Syndrom (MDS)

2) sekundäre Dysmyelopoese

3) kongenitale Dysmyelopoese (Pudel-Makrozytose, kongenitale Dyserythropoese, Polymyopathie und kardiale Erkrankung beim English Springer Spaniel, Vitamin B12-Malabsorption beim Riesenschnauzer, siehe Kapitel 2.2.2.5 und 2.2.2.6).

Das Myelodysplastische Syndrom beim Hund wird unterteilt in:

- MDS-RC: MDS mit refraktären Zytopenien
- MDS-SD: MDS mit „sideroblastic differentiation“
- MDS-EB: MDS mit exzessiver Myeloblastenanzahl (Weiss 2005c, Weiss 2006a)

MDS bei Hunden und Katzen gilt wie in der Humanmedizin als präleukämisches Stadium einer akuten myeloischen Leukämie (Hisasue *et al* 2000, Raskin and Krehbiel 1985). So entwickelten 4 von 16 Katzen mit MDS innerhalb von 4 Monaten nach Diagnosestellung (Hisasue *et al* 2000, Hisasue *et al* 2001) und 4 von 12 Hunden mit MDS (Weiss and Smith 2000) eine akute myeloische Leukämie.
Das primäre MDS scheint durch Mutationen in den pluripotenten Stammzellen zu entstehen, welche zu einem Wachstumsvorteil und zu einer klonalen Expansion führen. Aufgrund von dysplastischen Eigenschaften bei der Vermehrung dieser Stammzellen und einer beschleunigten Apoptose handelt es sich um eine ineffektive Hämatopoese, welche den Hauptgrund für die Zytopenien im peripheren Blut darstellt (Weiss and Aird 2001, Weiss and Smith 2000).
Hunde mit MDS-RC weisen eine mittel- bis hochgradige normozytär-normochrome nicht regenerative Anämie mit verschiedenen Anzeichen der Dysplasie in der erythroiden Zelllinie auf (Weiss 2006a). Das MDS-SD ist durch eine mikrozytäre oder hypochrome nicht regenerative Anämie mit zahlreichen Siderozyten im peripheren Blut charakterisiert. Bei allen Hunden mit MDS-EB waren in der Studie von Weiss Zytopenien von zwei oder drei Zelllinien nachzuweisen (Weiss 2006a).
Hunde mit primären Veränderungen der erythroiden Zelllinie haben deutlich längere Überlebenszeiten als Tiere mit Dysplasien in allen Zellreihen (Weiss and Smith 2000).
Eine sekundäre Dysmyelopoese wird im Zusammenhang mit IMHA, immunbedingter Thrombozytopenie, Lymphomen, multiplen Myelomen, Polyzythämia vera, Behandlung mit Chemotherapeutika (z.B. Vincristin, Melphalan) und anderen Medikamenten (Chloramphenicol, Cephalosporine, Östrogene) und bei akuten entzündlichen Erkrankungen beschrieben (Weiss 2005c, Weiss 2006a, Weiss and Aird 2001).
Die Differenzierung zwischen einem primären und sekundären MDS alleine basierend auf die Blut- und Knochenmarksuntersuchung ist sehr schwierig und nicht immer möglich (Weiss and Aird 2001).

Bei Katzen scheint das Feline Leukämievirus (FeLV) eine Rolle in der Entwicklung eines MDS zu spielen (Hisasue *et al* 2000, Hisasue *et al* 2001, Raskin and Krehbiel 1985, Shimoda *et al* 2000, Yates *et al* 1984). Bei mit FeLV infizierten Katzen sind die proliferierenden hämatopoetischen Zellen Klone, sodass von einer erworbenen Mutation in den hämatopoetischen Stammzellen ausgegangen werden muss. Die

sekundäre Dysmyelopoese kann durch Medikamente, Toxine und durch primäre Erkrankungen wie eine IMHA, eine immunbedingte Thrombozytopenie oder ein Lymphom hervorgerufen werden (Weiss 2006b).

Bei Katzen kommt das MDS in den Subkategorien MDS-EB (mit exzessiver Anzahl an Myeloblasten), MDS-RC (mit refraktären Zytopenien) und Varianten vor. Die Klassifikation in MDS-EB und MDS-RC erscheint sinnvoll, da es hinsichtlich der Schwere der klinischen Symptome und der Prognose Unterschiede gibt. Katzen mit MDS-EB haben schwerere klinische Symptome und kürzere Überlebenszeiten als Tiere mit MDS-RC (Weiss 2006b).

Die Unterscheidung eines MDS bei Katzen von einer sekundären Dysmyelopoese, welche durch immunbedingte Anämien hervorgerufen wird, kann schwierig sein, da bei beiden Erkrankungen eine schwere nicht regenerative Anämie, eine Autoagglutination und eine Metarubrizytose auftreten kann. Eine deutliche Makrozytose kommt eher bei einem MDS-RC vor (Weiss 2006b), wohingegen eine erhöhte Anzahl an kleinen Lymphozyten im Knochenmark von Katzen für eine IMHA oder PRCA spricht (Stokol and Blue 1999, Weiss 2005b). In einer Studie von Hisasue und Mitarbeitern hatten 94% der Katzen mit MDS eine mittel- bis hochgradige Anämie, die meist nicht regenerativen Charakter hatte (Hisasue *et al* 2000). Alle Katzen wiesen im Knochenmark oder im peripheren Blut neben dysplastischen Veränderungen in den anderen Zelllinien Anzeichen einer Dyserythropoese auf, 38%-56% davon eine Makrozytose (Hisasue *et al* 2000, Shimoda *et al* 2000). Bei FeLV-infizierten Katzen kommt es aufgrund einer inkompletten Zellteilung der Erythroblasten und damit einer ineffektiven Erythropoese ebenfalls zu makrozytären Erythrozyten im peripheren Blut. Da viele Katzen mit einem MDS gleichzeitig mit FeLV infiziert sind, ist es schwierig zu sagen, ob die ineffektive Erythropoese und damit die nachgewiesenen Makrozyten aufgrund des MDS oder aufgrund der FeLV-Infektion entstehen (Shimoda *et al* 2000).

Eine nicht regenerative Anämie kann bei einem felinen myelodysplastischen Syndrom als eine der häufigsten hämatologischen Abnormalitäten nachgewiesen werden (Hisasue *et al* 2001, Shimoda *et al* 2000).

Ein unterschiedlich hoher Prozentsatz an Katzen mit MDS ist mit FeLV infiziert. Die große Spanne der infizierten Tiere zwischen 36% (Weiss 2006b) und 92%-94% (Hisasue *et al* 2000, Shimoda *et al* 2000) könnte an der gesunkenen Prävalenz für FeLV und der Effektivität von Impfprogrammen liegen.

Die Prognose für Katzen mit MDS ist je nach gewähltem Therapiemanagement ungünstig, es sind jedoch Einzeltiere mit langen Überlebenszeiten von über einem Jahr beschrieben (Hisasue *et al* 2000, Hisasue *et al* 2001).

2.2.3.3.4 Erythroide Hypoplasie oder ineffektive Erythropoese

a) PURE RED CELL APLASIA (PRCA)

Die PRCA ist eine hämatologische Erkrankung bei Hund, Katze und Mensch und ist charakterisiert durch eine schwere, nicht regenerative Anämie mit starker Reduktion oder Fehlen von erythroiden Vorläuferzellen im Knochenmark (Stokol *et al* 2000). Leukozyten- und Thrombozytenzahlen sind normal oder erhöht. Eine primäre (Stokol *et al* 2000) und eine sekundäre Form ist beschrieben. Man geht davon aus, dass die primäre Form eine Variante der immunhämolytischen Anämie darstellt, bei der erythroide Vorläuferzellen im Knochenmark durch Antikörper zerstört werden. Die sekundäre Form der PRCA wurde bei einer Parvovirose-Infektion beschrieben und nach Behandlung mit rekombinantem humanen Erythopoetin (Antikörperbildung gegen Erythropoetin) (Weiss 2002b). Im Unterschied zur PCRA sind bei der nicht regenerativen immunmediierten hämolytischen Anämie die Vorläuferzellen der erythroiden Reihe normal oder erhöht (Stokol *et al* 2000).

Betroffen sind Tiere aller Rassen und meist mittleren Alters (2-13 Jahre), weibliche Tiere sind überrepräsentiert (Weiss 2002b). Labordiagnostisch kommen i.d.R schwere Anämie vor.

Hunde mit PRCA sprechen meist gut auf immunsuppressive Medikamente an, der Erfolg kann allerdings Wochen bis Monate dauern (Stokol *et al* 2000, Weiss 2002b). Die Prognose der Tiere mit PRCA ist ähnlich oder besser als bei Tieren mit regenerativer (Mortalität 29%) oder nicht regenerativer (Mortalität 28%) immunhämolytischer Anämie. D.h. eine fehlende Regeneration bei immunbedingten Anämien muss nicht gleichbedeutend mit einer schlechteren Prognose sein (Stokol *et al* 2000, Weiss 2002b).

Bei Katzen induziert der FeLV-Subtyp C eine nicht regenerative normozytär-normochrome Anämie (PRCA) (Abkowitz *et al* 1987, Dean *et al* 1992, Onions *et al* 1982, Quigley *et al* 2000, Riedel *et al* 1986). Durch den Nachweis einer Infektion aller hämatopoetischen Zellen (erythroid, myeloid, lymphoid) sowohl durch Subtyp C als auch durch Subtyp A (welcher keine Anämie auslöst) konnte kein selektiver

Zelltropismus des Virus für die erythroiden Knochenmarkszellen nachgewiesen werden (Abkowitz *et al* 1987, Dean *et al* 1992). Einen zytopathogenen Effekt in den erythroiden Vorläuferzellen verursacht nur der Subtyp C, woraus sich eine PRCA ohne andere Zytopenien entwickeln kann (Dean *et al* 1992).
Man geht davon aus, dass die nicht regenerative Anämie durch eine Störung der Differenzierung der BFU-E in die CFU-E durch das Virus entsteht (Abkowitz *et al* 1987, Quigley *et al* 2000). Der Rezeptor, der durch das Virus benutzt wird, kodiert für ein organisches Aniontransportprotein, das wahrscheinlich in die Akkumulation des Häms involviert ist und damit notwendig für die Synthese des Hämoglobins auf der Stufe des Übergangs von BFU-E zu CFU-E ist (Quigley *et al* 2000).

b) FELV-INDUZIERTE ERYTHROIDE HYPOPLASIE

FeLV kann erythroide Zellen direkt zerstören, sodass eine erythroide Hypoplasie entsteht. Des Weiteren kann es zu einer Transformation von Zellen in eine neoplastische Linie kommen mit defekter Zellfunktion, Zellmetabolismus und –ausreifung. Daher sterben die Zellen oft, bevor sie zu reifen Erythrozyten ausreifen, wodurch ebenfalls eine Anämie entsteht. Im Knochenmark können eine erythroide Hypoplasie, neoplastische Zellen oder megaloblastische Zellen gefunden werden (Stockham and Scott 2008). Siehe hierzu auch 2.2.3.3.4 a.

c) ERNÄHRUNGSBEDINGT

Ernährungsbedingte Mängel an z.B. Eisen, Folsäure oder Cobalamin können zu nicht regenerativen Anämien führen. Näheres ist unter Kapitel 2.2.2.5 b und 2.2.2.6 a beschrieben.

d) ENDOKRIN

Die HYPOTHYREOSE beim Hund kann mit einer geringgradigen normozytär-normochromen Anämie einhergehen (Squires 1993, Stockham and Scott 2008). Durch das erniedrigte freie T3 und T4 ist die Stoffwechselrate des Körpers herabgesetzt, sodass der Körper in der Peripherie weniger Sauerstoff benötigt. Dadurch wird weniger Erythropoetin gebildet und es werden weniger Erythrozyten produziert (Stockham and Scott 2008). Die Anämie entwickelt sich langsam und es

kann auch unter Therapie drei bis vier Monate dauern, bevor die Laborveränderungen in den Referenzbereich zurückgehen (Feldman 2005).
Ebenso eine geringgradige normozytär-normochrome Anämie kann bei Hunden mit HYPOADRENOKORTIZISMUS nachweisbar sein (Squires 1993, Stockham and Scott 2008). Als Pathogenese wird vermutet, dass durch die fehlenden Glukokortikoide eine relative Knochenmarkssuppression entsteht. Dazu kann evtl. ein gastrointestinaler Blutverlust kommen (Stockham and Scott 2008).
Durch östrogenproduzierende Hoden- oder Ovartumoren oder die Verabreichung von exogenen Östrogenen ist eine schwere nicht regenerative Anämie im Rahmen einer Panzytopenie bei einer Östrogenintoxikation beschrieben (Squires 1993, Stockham and Scott 2008) (siehe unter 2.2.3.3.3 b).

e) CHRONISCHE LEBERERKRANKUNGEN

Die Pathophysiologie der Anämie bei chronischen Lebererkrankungen ist sehr vielschichtig. Ein Mechanismus dabei ist eine defekte Aminosäure-/Proteinsynthese und ein veränderter Fettstoffwechsel, was zu veränderten Erythrozytenformen (Akanthozyten, Fragmentierung) und damit zu einer verkürzten Lebensdauer führt (Stockham and Scott 2008, Weiss and Tvedten 2006). Des Weiteren kommen eine Knochenmarkssupression durch zirkulierende Toxine sowie hämolytische Krisen vor. Bei schweren Leberinsuffizienzen sind Blutungsanämien durch eine verminderte Produktion von Gerinnungsfaktoren beschrieben (Moritz *et al* 2006). Außerdem kann es durch eine reduzierte Leberfunktion zu einem Mangel an Nährstoffen für die Hämatopoese kommen (Weiss and Tvedten 2006). In einigen Fällen ist die Anämie bei Lebererkrankungen eine AID (Stockham and Scott 2008).

2.3 Möglichkeiten zur Beurteilung der Regenerationsfähigkeit

2.3.1 Blutausstrich

a) MORPHOLOGIE

Als Antikoagulanz für das entnommene Blut für die Anfertigung eines Blutausstriches wird Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) empfohlen, da es die zellulären Details besser erhält als andere Antikoagulantien wie Heparin oder Zitrat. Zur Beurteilung der Morphologie der Erythrozyten sollte der Bereich auf dem Blutausstrich gewählt werden, in dem sich ungefähr die Hälfte der RBCs berühren ohne sich zu überlappen (Metzger and Rebar 2004).

Eine Regeneration ist auf einem gefärbten Blutausstrich durch eine erhöhte Anzahl an polychromatischen Zellen und Zellen unterschiedlicher Größe (Anisozytose) zu erkennen. Polychromatische Zellen sind unreife RBCs, die sich aufgrund ihres Rest-RNA-Gehalts bläulich anfärben (Metzger and Rebar 2004). Beim Hund entsprechen die polychromatophilen Zellen den Retikulozyten (aber nicht alle Retikulozyten sind polychromatisch), bei Katzen nur den aggregierten Retikulozyten, nicht jedoch der punktierten Form (Weiss and Tvedten 2006). Bei beiden Spezies spricht eine Polychromasie für eine gesteigerte Erythropoese im Knochenmark vor 3-7 Tagen (Weiss and Tvedten 2006).

Desweiteren können Howell-Jolly-Körperchen (verbliebenes Kernmaterial) in Erythrozyten Hinweise auf eine Regeneration darstellen. Target-Zellen kommen häufig bei regenerativen Anämien im Blutausstrich vor, werden aber bei einer Vielzahl von anderen Krankheiten wie Leber- und Nierenerkrankungen ebenso gefunden.

Bei hochgradiger Regeneration können auch kernhaltige Vorläuferzellen (nucleated red blood cells, NRBC) im Blut nachgewiesen werden. Allerdings geben zirkulierende kernhaltige Zellen ohne nachgewiesene Polychromasie Hinweise auf eine Knochenmarks- oder Milzerkrankung, eine Bleiintoxikation, eine extramedulläre Hämatopoese, einen Hyperadrenokortizismus oder eine Leukämie (Villiers 2007, Weiss and Tvedten 2006).

SPHÄROZYTEN:

Anhand der Sphärozyten ist es nicht möglich, die Regenerationsfähigkeit zu beurteilen. Da sie jedoch für die Diagnosestellung der immunhämolytischen Anämie wichtig sind, sollen sie hier besprochen werden.

Sphärozyten sind RBCs, die ihre normale bikonkave Form verloren haben und sich dadurch intensiver anfärben als normale Erythrozyten. Sie besitzen keine zentrale Aufhellung und wirken kleiner als normale RBCs (Metzger and Rebar 2004). Im Rahmen einer IMHA entstehen Sphärozyten durch die Interaktion von RBCs mit Makrophagen in der Milz. Die Interaktion zwischen membrangebundenen Immunglobulinen und dem F_c-Rezeptor phagozytierender Zellen führt zu einer partiellen Phagozytose der Erythrozytenmembran. Dadurch wird die Zelloberfläche reduziert, wodurch sich die Zellen aufkugeln, die zelluläre Deformabiliät nimmt ab und es erfolgt ein schnellerer Abbau. Im Gegensatz zur hereditären Sphärozytose betrifft dies nur zirkulierende adulte Erythrozyten und nicht ihre Vorläuferzellen (Da Costa *et al* 2001).

Kutter und Mitarbeiter beschreiben in zwei Studien, dass vom ADVIA® 120 gemessene humane hyperchrome Erythrozyten Sphärozyten entsprechen, die für die schnelle Elimination in retikulo-endothelialen Zellen bestimmt sind. Ein erhöhter Anteil hyperchromer Erythrozyten weist auf eine gesteigerte Hämolyse hin. Eine signifikante Hyperchromie stellt beim erwachsenen Mann einen Marker für eine Eisenüberladung dar (Kutter *et al* 2003, Kutter 2005).

Beim Hund können Sphärozyten genauso wie Blutparasiten und Howell-Jolly-Körperchen mittels Durchflusszytometrie nicht erkannt werden (Tvedten *et al* 2000), sodass eine Quantifizierung der Sphärozyten im Monolayer eines Blutausstrichs bei 1000facher Vergrößerung vorgenommen werden sollte (Weiss and Tvedten 2006):

Grad	Anzahl an Sphärozyten je Ölimmersionsfeld	Prozentuelle Anzahl an Sphärozyten je Ölimmersionsfeld
1+	5-10	2-4%
2+	11-50	4-20%
3+	51-150	20-60%
4+	>150	>60%

Tabelle 2.1: *Quantifizierung der Sphärozyten im Blutausstrich nach Weiss und Tvedten 2006*

b) SUPRAVITALFÄRBUNGEN

Die manuelle Auszählung von Retikulozyten durch supravitalgefärbte Ausstriche wurde in den 1940iger Jahren etabliert und stellt bis heute die Standard-Methode in der Veterinärmedizin dar (Perkins and Grindem 1995, Riley *et al* 2001).

Retikulozyten können identifiziert werden, indem man sich die Anfärbbarkeit verbliebender RNA- und Zellorganellreste (aggregierte Ribosomen, Mitochondrien und Organellen), der sog. Substantia retikulo-granulo-filamentosa, zu Nutze macht. Geeignete Färbungen sind Neumethylen-Blau und Brillantkresyl-Blau (Giger 2005, Villiers 2007, Weiser and Kociba 1982). EDTA-Blut wird zu gleichen Teilen mit einer der genannten Färbungen versetzt und 15-20 Minuten inkubiert (Weiss and Tvedten 2006). Nach Lufttrocknung des Ausstrichs werden 500, 1000 oder 2000 Erythrozyten ausgezählt und der Prozentsatz der Retikulozyten bestimmt (Weiss and Tvedten 2006).

Fast alle Retikulozyten des Hundes stellen sich in der aggregierten Form dar, die wenigen punktierten Formen sind klinisch nicht von Bedeutung (Villiers 2007, Weiss and Tvedten 2006). Die Retikulozyten sind größer als reife Erythrozyten und enthalten große Klumpen an aggregierten Ribosomen (Villiers 2007). Beim Hund entsprechen die Retikulozyten annähernd den Polychromatophilen im gefärbten Blutausstrich (Weiss and Tvedten 2006).

Bei Katzen werden zwei Formen von Retikulozyten unterschieden: Punktierte und aggregierte Retikulozyten. Punktierte Retikulozyten sind reifer, haben eine ähnliche Größe wie reife Erythrozyten und enthalten zwei bis fünf feine Punkte an Rest-RNA (Villiers 2007). Punktierte Retikulozyten sind sowohl physiologischerweise als auch bei Erkrankungen in einer großen Menge vorhanden (Weiss and Tvedten 2006). Aggregierte Retikulozyten reifen innerhalb von 12 Stunden in die punktierte Form aus, nach weiteren 10 Tagen entstehen reife Erythrozyten (Giger 2005, Metzger and Rebar 2004). Aufgrund der langen Reifungszeit der punktierten Retikulozyten sammeln sie sich in dementsprechend größerer Anzahl im Blut an als die aggregierte Form (Weiss and Tvedten 2006). Die Polychromatophilen im gefärbten Blutausstrich der Katze entsprechen etwa der Anzahl der aggregierten Retikulozyten (Weiss and Tvedten 2006). Daher sollten nur die aggregierten Formen in die Zählung mit einbezogen werden (Villiers 2007).

In einer Studie von Weiser und Kociba erreichte die Zahl der aggregierten Retikulozyten 11 Tage nach Induktion einer hämolytischen Anämie durch Heinz-

Körperchen ihren Höhepunkt und lag nach 25 Tagen wieder im Referenzbereich. Die punktierten Retikulozyten waren zwischen den Tagen 15 und 25 am höchsten und gingen am Tag 40 in den Referenzbereich. Die größte Makrozytose war mit dem Hoch der aggregierten Retikulozyten an Tag 11 zu erkennen und an Tag 21 waren die aggregierten Retikulozyten weniger groß als die nicht retikulierten Makrozyten (Weiser and Kociba 1982).

2.3.2 Automatisierte Verfahren

a) RETIKULOZYTEN

Die Retikulozytenzählung im Blut stellt den Gold-Standard zur Differenzierung von regenerativen und nicht regenerativen Anämien und damit zur Bestimmung des Grades der Erythropoese dar (Neiger *et al* 2002, Weiss and Tvedten 2006).
In den letzten Jahren sind automatisierte Messmethoden für die Bestimmung der absoluten und prozentualen Retikulozytenzahlen entwickelt worden. Diese basieren auf durchflusszytometrischen Messungen der Retikulozyten nach deren Anfärbung mit fluoreszierenden (Auramin O, Thiazol orange) und nicht-fluoreszierenden Färbungen (Neumethylenblau). Die Geräte mit fluoreszierenden Farbstoffen scheinen sensitiver in der Entdeckung geringer Mengen an RNA zu sein (Siekmeier *et al* 2000).
Die Bestimmung von Retikulozyten mittels Durchflusszytometrie reduziert die Variabilität der Resultate durch die Unabhängigkeit vom Untersucher, ist weniger zeitintensiv und erlaubt die Messung einer größeren Anzahl von Zellen, wodurch eine bessere Präzision erreicht werden kann als durch die manuelle Auszählung (Evans and Fagg 1994, Riley *et al* 2001, Siekmeier *et al* 2000).

Die prozentuale Retikulozytenzahl gibt das Verhältnis von Retikulozyten zu reifen Erythrozyten an. Durch die unterschiedliche Erniedrigung der Erythrozytenzahl im Rahmen der Anämie wird die Regeneration anhand des Retikulozytenanteils in Prozent leicht überschätzt (Weiss and Tvedten 2006).
Daher ist die Bestimmung der absoluten Retikulozytenzahl sinnvoll (Weiss and Tvedten 2006). Dies gilt als die beste Methode für die Erythrozytenregeneration bei Hund und Katze, da sie eine einheitliche Beurteilung der Knochenmarkantwort ermöglicht (Weiss and Tvedten 2006). Die Berechnung der absoluten

Retikulozytenzahl erfolgt durch die Multiplikation der prozentualen Retikulozytenzahl mit der Erythrozytenzahl:

Absolute Retikulozyten-Zahl (10^9/l) = RBC (10^{12}/l) x Retikulozyten (%) x 10

In die Interpretation der Anzahl der Retikulozyten im peripheren Blut muss sowohl die Zeit nach Beginn der Anämie als auch das Ausmaß der Anämie und Retikulozytose mit einbezogen werden (Weiss and Tvedten 2006).
Beim Hund muss zusätzlich eine mögliche extramedulläre Erythropoese in der Milz beachtet werden, was das Einschätzen einer Regeneration bei hämolytischen Patienten verkompliziert (Jones and Gruffydd-Jones 1991).

b) MCV, MCHC, RDW

Die Möglichkeit zur automatisierten Retikulozytenmessung ist in der Praxis nicht überall verfügbar und die Beurteilung der Regeneration im Blutausstrich ist nicht immer zufriedenstellend. Durch die Auswertung der hämatologischen Parameter MCV, MCHC und RDW können ebenfalls Hinweise auf regenerative Prozesse erlangt werden. Im Vergleich zu reifen Erythrozyten haben Retikulozyten einen höheren MCV und RDW sowie einen niedrigeren MCHC bzw. CHCM (corpuscular hemoglobin concentration mean) (Bovy *et al* 2005, Moritz *et al* 2004).

MCV = Mean corpuscular volume
Das Vorhandensein von unreifen erythroiden Zellen im peripheren Blut geht mit einer Makrozytose und damit mit einem Anstieg des MCV einher, weil die jüngeren Zellen größer sind als die ausgereiften Formen. Der MCV bei hämolytischen Anämien kann Werte bis zu 100 fl erreichen (Jones and Gruffydd-Jones 1991). Die Hauptursache für eine Makrozytose liegt in der Retikulozytose, besonders 4-5 Tage nach Beginn einer Anämie (Weiss and Tvedten 2006).

MCHC = Mean corpuscular hemoglobin concentration
Ein erniedrigter MCHC spricht für eine Hypochromasie der Erythrozyten und ist ein typischer Befund zusammen mit einer Makrozytose bei unreifen Erythrozyten im Rahmen einer Regeneration. Die Hypochromasie entsteht dadurch, dass die

erythroiden Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut freigesetzt werden, bevor die Hämoglobinsynthese abgeschlossen ist (Stockham and Scott 2008, Weiss and Tvedten 2006).

RDW = Red blood cell distribution width

Der RDW ist ein Koeffizient zur Messung der Heterogenität der Größe roter Blutzellen im peripheren Blut und stellt damit einen quantitativen Index der Anisozytose dar. Dieser Index der Anisozytose ist sensitiver als der MCV oder die Beurteilung der roten Blutzellen mittels Blutausstrich (Bessman and Johnson 1975). Die Bestimmung des RDW erfolgt anhand von automatisierten Hämatologiegeräten. Dabei wird aus dem Histogramm die RBC-Verteilungsbreite auf 50%iger Höhe der Maximalamplitude mit der Gesamt-RBC-Verteilungsbreite verglichen und ins Verhältnis gesetzt (Neiger *et al* 2002).

Es ist zu beachten, dass die Normalwerte für den RDW und den MCV für jedes individuelle Hämatologiegerät etabliert sein müssen, weil die Messmethoden zur Bestimmung der RBC-Größe sich stark unterscheiden (Neiger *et al* 2002).

c) GRAFISCHE DARSTELLUNGEN

Wenn nur eine geringe Anzahl an Zellen der Erythrozytenpopulation (5-20%) morphologisch verändert ist, geben die Erythrozytenindizes oft keinen Hinweis auf die Art der Anämie (Weiss and Tvedten 2006). Die grafische Darstellung der Zellen anhand von neueren Laborgeräten wie dem ADVIA® 120 sowie dem Cell-Dyn® 3500 erleichtert die Diagnosestellung durch die Visualisierung der abnormalen Zellpopulationen erheblich (Tvedten *et al* 2000, Tvedten 1999, Weiser and Kociba 1982). Damit können auch kleine Subpopulationen an z.B. makrozytär-hypochromen Zellen detektiert werden, auch wenn MCV und MCHC normal sind (Tvedten 1999).

Die makrozytär-hypochromen Erythrozyten sind in der Regel unreife Erythrozyten und ihre Anzahl reflektiert die Höhe der regenerativen Knochenmarksantwort. Die Anzahl der makrozytär-hypochromen Erythrozyten korreliert gut mit der Anzahl der Retikulozyten, v.a. auf dem Peak der Retikulozytenproduktion 4-5 Tage nach Beginn einer schweren Anämie (Weiss and Tvedten 2006).

2.3.3 RI, RPI

Der Retikulozytenindex (RI oder korrigierte Retikulozyten Prozent (CRP)) berechnet sich wie folgt:

$$\text{RI} = \text{Retikulozytenzahl (\%)} \times \frac{\text{Hkt des Patienten}}{45}$$

Damit kann der RI nur mit Hilfe einer Hämatokritzentrifuge und eines Mikroskops zur Auszählung der prozentualen Retikulozytenzahl bestimmt werden. Ein Retikulozytenindex über 1 spricht beim Hund für eine Regeneration.

Mit zunehmendem Schweregrad der Anämie werden die Retikulozyten immer früher aus dem Knochenmark freigesetzt und halten sich länger im peripheren Blut auf, bevor sie zu Erythrozyten reifen (Squires 1993, Weiss and Tvedten 2006). Die längere Verweildauer im Blut führt zu einem Anstieg der prozentualen Retikulozytenzahl, der nicht auf einer gesteigerten Produktion im Knochenmark basiert (Villiers 2007, Weiss and Tvedten 2006). Durch einen „Reifungsfaktor“ wird einer Überschätzung der Knochenmarksantwort entgegengewirkt (Moritz *et al* 2006, Squires 1993). Dieser korrigierte Retikulozytenindex wird Retikulozyten-produktionsindex (RPI) genannt und wird wie folgt berechnet:

$$\text{RPI} = \frac{\text{RI}}{\text{Reifungsfaktor}}$$

Hämatokrit (%)	Erwartete Lebensdauer der Retikulozyten (Tage)
45	1,0
35	1,5
25	2,0
15	2,5

Tabelle 2.2: *PCV-abhängige Reifungsfaktoren aus der Humanmedizin nach Weiss und Tvedten, 2006*

Der RPI gibt an, um welchen Faktor die normale Retikulozytenproduktion gesteigert ist (Köck 1998).

Ein RPI von < 1 weist auf eine aregenerative Anämie hin, während Werte >2 eine Erhöhung der Retikulozytenproduktion widerspiegelt. Werte zwischen 1 und 2 werden als hyporegenerativ angesehen (Moritz *et al* 2006).

Bei der Katze ist die Lebensdauer von Retikulozyten im Blut in Abhängigkeit vom Schweregrad der Anämie nicht genau bekannt, sodass die Berechnung des RI und RPI für die Katze nicht empfohlen wird (Weiss and Tvedten 2006).

Spezifischere Richtlinien zur Interpretation des korrigierten RPI in der Veterinärmedizin sind derzeit nicht verfügbar (Villiers 2007, Weiss and Tvedten 2006).

3. Material und Methoden

3.1 Patientengut

In die Studie eingeschlossen werden Blutproben von 329 Hunden und 77 Katzen unabhängig von Alter, Geschlecht oder Rasse aus dem Patientengut des Klinikums Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Tiere werden zur Diagnostik oder zu Kontrolluntersuchungen in die Klinik gebracht. Aufgrund von Verlaufskontrollen sind einzelne Tiere mehrfach vertreten.
Bei den Hunden sind Vertreter vieler Rassen vorhanden, das mediane Alter liegt bei 7 Jahren (von 4 Monaten bis 16 Jahren). 173 Tiere sind männlichen (davon 51 männlich-kastriert) und 156 weiblichen (davon 61 weiblich-kastriert) Geschlechts.
56 der 77 kranken Katzen gehören der Rasse Europäisch Kurzhaar an. Außerdem sind die Rassen Perser (6), Maine Coon (4), Britisch Kurzhaar (2), Birma (2), Norwegische Waldkatze (2), Orientalisch Kurzhaar (1), Siam (1) und Savannah (1) vertreten. Das Alter der Katzen liegt zwischen 6 Monaten und 16 Jahren (Median 9 Jahre). 34 Tiere sind männlich (26 davon männlich-kastiert) und 43 weiblich (davon 37 weiblich-kastriert).

Für die Kontrollgruppen wird Blut von 60 gesunden Hunden und 44 gesunden Katzen entnommen, welche im Rahmen einer Vorsorgeuntersuchung oder zur Erstblutspende vorgestellt werden. Als gesund werden Tiere definiert, welche für die Besitzer und in der klinischen Untersuchung keine Krankheitsanzeichen aufweisen.
Aus dieser Population werden eigene Referenzwerte erstellt.
Die 60 Hunde sind 1-15 Jahre alt (Median 4 Jahre); es sind 31 Rüden (davon 13 kastriert) und 29 Hündinnen (davon 14 kastriert) vorhanden.
Das Alter der 44 Katzen beträgt 5 Monate bis 17 Jahre (Median 4 Jahre). 29 Tiere sind männlichen (davon 26 männlich-kastriert) und 15 Tiere weiblichen Geschlechts (davon 12 weiblich-kastriert). 33 Tiere repräsentieren die Rasse Europäisch Kurzhaar, 7 die Rasse Maine Coon und die Rassen Abessinier, Britisch Kurzhaar, Norwegische Waldkatze und Türkisch Angora sind jeweils einmal vertreten.

3.2 Blutprobenentnahme

Das Blut wird mit einer sterilen Einwegskanüle (20G, 0,9 x 40 mm, BD Microlance 3) aus der Vena cephalica antebrachii, der Vena saphena, der Vena femoralis oder der Vena jugularis entnommen.
Als Antikoagulanz werden 1,3 ml Volumen fassende K_3-EDTA Röhrchen (Firma Sarstedt, Nümbrecht) verwendet.

3.3 Probenverarbeitung

Die Blutproben werden innerhalb von 4-6 Stunden nach Blutprobenentnahme an den entsprechenden Geräten analysiert. Die Analyse sowie die Technologie der einzelnen Geräte werden im Folgenden erläutert.

Verwendete Geräte:

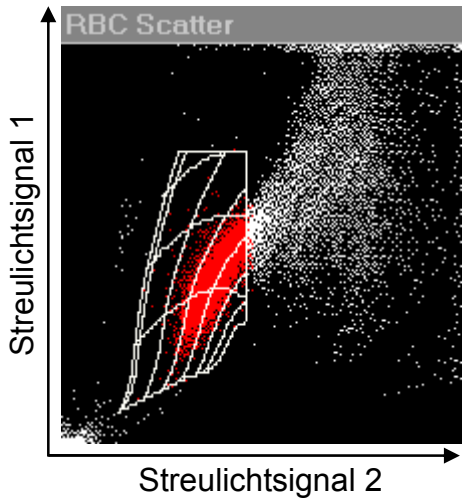
- ADVIA® 120, Siemens Medical Solutions, Siemensstraße 3, 35463 Fernwald, Deutschland
  Version 3.1.8.0-MS
- LaserCyte®, IDEXX Laboratories, Inc., One Idexx Drive, Westbrook, Maine 04092, USA
  Softwareversion 1.40.257.553 (2004)
  LaserCyte® 1: DXBP003541 (abgekürzt im Folgenden als LCrot)
  LaserCyte® 2: DXBP002687 (abgekürzt im Folgenden als LCblau)

Beiden Geräten liegt die Technologie der Durchflusszytometrie zugrunde. Bei dieser Technik werden die zu analysierenden Zellen einzeln (Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung) durch einen Lichtstrom geleitet, der durch einen Laser produziert wird. Das auf die Zellen auftreffende Laserlicht wird in unterschiedlicher Intensität absorbiert und gestreut, was in der Analyse genutzt wird, um die Zellen zu charakterisieren (Idexx Laboratories 2004, Moritz 2000, Wenger-Riggenbach 2006).

3.3.1 ADVIA® 120

Die Kalibration und die Wartung des ADVIA® 120 werden regelmäßig durch das Wartungspersonal der Firma Bayer durchgeführt. Dafür werden Proben frischen Humanblutes nach Richtlinien der Herstellerfirma verwendet.
Qualitätskontroll-Proben werden täglich analysiert, bei Bedarf können Kontroll-Proben verwendet werden, die von der Herstellerfirma bereitgestellt werden.
Jede Blutprobe wird einmal am ADVIA® 120 gemessen. Hierfür wird für Hunde und Katzen die Testanforderung CBC/DIFF/RETI (kleines Blutbild, Differentialblutbild, Retikulozyten) gewählt.

Beim ADVIA® 120 handelt es sich um ein weit verbreitetes und gut etabliertes Hämatologie-System zum Einsatz in der Veterinärmedizin in Großlabor-Einrichtungen. Die Technologie des Instruments basiert auf der Doppelwinkel-Laser-Streulichtmessung.
Das Gerät verfügt über die Routineparameter der Zellzählung inklusive einer 5-Zell-Differentialblut-Analyse. Außerdem ist der ADVIA® 120 in der Lage, die prozentuale und absolute Retikulozytenanzahl zu bestimmen.
Im RBC-Kanal werden die Erythrozyten mit Sodium-Dodecyl-Sulfat isovolumetrisch aufgekugelt, mit Glutaraldehyd fixiert und mittels einem low-angle (2°-3°) und einem high-angle (5°-15°) Scatter analysiert (Harris *et al* 2005b, Moritz 2000). Dabei ist das Streulichtsignal S1 (low angle scatter) dem Zellvolumen und das Streulichtsignal S2 (high angle scatter) der Hämoglobinkonzentration proportional.
Der ADVIA® 120 bestimmt die Größe und den Hämoglobingehalt jedes einzelnen Erythrozyten, wodurch die Quantifizierung der RBCs außerhalb des normozytär-normochromen Bereichs möglich wird (Absolut- und Prozentzahl) (Moritz *et al* 2004).
Der Hämoglobingehalt wird nach Lyse der Erythrozyten durch eine modifizierte Cyanmethämoglobin-Methode photometrisch ermittelt. Zusätzlich erfolgt durch einen Vergleich des MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration) mit dem CHCM (corpuscular hemoglobin concentration mean) eine interne Kontrolle der Hämoglobinkonzentration. Der Parameter CHCM wird direkt gemessen, während der MCHC durch HGB, MCV und RBC errechnet wird (Harris *et al* 2005a, Moritz 2000).



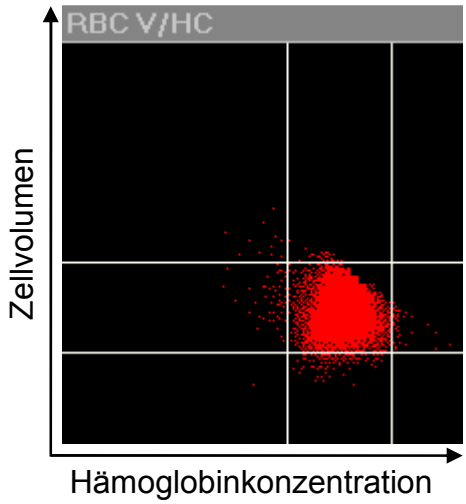
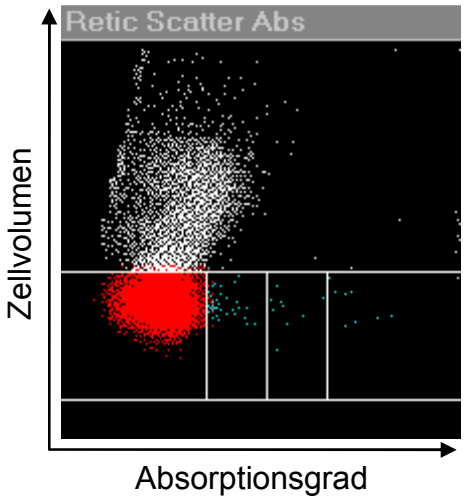


Abbildung 3.1: *RBC Scatter/Mie-Map* **Abbildung 3.2:** *RBC-Matrix/TIC TAC TOE Hund Nr. 99990105*

Die Ergebnisse der Messungen können wie in Abbildungen 3.1-3.4 gezeigt grafisch dargestellt werden. Im RBC Scatter (Abb. 3.1) werden nach der Mie-Theorie alle Zellen mit gleichem Volumen und gleichem Brechungsindex auf der zugrunde liegenden „Mie-Map“ gruppiert. Dabei wird auf der x-Achse das Streulichtsignal 2 und auf der y-Achse das Streulichtsignal 1 aufgetragen. Aus der Verwendung der direkt gemessen Parameter Erythrozytenvolumen und Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (RBC V/HC) entsteht die RBC-Matrix oder TIC TAC TOE (Abb. 3.2).

Das Gerät errechnet aus den direkt gemessenen Variablen Erythrozytenvolumen und der Mittleren Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (CHCM) die weiteren Parameter (PCV, MCV, RDW, HDW, MCHC).

Die Retikulozytenmessung basiert auf der 2-Winkel Laserstreulichmethode in Kombination mit der charakteristischen Absorption der isovolumetrisch aufgekugelten Zellen nach Anfärbung der ribosomalen RNA (Substantia reticulo-granulofilamentosa) mit Oxazin 750 (Neumethylenblau-Abkömmling) (Harris *et al* 2005b, Moritz *et al* 2004). Das Zellvolumen wird auf der vertikalen Achse dargestellt, die wachsende Absorption auf der horizontalen Achse. Je mehr Farbstoff in einer Zelle vorhanden ist, desto weiter rechts erscheint diese in der grafischen Darstellung.



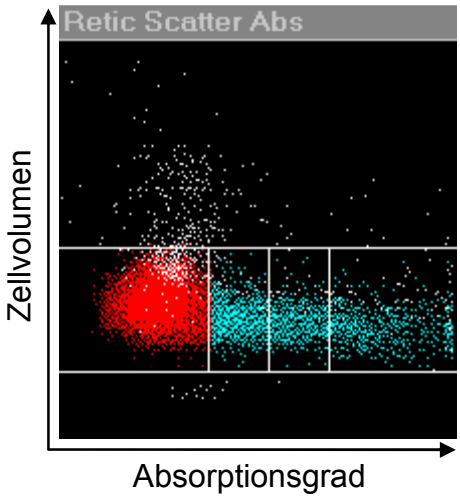


Abbildung 3.3: *Hund Nr. 99990105* **Abbildung 3.4:** *Hund Nr. 90016603*

Für Abbildung 3.3 und 3.4:

rot=reife Erythrozyten; türkis=Retikulozyten mit niedriger, mittlerer und hoher Absorption

Zur Separierung der angefärbten Retikulozyten von den ungefärbten RBCs wird ein Absorptions-Threshold (Schwellenwert) angewendet. Die Zellen mit einer höheren Absorption als der Threshold werden als Retikulozyten angesehen (Riley *et al* 2001). Drei Unterklassen an Retikulozyten, mit hoher, mittlerer und niedriger Absorption des Farbstoffes werden so quantifiziert. Je höher der Absorptionsgrad, desto niedriger ist die Reifungsstufe des Retikulozyten. Zusätzliche Retikulozytenindizes beinhalten den MCV der Retikulozyten (MCVr), RDW der Retikulozyten (RDWr), CHCM der Retikulozyten (CHCMr) und HDW der Retikulozyten (HDWr) (Moritz *et al* 2004).

3.3.2 LaserCyte®

Der LaserCyte® ist das erste In-House-Hämatologiegerät auf Basis der Laser-Durchflusszytometrie zum Einsatz in der Kleintiermedizin. Das Gerät bestimmt Werte für Zellzählung inklusive 5-Zell-Differenzialblutbild und für Retikulozyten von Hund und Katze.

Für die Analyse am LaserCyte® wird das K_3-EDTA antikoagulierte Blut in spezielle Röhrchen umgefüllt (BD Vacutainer, No Additive, Franklin Lakes, NJ 07417-1885, USA), welche für den Probenhalter des LaserCytes® konstruiert sind. Die Proben werden bei ausreichendem Blutvolumen an zwei LaserCyte®-Geräten (LCrot und LCblau) analysiert.

Um die jeweiligen Zellen zu charakterisieren, werden der Grad der Absorption oder Extinction (EXT) (0°-0,5°), die Richtung des gestre uten Lichts (low angle forward scatter (FSL) (1°-3°), high angle forward scatter (FSH) (4°-9°), right angle scatter (RAS) (50°-130°), die Menge an gestreutem Licht und die Zeit, die eine Zelle dem Laserstrahl ausgesetzt ist (time of flight (TOF) von linsenlosen optischen Detektoren verarbeitet (Idexx Laboratories 2008, Wenger-Riggenbach 2006). EXT liefert Informationen über die Lichtabsorption, FSL über die Zellgröße, TOF über den zellulären Durchmesser, FSH über die Komplexität und RAS über die Granularität der analysierten Zelle.

Die Analyse beim LaserCyte® erfolgt in zwei Schritten: Zuerst werden die Parameter RBC, RETI, PLT, MCV und MPV ermittelt. Die zur Analyse benötigten Röhrchen (CBC5R) enthalten Neumethylenblau, Purfac-A-39-Pric zur Aufkugelung der sphärischen Erythrozyten, Puffer und Latexkugeln. Die Latex-Partikel (Qualibeads) befinden sich in einer definierten Konzentration in den Röhrchen und dienen als zellulärer Trägerstoff sowie als interner Standard zur Qualitätskontrolle jeder einzelnen Probe.

Zur Retikulozytenzählung wird die Rest-RNA der Zelle mit Neumethylenblau angefärbt.

Im zweiten Schritt werden die RBCs durch die Zugabe einer hypotonen Lösung osmotisch lysiert und die Zählung der WBCs und die WBC-Differenzierung kann durchgeführt werden.

Die Hämoglobinkonzentration wird photometrisch auf zwei unterschiedliche Arten gemessen: Im ersten Analyseschritt werden nicht lysierte Methylenblau-gefärbte RBCs gemessen und nach der Lyse der RBCs wird die freie Hämoglobinkonzentration in der Lösung bestimmt. Weil die Membran der roten Blutkörperchen das Laserlicht ebenfalls streut, ist die Methode mit nicht lysierten Zellen weniger präzise. Der Vergleich beider Messmethoden erlaubt eine interne Kontrolle der Verdünnungen.

Die Zeit für die Analyse einer Blutprobe beträgt ca. 13 Minuten.

Das Gerät bildet verschiedene Scattergramme und Histogramme ab (Idexx Laboratories 2008, Wenger-Riggenbach 2006).

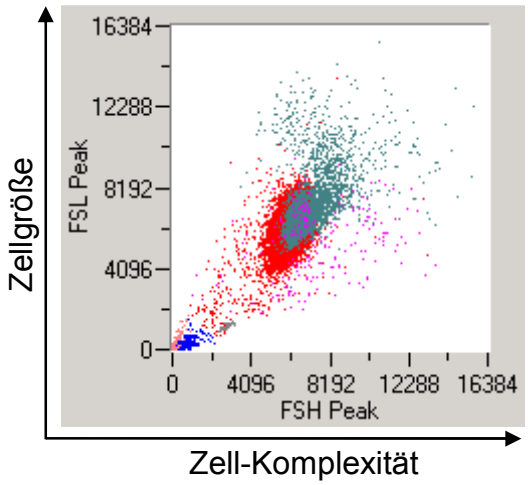


Abbildung 3.5: *Hund Nr. 99990105*

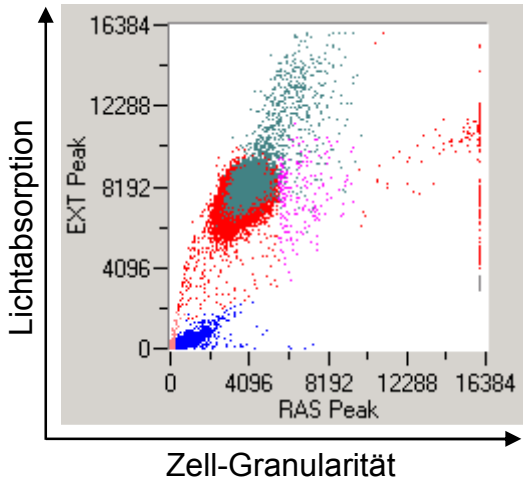


Abbildung 3.6: *Hund Nr. 99990105*

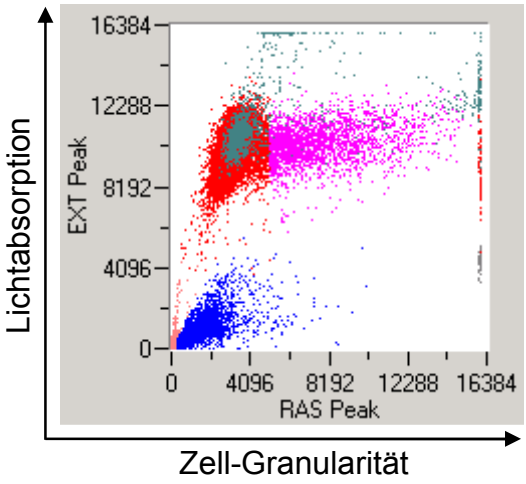


Abbildung 3.7 *Hund Nr. 90016603*

Für Abbildungen 3.5-3.7:
Rot: Erythrozyten
Blau: Thrombozyten
Magenta: Retikulozyten
Grün: Erythrozyten-Duplets
Pink: RBC-Fragmente

In Abbildung 3.5 ist das Scattergramm der Erythrozyten sichtbar, bei dem die Komplexität (FSH) auf der x-Achse gegen die Zellgröße (FSL) auf der y-Achse aufgetragen wird.

In Abbildung 3.6 ist ein Hund mit niedriger Retikulozytenzahl und in Abbildung 3.7 ein Hund mit erhöhter Retikulozytenzahl dargestellt. Auf der y-Achse ist die Menge des Laserlichts aufgetragen, welches die jeweilige Zelle absorbiert hat (EXT). Die x-Achse stellt ein Maß für die Granularität dar (RAS), sodass die Retikulozyten

(magenta) aufgrund der angefärbten Rest-RNA und damit hohen Granularität weit rechts zu liegen kommen.

3.3.3 Hämatokritzentrifuge

Von jeder Blutprobe wird durch die Verwendung einer Hämatokritzentrifuge (Hettich Zentrifuge, Haematokrit 24) der Mikrozentrifugenhämatokrit bestimmt. Hierfür werden zwei Kapillaren gefüllt und 4 min bei 12000 U/min-1 (5000 g) zentrifugiert. Mit Hilfe einer Hämatokritschablone wird der PCV (packed cell volume) ermittelt und der Mittelwert aus beiden Messungen gebildet.
Die beschriebene Bestimmung des Hämatokritwertes stellt die Referenzmethode dar und erfüllt die Anforderungen nach DIN 58934-1, 1997 des Normenausschusses Medizin im Deutschen Institut für Normung e.V..
Die Blutproben erkrankter Tiere werden durch die Messung des Mikrohämatokrits in Tiere mit Anämie und Tiere ohne Anämie klassifiziert.
Mit einem Mikrohämatokrit von < 0,40 l/l beim Hund und < 0,28 l/l bei der Katze wird eine Blutprobe als anämisch definiert.

3.3.4 Retikulozytenfärbung (Supravitalfärbung)

Für die spezielle Anfärbung der Retikulozyten wird die Färbelösung Brillantkresyl-Blau (Reticulocyte Stain Nr. R4132, SIGMA ALDRICH®) verwendet. Der Farbstoff färbt die verbliebenen RNA- und Zellorganellreste in Retikulozyten an. Dafür werden gleiche Mengen EDTA-Blutes und Färbelösung (jeweils 20 µl) vermischt und für 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem Mischen werden Ausstriche angefertigt und luftgetrocknet. 1000 rote Blutzellen werden unter Ölimmersion (1000er Vergrößerung) ausgezählt, die Anzahl der Retikulozyten bestimmt und zur Anzahl der RBC des ADVIA® 120 ins Verhältnis gesetzt (Angabe des Anteils an Retikulozyten in Prozent). Die manuelle Auszählung erfolgt durch einen Untersucher drei Mal, sodass ein Mittelwert gebildet wird. Aus der so ermittelten prozentualen Retikulozytenzahl wird mit der RBC-Zahl des ADVIA® 120 die absolute Retikulozytenzahl nach der in Kapitel 2.3.2 a aufgeführten Formel berechnet.
Anhand der Cut-off-Werte der absoluten Retikulozytenzahl von 60 x 10^9/l beim Hund und von 40 x 10^9/l bei der Katze wird jede Blutprobe als regenerativ oder nicht

regenerativ eingeordnet. Die Klassifizierung einer einzelnen Probe erfolgt zum Zeitpunkt der Messung und schließt nicht aus, dass sich aus einer nicht regenerativen Anämie im Verlauf der Erkrankung eine regenerative Anämie entwickelt.

Außerdem werden bei allen Proben, bei denen auf dem TIC TAC TOE des ADVIA® 120 normozytär-hyperchrome Zellen vorhanden sind, auf den Brillantkresyl-Blau gefärbten Ausstrichen nach Heinzkörperchen gesucht.

3.3.5 RI, RPI

Anhand der in Kapitel 2.3.3 dargestellten Formel wird unter Verwendung des Mikrohämatokrits beim Hund für jede Probe der RI und der RPI errechnet. Für den RPI werden folgende Reifungsfaktoren verwendet:

PCV (l/l)	Reifungsfaktor
0-0,20	2,5
0,21-0,30	2
0,31-0,39	1,5
≥0,40	1

3.4 Versuchsprotokoll

3.4.1 Präzision innerhalb einer Serie

Zur Überprüfung der Präzision innerhalb der Serie für die Parameter RBC, HGB, HKT, RDW, MCV, MCH, MCHC, %Retis, #Retis wird eine mit EDTA antikoagulierte Blutprobe 10 mal hintereinander sowohl am ADVIA® 120 als auch am LaserCyte® gemessen. Aufgrund der langen Analysedauer pro Messung von 13 Minuten beim LaserCyte® kann Zellalterung auftreten.

3.4.2 Methodenvergleich

Für den Methodenvergleich werden wie in Kapitel 3.1 beschrieben Blutproben von 389 Hunden und 121 Katzen verarbeitet. Anschließend werden die Messergebnisse des ADVIA® 120 und des LaserCytes® verglichen. Die Ergebnisse der Retikulozytenzählung beider Geräte werden anhand der manuellen Retikulozytenauszählung der supravitalgefärbten Blutausstriche überprüft. Für den Hämatokrit wird der Vergleich mit der Hämtokritzentrifuge herangezogen.
Die von den Geräten ermittelten Ergebnisse werden elektronisch gesammelt und zur Analyse in eine Excel-Tabelle übertragen. Die Daten der PCV-Messung und der manuellen Retikulozytenauszählung werden manuell eingegeben.
Die Ergebnisse von Hunden und Katzen werden getrennt voneinander ausgewertet.

3.4.3 Referenzwerte

Der Begriff „Referenzwert“ wird in dieser Arbeit im Sinne des englischen Begriffs „reference interval“ verstanden und verwendet.
Die Referenzwerte für alle Parameter des roten Blutbildes werden von 60 gesunden Hunden und 44 gesunden Katzen erstellt.
Die Referenzwerte werden aufgrund der niedrigen Probandenzahl mit verschiedenen Methoden erstellt. Dabei wird ein Makro-AdInn für Excel verwendet, welches die Werte durch die Standard- und die „Robust“-Methode an nicht-transfomierten und Box-Cox-transformierten Daten sowie durch die nicht-parametrische Methode errechnet (www.biostat.envt.fr/spip/spip.php?article63).

3.4.4 Grafische Darstellungen

Zur Beurteilung der Morphologie der Erythrozyten wird von jeder Messung eine vergleichende grafische Darstellung nach folgendem Muster erstellt (siehe PowerPoint-Präsentation im Anhang auf der beiliegenden CD):

Erythrozyten-Morphologie ADVIA 120 - LaserCyte

Hkt 0,24

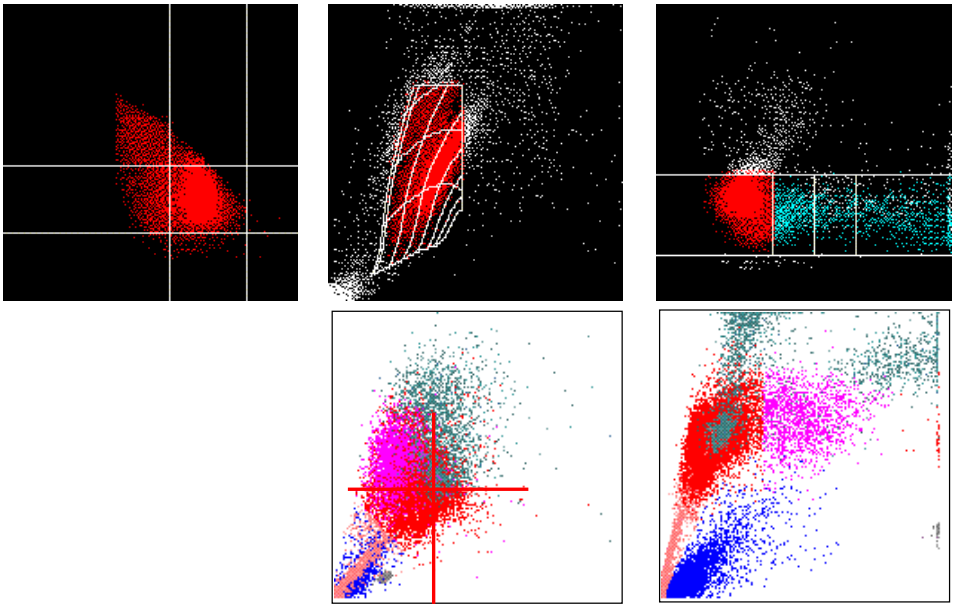
Retis 326

Patient, Anämietyp, Diagnose

99990003 AIKO, Mischling, 2 Jahre, w

makrozytär-hypochrom; mgr Anämie; regenerativ

Autoimmunhämolytische Anämie



In der ersten Reihe werden von links nach rechts die ADVIA® 120-Abbildungen TIC TAC TOE, RBC Scatter und RETIC Scatter und in der zweiten Reihe die beiden DotPlots des LaserCytes® dargestellt. Das rote Kreuz im linken LaserCyte®-DotPlot wird zur besseren Erfassung der morphologischen Veränderungen nachträglich eingefügt.

In der Kopfzeile werden Angaben über das Signalement des Tieres eingetragen. In der folgenden Zeile wird die Anämie anhand des TIC TAC TOE des ADVIA® 120 durch eine Person nach seiner Hauptpopulation bezüglich Zellgröße und Hämoglobingehalt in folgende Gruppen eingeteilt:

- makrozytär-hypochrom
- makrozytär-normochrom
- normozytär-hypochrom
- normozytär-normochrom
- normozytär-hyperchrom
- mikrozytär-hypochrom
- mikrozytär-normochrom

Proben, die mehrere Hauptpopulationen darstellen, werden ggf. mehreren Gruppen zugeteilt.

Der Grad der Anämie in geringgradig (ggr), mittelgradig (mgr) und hochgradig (hgr) erfolgt in Anlehnung an Tvedten und Weiss (Tvedten and Weiss 2000) nach dem PCV (abgebildet in der oberen rechten Ecke der Folie (in l/l)):

	Hund	Katze
Geringgradig (PCV in l/l)	0,30-0,39	0,20-0,27
mittelgradig (PCV in l/l)	0,20-0,29	0,14-0,19
Hochgradig (PCV in l/l)	≤ 0,19	≤ 0,13

Tabelle 3.1: *Einteilung des Anämiegrades modifiziert nach Tvedten und Weiss, 2000*

Die Klassifizierung in regenerative und nicht regenerative Proben erfolgt auf der Grundlage der manuellen Retikulozytenauszählung. Die ermittelte absolute Retikulozytenzahl (in 10^9/l) ist in der oberen rechten Ecke der Folie unter RETIS abgebildet.

Bei einzelnen Proben liegt kein PCV bzw. keine manuelle Retikulozytenauszählung vor, sodass diese Proben hinsichtlich Anämiegrad und Regeneration nicht eingeteilt und die Parameter „HKT“ bzw. „RETIS“ auf der Folie mit einem „-“ gekennzeichnet werden.

Schließlich wird in der letzten Zeile des Kopfes die Diagnose der Erkrankung vermerkt.

Von alle Proben, die zwischen dem 01.12.2006 und dem 28.12.2007 gemessen wurden, wird aufgrund von technischen Problemen der TIC TAC TOE-Einstellung in diesem Zeitraum nach Behebung des Problems mit den aktualisierten Einstellungen ein „Playback“ durchgeführt.

Die gesamte PowerPoint-Präsentation befindet sich im Anhang (Hunde und Katzen getrennt, gesund und krank getrennt).

Deskription

Für die deskriptive Beschreibung werden die Proben nach der jeweiligen Erkrankung des Hundes bzw. der Katze nach Organsystemen in folgende Gruppen eingeteilt:

- Immunerkrankung
- Hepatopathie
- Urogenital
- Gastrointestinal
- Infektion
- Gerinnungsstörung
- Endokrinopathie
- Lymphoretikulär
- Splenopathie
- Respirationstrakt
- Kardiovaskulär
- Chirurgie
- Sonstiges

In der Gruppe der Immunerkrankungen werden v.a. Patienten mit primärer und sekundärer immunhämolytischer Anämie erfasst. Bei zwei Hunden mit hochregenerativer Anämie nach einem schweren chirurgischen Eingriff kann die Diagnose einer immunvermittelten Anämie anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht eindeutig gestellt werden. Eine hämolytische Anämie ist aber durch Ausschluss vieler anderer Ursachen sehr wahrscheinlich, sodass die Proben dieser beiden Tiere mit zu den Immunerkrankungen gezählt werden.

Bei den Hepatopathien gehen portosystemische Shunts, Leberneoplasien und Leberzirrhosen ein. Zu den urogenitalen Erkrankungen zählen akute und chronische Niereninsuffizienzen, Zystitiden, nephrotische Syndrome und Erkrankungen der Prostata. Die Gruppe der gastrointestinalen Erkrankungen beinhaltet gastrointestinale Fremdkörper, Darmtumoren, Gastritiden und Magen-Darmblutungen. Tiere mit Sepsis, Leishmaniose, Babesiose, Parvovirose, Pilzinfektion und Pyothorax werden in der Infektionsgruppe versammelt. Die Gruppe Gerinnungsstörung umfasst Tiere mit Thrombozytopenie, DIC (disseminierte intravasale Coagulopathie), Hämophilie A und B, v. Willebrand-Faktor-Mangel, Afibrinogenämie und Cumarinderivatintoxikation. In die Endokrinopathie-Gruppe gehen Patienten mit Diabetes mellitus, Hyperadrenokortizismus, Hyperöstrogenismus, Hypo- und Hyperthyreose und Hypoadrenokortizismus ein. Die

lymphoretikulären Patienten setzen sich aus Knochenmarkserkrankungen (Fibrose, myelodysplastisches Syndrom, Leukämie, Panzytopenie, immunbedingte, nicht-regenerative Anämie, FeLV-Infektion) und Erkrankungen des peripheren Lymphgewebes (Lymphom, Lymphknotenabszess) zusammen. Bei den Splenopathien kommen Milztumoren, eine Milztorsion sowie eine purulente Splenitis vor. Für den Respirationstrakt werden Neoplasien, Bronchopneumonien und felines Asthma eingeschlossen und kardiovaskuläre Erkrankungen sind ein Herzbasistumor und Klappenerkrankungen. Die Gruppe Chirurgie stellt eine heterogene Gruppe mit allen chirurgischen Erkrankungen wie z.B. Diskopathien, Frakturen, Traumata und Blutungsanämien post operationem dar. In die Gruppe Sonstiges werden Erkrankungen eingeteilt, die sich nicht in andere Gruppen integrieren lassen wie z.B. Eisenmangelanämie, Pudelmakrozytose, Meningitiden und Tiere mit unbekannter Diagnose.

Die eigens erstellten Referenzbereiche dienen als Grundlage für die Einteilung, bei welchen Proben MCV, MCHC und RDW erniedrigt, normal bzw. erhöht sind.

3.5 Statistik

Die statistische Auswertung und deren grafische Darstellung erfolgt mit dem Programm Analyse-it® für Excel (Excel 2003, Microsoft Corporation, One Microsoft Way, Redmond, WA 98052-6399, USA).

3.5.1 Varianzanalyse

Für den Wiederholbarkeits-Versuch werden der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient als Maß für den Zufallsfehler für jeden Parameter für einen gesunden Hund und jeweils einen Patienten (Hund) mit einer gering-, mittel- und hochgradigen Anämie errechnet.

3.5.2 Korrelationsanalyse

Im Rahmen des Methodenvergleichs zweier Geräte werden systematische Fehler (konstant oder proportional) festgestellt. Die Analyse erfolgt durch die Beurteilung der

linearen Regression, des Spearman-Korrelationskoeffizienten, der Passing-Bablok Regression und der Bland-Altman Plots.

Für jedes Gerät und jeden Parameter werden der Korrelations-Koeffizienten r bzw. der Spearman Korrelationskoeffizient r_s bestimmt. Dabei bedeutet der Wert 0, dass keine Korrelation zwischen zwei gemessenen Daten vorhanden ist. Bei einer positiven Assoziation (+1) geht man von einer direkten Übereinstimmung beider Werte aus, während bei einer negativen (-1) der eine Wert steigt und der andere fällt. Der Korrelations-Koeffizienz r wird bei einem linearen Verhältnis zweier Parameter verwendet, während zur Berechnung des Spearman Korrelationskoeffizienten r_s keine Normalverteilung vorliegen muss (Petrie and Watson 2006).

Aus der Passing-Bablok Regression erfolgt die Angabe des y-Achsenabschnitts („intercept“) und der Steigung („slope“) mit 95%igem Konfidenzintervall. Der y-Achsenabschnitt kann zur Beurteilung des konstanten Fehlers und die Steigung zur Beurteilung des proportionalen Fehlers angewendet werden. Bei einer Passing-Bablok Regression wird die Impräzision sowohl der Referenzmethode als auch der zu evaluierenden Methode mit einbezogen und die Daten müssen nicht normalverteilt sein (Passing and Bablok 1983).

Aus der Bland-Altman Analyse wird der Mittelwertunterschied („bias“) zur Beschreibung des systematischen Fehlers mit 95%iger Übereinstimmungsgrenze zur Beurteilung des Zufallsfehlers (Bland and Altman 1999) ermittelt.

4. Ergebnisse

4.1 Präzision innerhalb der Serie

In diesem Kapitel wird das Ergebnis der Präzisionsstudie vom Hund innerhalb einer Serie präsentiert. Dabei wird die Standardabweichung S und der Variationskoeffizient CV (%) der Hämatologiesysteme berechnet.

Die Bestimmung der Präzision innerhalb einer Serie erfolgt durch 10malige Messung einer Probe am ADVIA® 120 und an zwei LaserCyte®-Geräten (LCrot und LCblau). Dafür wird das Blut eines gesunden Hundes ohne Anämie und jeweils eines Tieres mit einer gering-, mittel- und hochgradigen Anämie verwendet. Die Präzision bei Katzen wird in dieser Studie nicht bestimmt.

4.1.1 ADVIA® 120

Wie aus Tabelle 4.1 hervorgeht, zeigen die Parameter der roten Zellreihe beim ADVIA® 120 mit Ausnahme der Retikulozytenzählung mit Variationskoeffizienten zwischen 0,33 und 1,92% exzellente Ergebnisse. Diese Ergebnisse werden sowohl beim Patienten ohne Anämie als auch bei allen Graden der Anämie erreicht.
Die prozentuale und absolute Retikulozytenzählung liefert mit Werten zwischen 4,78 und 10,31% gute bis mäßige Präzisionen. Der Grad der Anämie scheint keinen gravierenden Einfluss zu haben.

4.1.2 LaserCyte®

Aus den Tabellen 4.2 und 4.3 ist ersichtlich, dass beide Geräte des LaserCytes® eine deutlich schlechtere Präzision zeigen als der ADVIA® 120. Lediglich die Parameter MCV und RDW erreichen ohne Einfluss des Anämiegrades exzellente Variationskoeffizienten (0,52-1,32% bzw. 0,38-2,49%). Die Präzision des HGB ist als gut zu bezeichnen (1,64-4,95%).
RBC und HKT haben mit Werten zwischen 4% und 5% eine gute Präzision, es besteht allerdings die Tendenz zu höheren Variationskoeffizienten (7,51-11,73% bzw. 7,38-11,27%) je höher der Grad der Anämie ist.

Eine gute bis mäßige Präzision ist bei den Parametern MCH und MCHC ersichtlich (3,27-11,46%).

Bei den Ergebnissen der Retikulozyten zeichnen sich unabhängig von der Anämieausprägung sehr unterschiedliche Werte ab. Ca. 50% der Proben erreichen akzeptable Variationskoeffizienten (3,10-10,78%). Auffällig sind jedoch die sehr hohen CV-Werte von bis zu knapp 30% der restlichen Blutproben.

Anämiegrad	Parameter	Einheit	Mittelwert ± Standardabweichung $\bar{x}$ ± S			Variationskoeffizient CV (%)
keine Anämie	RBC	10^{12}/l	6,79	±	0,07	0,99
	HGB	mmol/l	10,25	±	0,14	1,40
	HKT	l/l	0,47	±	0,00	0,90
	MCV	fl	68,85	±	0,25	0,37
	MCH	fmol	1,51	±	0,03	1,92
	MCHC	mmol/l	21,91	±	0,41	1,87
	RDW	%	12,11	±	0,05	0,42
	%Retis	%	1,54	±	0,16	10,31
	#Retis	10^{9}/l	104,25	±	10,35	9,93
ggr. Anämie	RBC	10^{12}/l	4,55	±	0,06	1,27
	HGB	mmol/l	6,73	±	0,10	1,49
	HKT	l/l	0,32	±	0,00	1,37
	MCV	fl	69,31	±	0,23	0,33
	MCH	fmol	1,48	±	0,01	0,88
	MCHC	mmol/l	21,33	±	0,21	0,97
	RDW	%	15,46	±	0,09	0,59
	%Retis	%	7,43	±	0,46	6,24
	#Retis	10^{9}/l	338,03	±	22,32	6,60
mgr. Anämie	RBC	10^{12}/µl	3,18	±	0,03	1,01
	HGB	mmol/l	5,00	±	0,00	1,00
	HKT	l/l	0,22	±	0,00	1,64
	MCV	fl	69,26	±	0,47	0,68
	MCH	fmol	1,57	±	0,02	1,03
	MCHC	mmol/l	22,74	±	0,36	1,59
	RDW	%	15,91	±	0,12	0,77
	%Retis	%	4,16	±	0,31	7,41
	#Retis	10^{9}/l	132,34	±	10,86	8,05
hgr. Anämie	RBC	10^{12}/l	2,02	±	0,02	0,77
	HGB	mmol/l	2,99	±	0,03	1,00
	HKT	l/l	0,13	±	0,00	0,68
	MCV	fl	63,42	±	0,27	0,43
	MCH	fmol	1,48	±	0,01	0,75
	MCHC	mmol/l	23,27	±	0,13	0,45
	RDW	%	13,42	±	0,06	0,45
	%Retis	%	1,42	±	0,07	4,78
	#Retis	10^{9}/l	28,60	±	1,37	4,79

Tabelle 4.1: *Präzision ADVIA 120 Hund*

Anämiegrad	Parameter	Einheit	Mittelwert ± Standardabweichung $\bar{x}$ ± S			Variationskoeffizient CV (%)
keine Anämie	RBC	10^{12}/l	6,61	±	0,30	4,59
	HGB	mmol/l	10,97	±	0,28	2,53
	HKT	l/l	0,45	±	0,02	4,28
	MCV	fl	67,95	±	0,87	1,29
	MCH	fmol	1,66	±	0,08	5,06
	MCHC	mmol/l	24,48	±	1,27	5,19
	RDW	%	14,73	±	0,06	0,44
	%Retis	%	0,63	±	0,05	8,66
	#Retis	10^{9}/l	41,88	±	3,05	7,28
ggr. Anämie	RBC	10^{12}/l	3,92	±	0,23	5,92
	HGB	mmol/l	7,13	±	0,25	3,46
	HKT	l/l	0,27	±	0,02	5,80
	MCV	fl	69,29	±	0,36	0,52
	MCH	fmol	1,82	±	0,06	3,55
	MCHC	mmol/l	26,27	±	0,93	3,53
	RDW	%	16,40	±	0,10	0,58
	%Retis	%	1,10	±	0,29	26,59
	#Retis	10^{9}/l	43,50	±	12,51	28,75
mgr. Anämie	RBC	10^{12}/l	2,93	±	0,20	6,92
	HGB	mmol/l	5,18	±	0,26	4,95
	HKT	l/l	0,21	±	0,02	7,32
	MCV	fl	70,40	±	0,50	0,71
	MCH	fmol	1,77	±	0,09	5,25
	MCHC	mmol/l	25,20	±	1,44	5,73
	RDW	%	15,92	±	0,11	0,71
	%Retis	%	2,77	±	0,30	10,78
	#Retis	10^{9}/l	80,53	±	4,69	5,83
hgr. Anämie	RBC	10^{12}/l	1,78	±	0,13	7,51
	HGB	mmol/l	3,58	±	0,09	2,45
	HKT	l/l	0,12	±	0,01	7,38
	MCV	fl	67,34	±	0,35	0,52
	MCH	fmol	2,02	±	0,16	7,77
	MCHC	mmol/l	29,97	±	2,33	7,78
	RDW	%	16,08	±	0,20	1,23
	%Retis	%	0,99	±	0,28	27,86
	#Retis	10^{9}/l	17,68	±	5,07	28,66

Tabelle 4.2: *Präzision LCrot Hund*

Anämiegrad	Parameter	Einheit	Mittelwert ± Standardabweichung $\bar{x}$ ± S			Variationskoeffizient CV (%)
keine Anämie	RBC	10^{12}/l	6,44	±	0,27	4,15
	HGB	mmol/l	9,61	±	0,16	1,64
	HKT	l/l	0,44	±	0,02	4,61
	MCV	fl	68,68	±	0,73	1,06
	MCH	fmol	1,50	±	0,08	5,09
	MCHC	mmol/l	21,78	±	1,25	5,73
	RDW	%	15,12	±	0,06	0,38
	%Retis	%	0,73	±	0,07	8,94
	#Retis	10^{9}/l	47,07	±	4,19	8,90
ggr. Anämie	RBC	10^{12}/l	4,16	±	0,17	4,11
	HGB	mmol/l	6,12	±	0,20	3,35
	HKT	l/l	0,28	±	0,01	4,43
	MCV	fl	68,52	±	0,59	0,86
	MCH	fmol	1,47	±	0,05	3,46
	MCHC	mmol/l	21,51	±	0,70	3,27
	RDW	%	17,02	±	0,10	0,57
	%Retis	%	1,61	±	0,22	13,81
	#Retis	10^{9}/l	67,08	±	10,81	16,11
mgr. Anämie	RBC	10^{12}/l	2,84	±	0,18	6,30
	HGB	mmol/l	4,68	±	0,18	3,85
	HKT	l/l	0,20	±	0,01	6,39
	MCV	fl	71,47	±	0,75	1,05
	MCH	fmol	1,65	±	0,09	5,19
	MCHC	mmol/l	23,10	±	1,20	5,18
	RDW	%	16,46	±	0,12	0,71
	%Retis	%	4,19	±	0,13	3,10
	#Retis	10^{9}/l	119,22	±	7,05	5,91
hgr. Anämie	RBC	10^{12}/l	1,49	±	0,17	11,73
	HGB	mmol/l	3,03	±	0,11	3,74
	HKT	l/l	0,10	±	0,01	11,27
	MCV	fl	65,27	±	0,86	1,32
	MCH	fmol	2,06	±	0,24	11,64
	MCHC	mmol/l	31,61	±	3,40	10,77
	RDW	%	16,70	±	0,42	2,49
	%Retis	%	1,26	±	0,26	22,72
	#Retis	10^{9}/l	18,26	±	2,54	13,89

Tabelle 4.3: *Präzision LCblau Hund*

4.2 Methodenvergleich

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse des Methodenvergleichs aller gemessenen Proben für die Parameter RBC, HGB, HKT, MCV, MCH, MCHC, RDW, #RETIS und %RETIS für den Vergleich des ADVIA 120® mit den beiden LaserCyte®-Geräten sowie für den Vergleich der LaserCyte®-Geräte untereinander für Hund und Katze dargestellt. Zusätzlich wird der Hämatokrit der Geräte mit dem Mikrohämatokrit (PCV) und die Retikulozytenzahl mit der manuellen Auszählung verglichen.
Der r-Wert stammt aus der Linearen Regression, der r_s-Wert aus der Spearman-Korrelation, y-Achsenabschnitt und Steigung (Intercept und Slope) aus der Passing Bablok-Regression und der Mittelwertsunterschied (Bias) aus der Bland Altman-Analyse.

Aufgrund deutlicher Ausreißer der Ergebnisse beim Gerätevergleich der Katze bei den Parametern HKT und RBC (also Parametern, die i.d.R. gute Korrelationen liefern) werden die Fehlermeldungen der Geräte mit einbezogen. Wegen der Fehlermeldung des LaserCytes® „RBC fragments“ und dadurch falsch niedrigen Hämatokrit- und RBC-Werten, werden die Katzen mit den folgenden Nummern für die Parameter HKT und RBC und die sich daraus errechnenden Parametern MCH und MCHC aus der Auswertung für den Methodenvergleich herausgenommen:
90016471, 90018915, 90019234, 90020087, 90020164, 90024681, 90029881, 99990048, 99990087.
In Abbildung 4.1 sind die Ausreißer am Beispiel des HKT (PCV-LCrot) dargestellt:

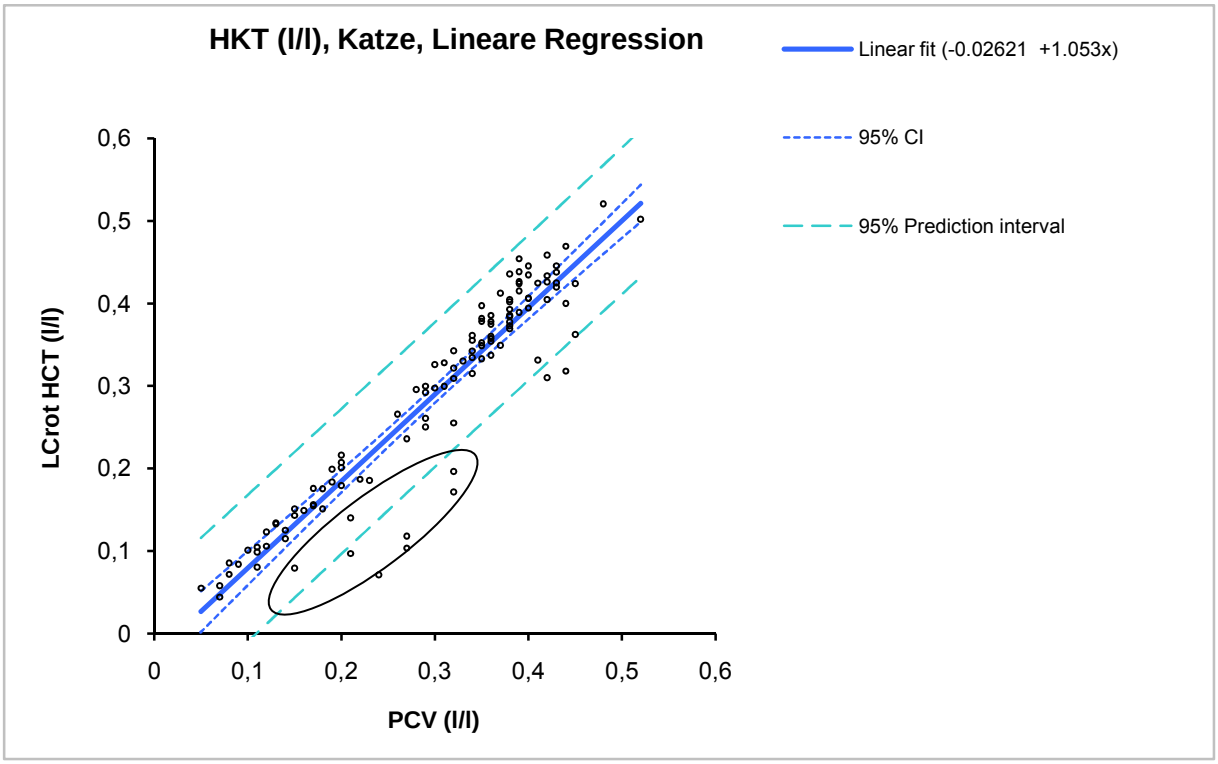


Abbildung 4.1: *HKT (l/l) Lineare Regression [PCV – LCrot] Katzen mit Ausreißern*

Nach Korrektur der genannten Blutproben ergibt sich folgende Grafik (Abbildung 4.2):

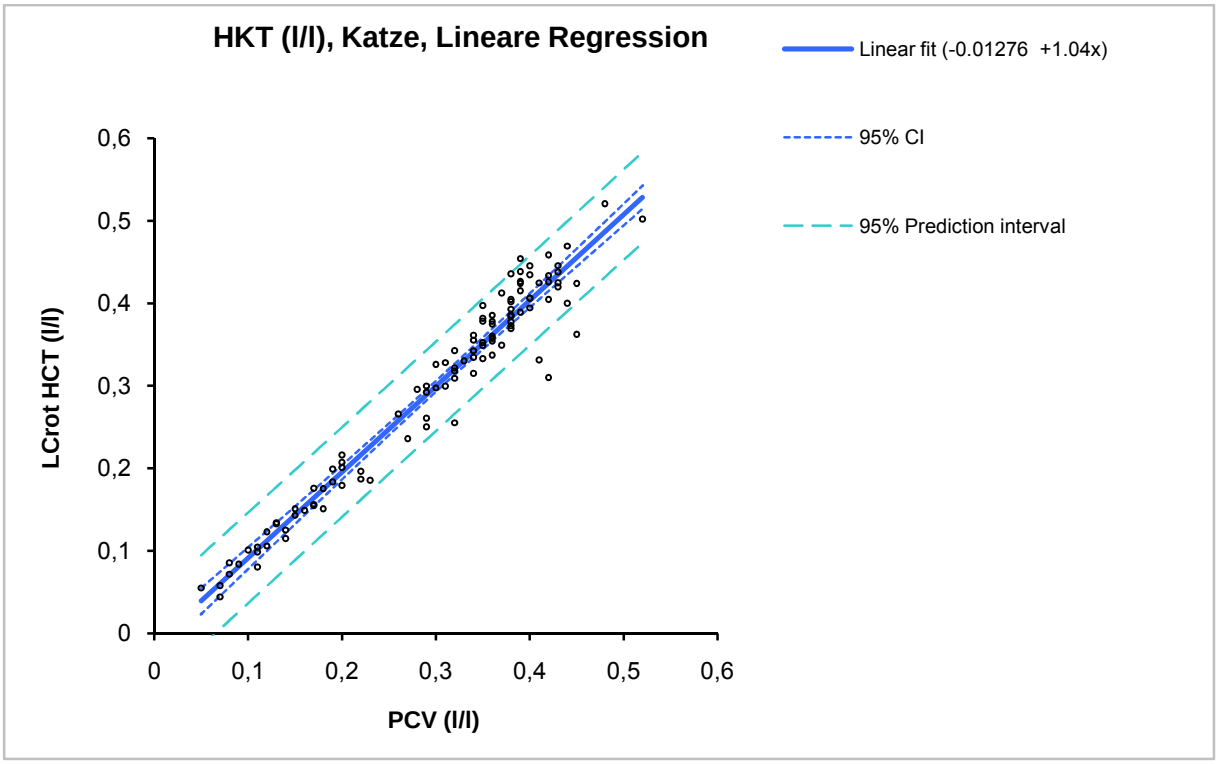


Abbildung 4.2: *HKT (l/l) Lineare Regression [PCV – LCrot] Katzen ohne Ausreißer*

RBC (10^{12}/l) Hund						
Geräte	**n**	**r**	**r_s**	**Steigung** (95% CI)	**y-Achsen-abschnitt** (95% CI)	**Mittelwerts-unterschied** (95%ige Übereinstimmungsgrenze)
ADVIA 120 - LCrot	404	0,98	0,98	1,01 (1,00 bis 1,03)	-0,11 (-0,18 bis -0,05)	-0,1 (-0,9 bis 0,7)
ADVIA 120 - LCblau	300	0,98	0,98	1,03 (1,02 bis 1,05)	-0,19 (-0,28 bis -0,13)	-0,1 (-0,8 bis 0,6)
LCrot - LCblau	296	0,98	0,98	1,03 (1,01 bis 1,05)	-0,08 (-0,17 bis -0,02)	0,1 (-0,7 bis 0,8)
RBC (10^{12}/l) Katze						
Geräte	**n**	**r**	**r_s**	**Steigung** (95% CI)	**y-Achsen-Abschnitt** (95% CI)	**Mittelwerts-unterschied** (95%ige Übereinstimmungsgrenze)
ADVIA 120 - LCrot	109	0,98	0,96	1,02 (0,99 bis 1,05)	-0,34 (-0,53 bis -0,14)	-0,3 (-1,3 bis 0,8)
ADVIA 120 - LCblau	67	0,99	0,97	0,95 (0,91 bis 0,98)	-0,07 (-0,24 bis -0,10)	-0,5 (-1,4 bis 0,4)
LCrot - LCblau	62	0,98	0,97	0,94 (0,91 bis 0,98)	0,25 (0,03 bis 0,41)	-0,2 (-1,1 bis 0,8)

Tabelle 4.4: *Methodenvergleich RBC*

Für den Parameter RBC (Tabelle 4.4) zeigen sich für Hund und Katze beim Vergleich aller Geräte exzellente Korrelationskoeffizienten. Durch die Steigung von 1,03 ergibt sich für den Hund beim Vergleich mit dem LCblau ein leichter positiver systematischer proportionaler Fehler; d.h. bei hohen Werten divergieren die Methoden mehr und der LCblau misst höhere Ergebnisse. Bei der Katze hingegen ist der proportionale Fehler für den LCblau negativ.

HGB (mmol/l) Hund						
Geräte	**n**	**r**	**r_s**	**Steigung** (95% CI)	**y-Achsen-abschnitt** (95% CI)	**Mittelwerts-unterschied** (95%ige Übereinstimmungsgrenze)
ADVIA 120 - LCrot	404	0,98	0,99	1,05 (1,03 bis 1,06)	0,36 (0,27 bis 0,43)	0,7 (-0,3 bis 1,7)
ADVIA 120 - LCblau	300	0,99	0,99	0,93 (0,92 bis 0,94)	0,40 (0,32 bis 0,47)	-0,1 (-0,9 bis 0,7)
LCrot - LCblau	296	0,99	0,99	0,89 (0,88 bis 0,90)	0,04 (-0,02 bis 0,11)	-0,9 (-2,0 bis 0,2)
HGB (mmol/l) Katze						
Geräte	**n**	**r**	**r_s**	**Steigung** (95% CI)	**y-Achsen-abschnitt** (95% CI)	**Mittelwerts-unterschied** (95%ige Übereinstimmungsgrenze)
ADVIA 120 - LCrot	114	0,99	0,99	1,03 (1,00 bis 1,05)	0,57 (0,43 bis 0,68)	0,7 (0,1 bis 1,3)
ADVIA 120 - LCblau	72	0,98	0,98	0,89 (0,87 bis 0,91)	0,63 (0,53 bis 0,76)	-0,0 (-1,0 bis 0,9)
LCrot - LCblau	69	0,99	0,98	0,87 (0,84 bis 0,89)	0,09 (-0,05 bis 0,24)	-0,8 (-1,7 bis 0,1)

Tabelle 4.5: *Methodenvergleich HGB*

Beim HGB ergeben sich für Hund und Katze exzellente Korrelationskoeffizienten. Während beim Vergleich ADVIA®-LCrot ein leichter positiver proportionaler Fehler sichtbar ist, sind negative proportionale Fehler für den Vergleich des LCblau sowohl mit dem ADVIA® 120 als auch mit dem LCrot feststellbar (Steigung 0,93 bzw. 0,89 für den Hund; Steigung 0,89 bzw. 0,87 für die Katze) (Tabelle 4.5). In Abbildung 4.3 ist der Unterschied zwischen dem LCrot und dem LCblau veranschaulicht.

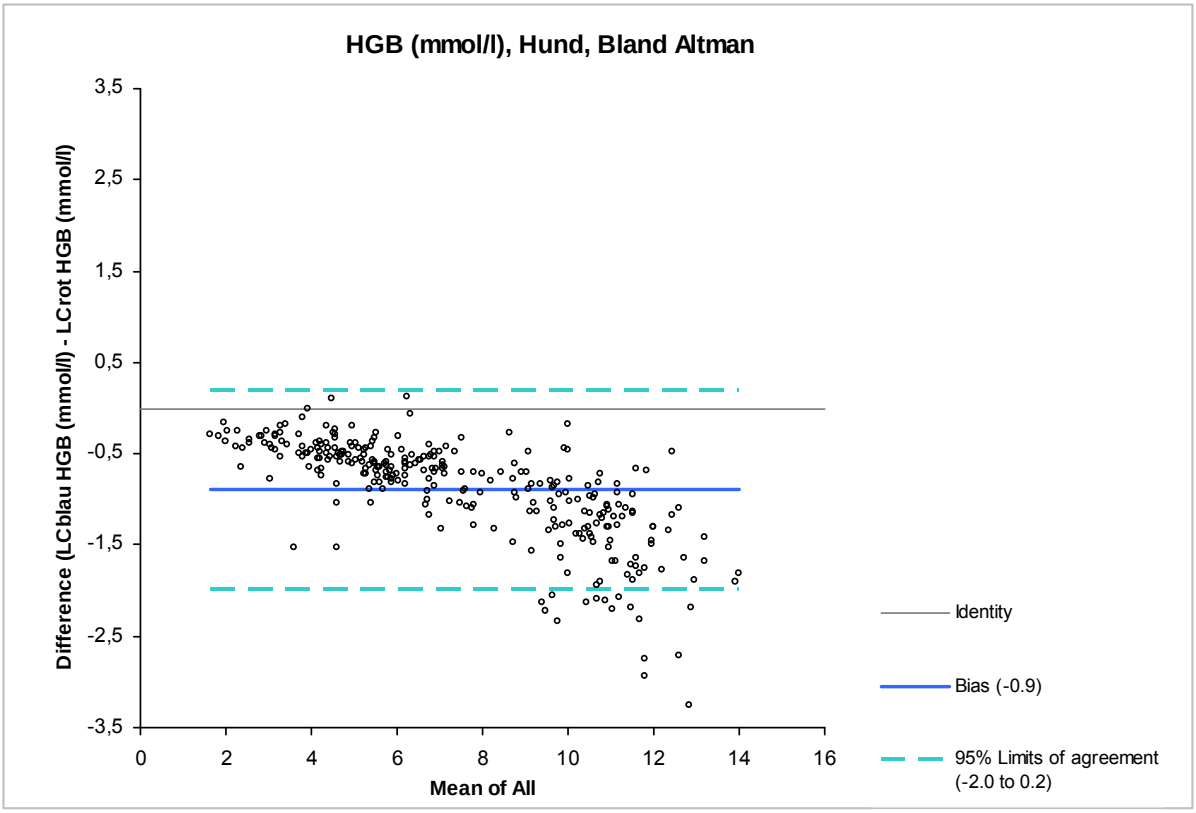


Abbildung 4.3: *HGB (mmol/l) Bland-Altman [LCrot-LCblau] Hund*

HKT (l/l) Hund						
Geräte	**n**	**r**	**r_s**	**Steigung** (95% CI)	**y-Achsen-abschnitt** (95% CI)	**Mittelwerts-unterschied** (95%ige Überein-stimmungsgrenze)
PCV - ADVIA 120	408	0,99	0,99	0,99 (0,98 bis 1,00)	0,00 (0,00 bis 0,00)	-0,0 (-0,0 bis 0,0)
PCV – LCrot	404	0,98	0,98	1,01 (0,99 bis 1,03)	-0,02 (-0,03 bis -0,01)	-0,0 (-0,1 bis 0,0)
PCV – LCblau	300	0,98	0,98	1,09 (1,07 bis 1,11)	-0,04 (-0,05 bis -0,03)	-0,0 (-0,1 bis 0,0)
ADVIA 120 - LCrot	404	0,97	0,98	1,02 (1,00 bis 1,04)	-0,02 (-0,02 bis -0,01)	-0,0 (-0,1 bis 0,0)
ADVIA 120 - LCblau	300	0,98	0,98	1,09 (1,07 bis 1,11)	-0,03 (-0,04 bis -0,03)	-0,0 (-0,1 bis 0,0)
LCrot - LCblau	296	0,98	0,98	1,07 (1,05 bis 1,09)	-0,01 (-0,02 bis -0,01)	0,00 (-0,0 bis 0,1)

HKT (l/l) Katze						
Geräte	**n**	**r**	**r_s**	**Steigung** (95% CI)	**y-Achsen-abschnitt** (95% CI)	**Mittelwerts-unterschied** (95%ige Überein-stimmungsgrenze)
PCV - ADVIA 120	118	0,99	0,99	0,97 (0,96 bis 0,99)	0,00 (-0,01 bis -0,00)	-0,0 (-0,0 bis 0,0)
PCV – LCrot	107	0,97	0,95	1,09 (1,05 bis 1,13)	-0,02 (-0,03 bis -0,01)	-0,0 (-0,1 bis 0,1)
PCV – LCblau	67	0,98	0,94	1,01 (0,96 bis 1,04)	-0,01 (-0,02 bis -0,00)	-0,0 (-0,1 bis 0,0)
ADVIA 120 - LCrot	109	0,97	0,93	1,12 (1,08 bis 1,16)	-0,02 (-0,03 bis -0,00)	0,0 (-0,0 bis 0,1)
ADVIA 120 - LCblau	67	0,98	0,93	1,03 (0,99 bis 1,07)	-0,01 (-0,02 bis 0,00)	-0,0 (-0,0 bis 0,0)
LCrot - LCblau	62	0,97	0,92	0,91 (0,87 bis 0,95)	0,01 (0,00 bis 0,02)	-0,00 (-0,1 bis 0,0)

Tabelle 4.6: *Methodenvergleich HKT*

Wie in Tabelle 4.6 dargestellt, können für den HKT beim Hund gute Übereinstimmungen aller Methoden nachgewiesen werden. Die beste Korrelation ergibt sich für den Vergleich des Mikrohämatokrits mit dem ADVIA® 120 (Abbildung 4.4).

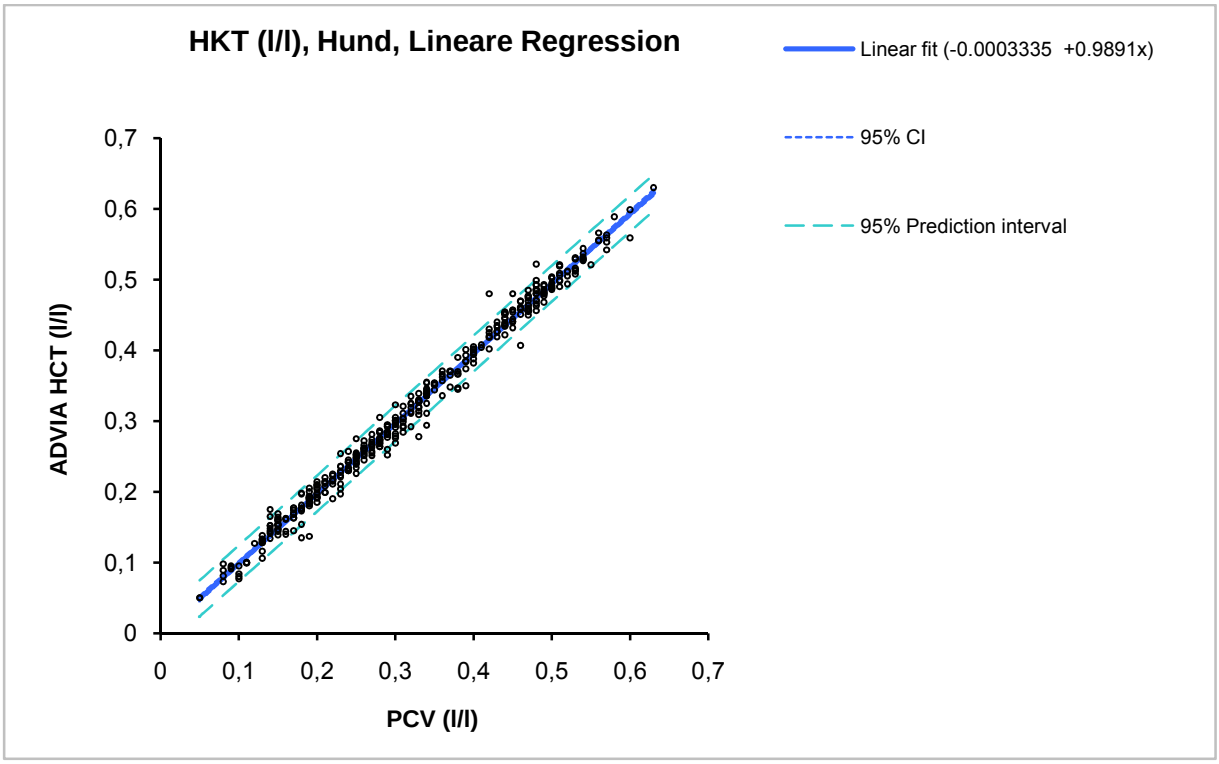


Abbildung 4.4: *HKT (l/l) Lineare Regression [PCV-ADVIA 120] Hund*

Bei der Gegenüberstellung PCV-LCblau und ADVIA-LCblau ist auch ein exzellenter r-Wert sichtbar, es ist aber zusätzlich ein positiver proportionaler systematischer Fehler mit einer Steigung von 1,07-1,09 zu erkennen (Abbildung 4.5). Der LCblau liefert somit höhere Ergebnisse bei hohen Messwerten als die anderen Methoden.

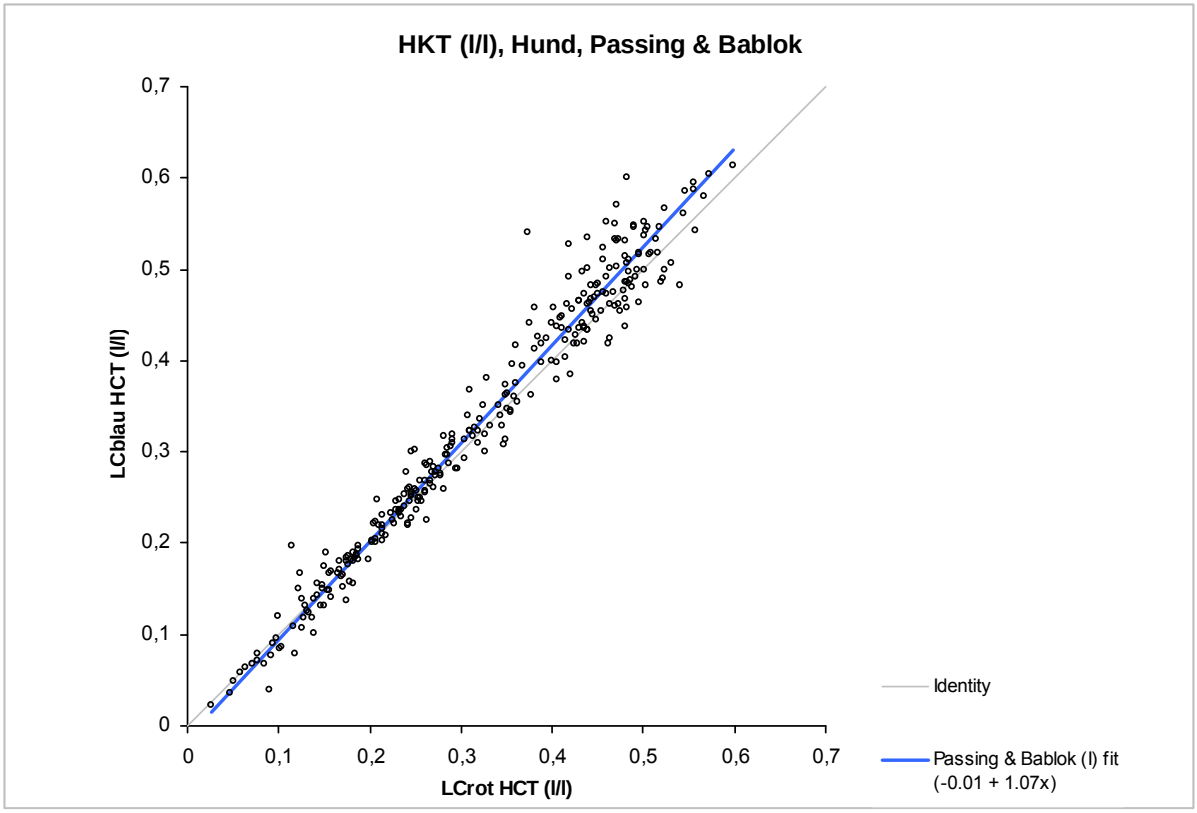


Abbildung 4.5: *HKT (l/l) Passing & Bablok [LCrot-LCblau] Hund*

Bei der Katze fällt auf, dass der LCrot höhere Ergebnisse erzielt als alle drei anderen Methoden und somit ein proportionaler Fehler entsteht.

MCV (fl) Hund						
Geräte	**n**	**r**	**r_s**	**Steigung** (95% CI)	**y-Achsen-abschnitt** (95% CI)	**Mittelwerts-unterschied** (95%ige Übereinstimmungsgrenze)
ADVIA 120 - LCrot	404	0,87	0,83	0,71 (0,66 bis 0,76)	18,58 (15,14 bis 21,78)	-2,5 (-10,9 bis 5,9)
ADVIA 120 - LCblau	301	0,81	0,74	0,79 (0,72 bis 0,86)	14,24 (9,05 bis 19,27)	-1,3 (-10,9 bis 8,4)
LCrot - LCblau	297	0,95	0,90	1,10 (1,07 bis 1,13)	-5,62 (-7,83 bis -3,47)	1,2 (-3,0 bis 5,3)

MCV (fl) Katze						
Geräte	**n**	**r**	**r_s**	**Steigung** (95% CI)	**y-Achsen-abschnitt** (95% CI)	**Mittelwerts-unterschied** (95%ige Übereinstimmungsgrenze)
ADVIA 120 - LCrot	116	0,80	0,77	0,93 (0,83 bis 1,01)	7,30 (3,97 bis 11,25)	3,1 (-3,2 bis 9,4)
ADVIA 120 - LCblau	74	0,70	0,65	1,08 (0,94 bis 1,22)	-0,92 (-6,50 bis 4,91)	1,1 (-7,9 bis 10,2)
LCrot - LCblau	62	0,89	0,88	1,07 (1,02 bis 1,15)	-4,74 (-8,46 bis -2,28)	-1,8 (-7,5 bis 3,8)

Tabelle 4.7: *Methodenvergleich MCV*

Vergleicht man hinsichtlich des MCV beim Hund den ADVIA® 120 mit den LaserCyte®-Geräten (Abbildung 4.6, Tabelle 4.7), fallen weniger gute Korrelationskoeffizienten und ein deutlicher negativer proportionaler systematischer Fehler (Steigung 0,71/0,79, y-Achsenabschnitt 18,58/14,24) auf. Die beiden LaserCyte®-Maschinen zeigen eine bessere Übereinstimmung, aber auch hier ist ein systematischer Fehler feststellbar (positiv; Steigung 1,10).

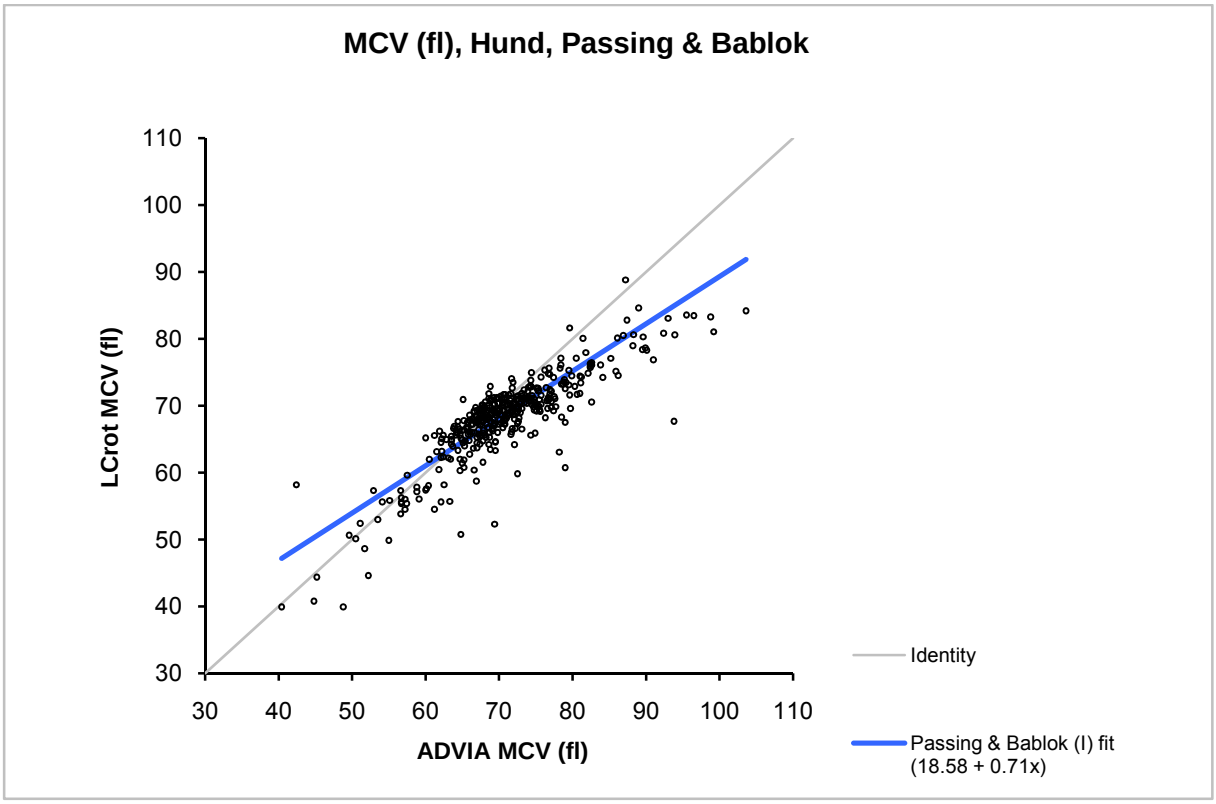


Abbildung 4.6: *MCV (fl) Passing & Bablok [ADVIA 120 – LCrot] Hund*

Bei der Katze ist beim Vergleich des LCblau mit dem ADVIA® und dem LCrot ein positiver proportionaler Fehler mit Steigungswerten über 1 auffällig (Tabelle 4.7).

MCHC (mmol/l) Hund						
Geräte	**n**	**r**	**r_s**	**Steigung** (95% CI)	**y-Achsen-abschnitt** (95% CI)	**Mittelwerts-unterschied** (95%ige Übereinstimmungsgrenze)
ADVIA 120 - LCrot	404	0,22	0,29	3,3 (2,56 bis 3,62)	-38,54 (-50,8 bis -28,9)	4,4 (-4,7 bis 13,5)
ADVIA 120 - LCblau	300	0,11	0,07	1,8 (1,39 bis 2,43)	-16,52 (-29,47 bis -8,12)	1,5 (-9,3 bis 12,2)
LCrot – LCblau	296	0,78	0,63	0,72 (0,63 bis 0,81)	3,84 (1,72 bis 5,95)	-3,1 (-9,8 bis 3,6)
MCHC (mmol/l) Katze						
Geräte	**n**	**r**	**r_s**	**Steigung** (95% CI)	**y-Achsen-abschnitt** (95% CI)	**Mittelwerts-unterschied** (95%ige Übereinstimmungsgrenze)
ADVIA 120 - LCrot	107	0	0,10	7,60 (5,01 bis 14,37)	-140 (-285 bis -84)	2,8 (-6,3 bis 11,9)
ADVIA 120 - LCblau	65	0	0,09	6,06 (3,52 bis 19,56)	-108 (-398 bis -53)	1,4 (-6,2 bis 9,0)
LCrot – LCblau	62	0,74	0,66	0,68 (0,53 bis 0,88)	5,89 (0,94 bis 9,28)	-1,9 (-7,3 bis 3,6)

Tabelle 4.8: *Methodenvergleich MCHC*

MCH (fmol) Hund						
Geräte	**n**	**r**	**r_s**	**Steigung** (95% CI)	**y-Achsen-abschnitt** (95% CI)	**Mittelwerts-unterschied** (95%ige Übereinstimmungsgrenze)
ADVIA 120 - LCrot	404	0,51	0,63	2,28 (2,05 bis 2,57)	-1,66 (-2,09 bis -1,32)	0,3 (-0,4 bis 0,9)
ADVIA 120 - LCblau	300	0,50	0,68	1,71 (1,52 bis 1,92)	-1,03 (-1,34 bis -0,75)	0,1 (-0,6 bis 0,8)
LCrot – LCblau	296	0,80	0,82	0,85 (0,79 bis 0,90)	0,07 (-0,02 bis 0,16)	-0,2 (-0,7 bis 0,3)
MCH (fmol) Katze						
Geräte	**n**	**r**	**r_s**	**Steigung** (95% CI)	**y-Achsen-abschnitt** (95% CI)	**Mittelwerts-unterschied** (95%ige Übereinstimmungsgrenze)
ADVIA 120 – LCrot	107	0,59	0,54	2,19 (1,77 bis 2,78)	-0,91 (-1,43 bis -0,53)	0,2 (-0,2 bis 0,6)
ADVIA 120 – LCblau	65	0,71	0,68	1,58 (1,33 bis 1,87)	-0,46 (-0,71 bis -0,23)	0,1 (-0,2 bis 0,4)
LCrot – LCblau	62	0,87	0,91	0,82 (0,71 bis 0,97)	0,07 (-0,08 bis 0,19)	-2,8 (-6,3 bis 11,9)

Tabelle 4.9: *Methodenvergleich MCH*

Für den MCH und den MCHC werden für Hund und Katze ungenügende Korrelationen geliefert (Tabellen 4.8 und 4.9). Beim Vergleich ADVIA® 120-LaserCyte® ist eine sehr ausgeprägte positive Steigung mit negativem y-

Achsenabschnitt vorhanden. Die LaserCytes® im Vergleich zeigen einen deutlichen negativen proportionalen Fehler (Steigung MCHC 0,72, MCH 0,85 beim Hund; Steigung MCHC 0,68, MCH 0,82 bei der Katze).

RDW (%) Hund						
Geräte	**n**	**r**	**r_s**	**Steigung** (95% CI)	**y-Achsen-abschnitt** (95% CI)	**Mittelwerts-unterschied** (95%ige Übereinstimmungsgrenze)
ADVIA 120 – LCrot	404	0,77	0,89	0,43 (0,41 bis 0,46)	9,49 (9,12 bis 9,84)	0,1 (-7,0 bis 7,2)
ADVIA 120 – LCblau	300	0,76	0,89	0,47 (0,44 bis 0,51)	9,33 (8,80 bis 9,81)	0,8 (-6,4 bis 8,1)
LCrot – LCblau	296	0,93	0,97	1,11 (1,09 bis 1,13)	-1,2 (-1,55 bis -0,88)	0,7 (-1,0 bis 2,4)
RDW (%) Katze						
Geräte	**n**	**r**	**r_s**	**Steigung** (95% CI)	**y-Achsen-abschnitt** (95% CI)	**Mittelwerts-unterschied** (95%ige Übereinstimmungsgrenze)
ADVIA 120 – LCrot	111	0,73	0,74	0,42 (0,35 bis 0,52)	12,01 (10,35 bis 13,24)	1,6 (-5,6 bis 8,7)
ADVIA 120 - LCblau	69	0,59	0,51	0,63 (0,45 bis 0,90)	10,25 (6,00 bis 13,48)	4,0 (-2,8 bis 10,8)
LCrot – LCblau	64	0,82	0,81	1,33 (1,15 bis 1,64)	-4,50 (-10,69 bis -1,27)	2,1 (-0,4 bis 4,7)

Tabelle 4.10: *Methodenvergleich RDW*

Wie in Tabelle 4.10 und Abbildung 4.7 ersichtlich lassen sich beim RDW ausgeprägte Unterschiede mit einem sehr deutlichen negativen proportionalen Fehler zwischen dem ADVIA® 120 und dem LaserCyte® erkennen. Die beiden LaserCyte®-Geräte stimmen besser überein, die Maschinen divergieren bei hohen Messungen in ihren Ergebnissen aber ebenfalls (Steigung 1,11 beim Hund bzw. 1,33 bei der Katze). Für die Katze werden schlechtere Übereinstimmungswerte erreicht als beim Hund.

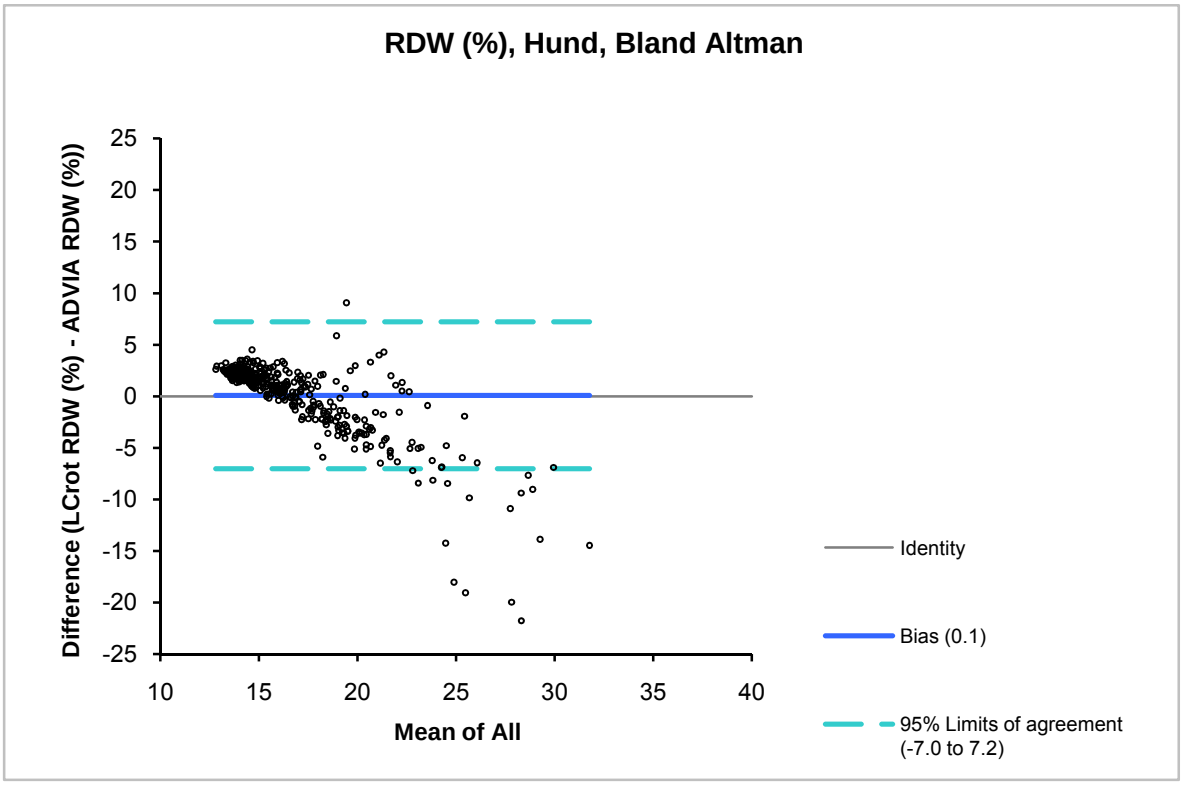


Abbildung 4.7: *RDW (%) Bland Altman [ADVIA 120 – LCrot] Hund*

#RETIS (10^9/l) Hund						
Geräte	**n**	**r**	**r_s**	**Steigung** (95% CI)	**y-Achsen-abschnitt** (95% CI)	**Mittelwerts-unterschied** (95%ige Überein-stimmungsgrenze)
Man - ADVIA 120	384	0,89	0,89	0,91 (0,86 bis 0,96)	10,56 (7,72 bis 13,72)	2,6 (-153 bis 158)
Man - LCrot	394	0,79	0,78	0,41 (0,36 bis 0,45)	16,27 (13,65 bis 17,98)	-64,5 (-286 bis 157)
Man - LCblau	293	0,82	0,84	0,51 (0,46 bis 0,56)	16,71 (13,72 bis 19,14)	-47,8 (-239 bis 143)
ADVIA 120 - LCrot	386	0,75	0,81	0,46 (0,42 bis 0,50)	8,63 (6,02 bis 11,13)	-69,5 (-317 bis 178)
ADVIA 120 - LCblau	291	0,75	0,88	0,59 (0,53 bis 0,66)	8,92 (5,88 bis 11,84)	-51,9 (-284 bis 180)
LCrot - LCblau	296	0,90	0,90	1,2 (1,13 bis 1,28)	-3,13 (-5,47 bis -0,67)	13,9 (-63 bis 91)
#RETIS (10^9/l) Katze						
Geräte	**n**	**r**	**r_s**	**Steigung** (95% CI)	**y-Achsen-abschnitt** (95% CI)	**Mittelwerts-unterschied** (95%ige Überein-stimmungsgrenze)
Man - ADVIA 120	116	0,94	0,75	0,98 (0,83 bis 1,11)	13,77 (12,29 bis 15,31)	9,7 (-49 bis 68)
Man - LCrot	106	0,55	0,44	0,49 (0,39 bis 0,62)	22,81 (20,43 bis 25,64)	2,6 (-120 bis 126)
Man - LCblau	68	0,78	0,52	0,76 (0,51 bis 1,11)	29,26 (24,53 bis 34,82)	18,2 (-56 bis 92)
ADVIA 120 - LCrot	111	0,58	0,56	0,53 (0,43 bis 0,68)	17,42 (14,12 bis 20,32)	-10,3 (-138 bis 117)
ADVIA 120 - LCblau	69	0,84	0,55	0,83 (0,59 bis 1,02)	16,88 (11,84 bis 22,21)	6,8 (-61 bis 74)
LCrot - LCblau	64	0,92	0,74	1,52 (1,28 bis 1,86)	-4,48 (-13,97 bis 3,22)	16,8 (-39 bis 73)

Tabelle 4.11: *Methodenvergleich #RETIS*

%RETIS (%) Hund						
Geräte	**n**	**r**	**r_s**	**Steigung** (95% CI)	**y-Achsen-abschnitt** (95% CI)	**Mittelwerts-unterschied** (95%ige Übereinstimmungsgrenze)
Man - ADVIA 120	384	0,92	0,90	0,94 (0,89 bis 0,99)	0,16 (0,11 bis 0,21)	0,1 (-5,5 bis 5,6)
Man - LCrot	394	0,80	0,81	0,45 (0,41 bis 0,49)	0,25 (0,20 bis 0,29)	-1,8 (-10,1 bis 6,5)
Man - LCblau	293	0,81	0,88	0,57 (0,52 bis 0,64)	0,24 (0,18 bis 0,29)	-1,1 (-8,8 bis 6,6)
ADVIA 120 - LCrot	386	0,78	0,85	0,51 (0,46 bis 0,55)	0,14 (0,11 bis 0,18)	-2,0 (-10,7 bis 6,6)
ADVIA 120 - LCblau	291	0,80	0,90	0,64 (0,59 bis 0,71)	0,11 (0,07 bis 0,15)	-1,2 (-9,3 bis 6,9)
LCrot - LCblau	296	0,92	0,93	1,29 (1,23 bis 1,37)	-0,10 (-0,15 bis -0,05)	0,7 (-3,8 bis 5,2)
%RETIS (%) Katze						
Geräte	**n**	**r**	**r_s**	**Steigung** (95% CI)	**y-Achsen-abschnitt** (95% CI)	**Mittelwerts-unterschied** (95%ige Übereinstimmungsgrenze)
Man - ADVIA 120	116	0,95	0,71	1,04 (0,88 bis 1,19)	0,19 (0,15 bis 0,20)	0,2 (-1,4 bis 1,7)
Man - LCrot	106	0,78	0,55	0,61 (0,51 bis 0,78)	0,34 (0,29 bis 0,35)	-0,0 (-3,0 bis 2,9)
Man - LCblau	68	0,89	0,59	0,86 (0,65 bis 1,25)	0,43 (0,35 bis 0,47)	0,3 (-1,8 bis 2,5)
ADVIA 120 - LCrot	111	0,81	0,75	0,62 (0,50 bis 0,78)	0,22 (0,17 bis 0,27)	-0,3 (-3,4 bis 2,9)
ADVIA 120 - LCblau	69	0,94	0,71	0,94 (0,76 bis 1,15)	0,25 (0,18 bis 0,36)	0,2 (-1,5 bis 1,8)
LCrot - LCblau	64	0,93	0,76	1,63 (1,38 bis 1,98)	-0,08 (-0,26 bis 0,03)	0,4 (-2,3 bis 3,1)

Tabelle 4.12: *Methodenvergleich %RETIS*

Die absoluten Retikulozytenzahlen zeigen beim Methodenvergleich gute Korrelationen zwischen der manuellen Auszählung und dem ADVIA® 120 (Abbildung 4.8) sowie zwischen den beiden LaserCyte-Geräten. Für die Gegenüberstellung manuell-ADVIA® 120 ergibt sich ein negativer systematischer Fehler (Steigung 0,91, y-Achsenabschnitt 10,56) und die 95%ige Übereinstimmungsgrenze von -153 bis 158 x 10^9/l spricht für eine starke Streuung der Daten.

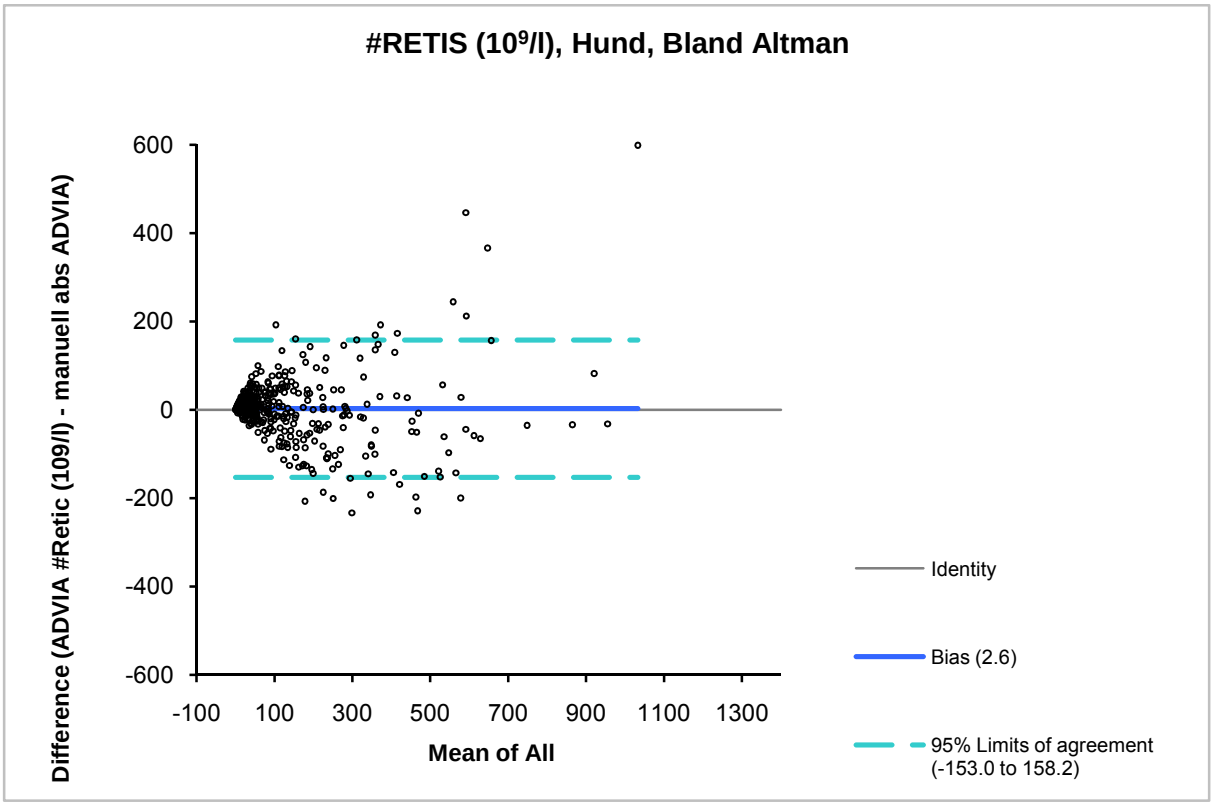


Abbildung 4.8: *#RETIS (10^9/l) Bland Altman [manuell – ADVIA 120] Hund*

Der Vergleich LCrot-LCblau zeigt mit einem Mittelwertsunterschied von 13,9 x 10^9/l einen leichten konstanten systematischen Fehler. Zusätzlich ist ein proportionaler systematischer Fehler vorhanden (Steigung 1,2).

Durch die manuelle Auszählung als Referenzmethode wird deutlich, dass die Retikulozyten beim LaserCyte® gravierend in ihrer Zahl unterschätzt werden. Es ist sowohl ein ausgeprägter negativer proportionaler systematischer Fehler (Steigung 0,41-0,51, y-Achsenabschnitt 16,27-16,71) als auch eine weite 95%ige Übereinstimmungsgrenze (ca. -250 bis 150 x 10^9/l) nachweisbar (Abbildung 4.9 und 4.10).

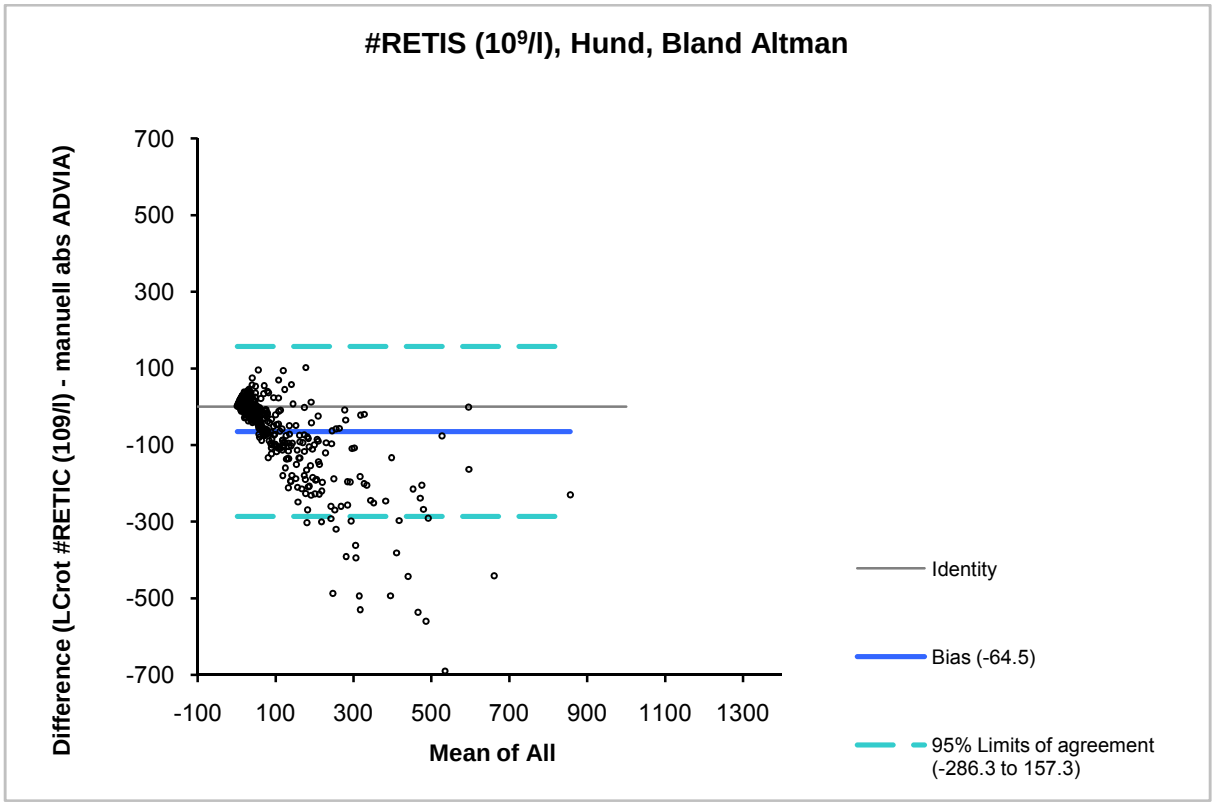


Abbildung 4.9: *#RETIS (10^9/l) Bland Altman [manuell – LCrot] Hund*

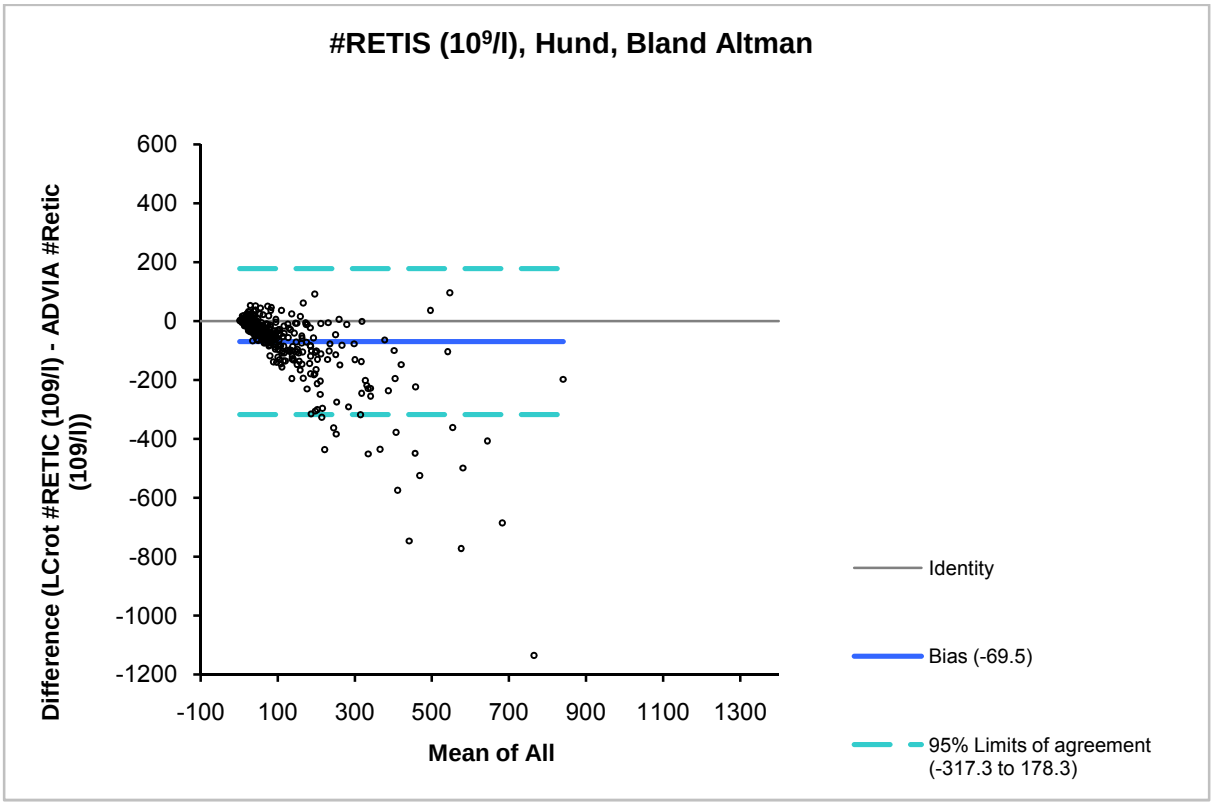


Abbildung 4.10: *#RETIS (10^9/l) Bland Altman [ADVIA 120 - LCrot] Hund*

Für die prozentualen Retikulozytenzahlen ergeben sich für den Hund vergleichbare Ergebnisse.

Entsprechend der Auswertungen beim Hund werden die Retikulozyten durch den LaserCyte® auch bei der Katze bei hohen Werten deutlich unterschätzt (Abbildung 4.11. und 4.12 und Tabellen 4.11 und 4.12).

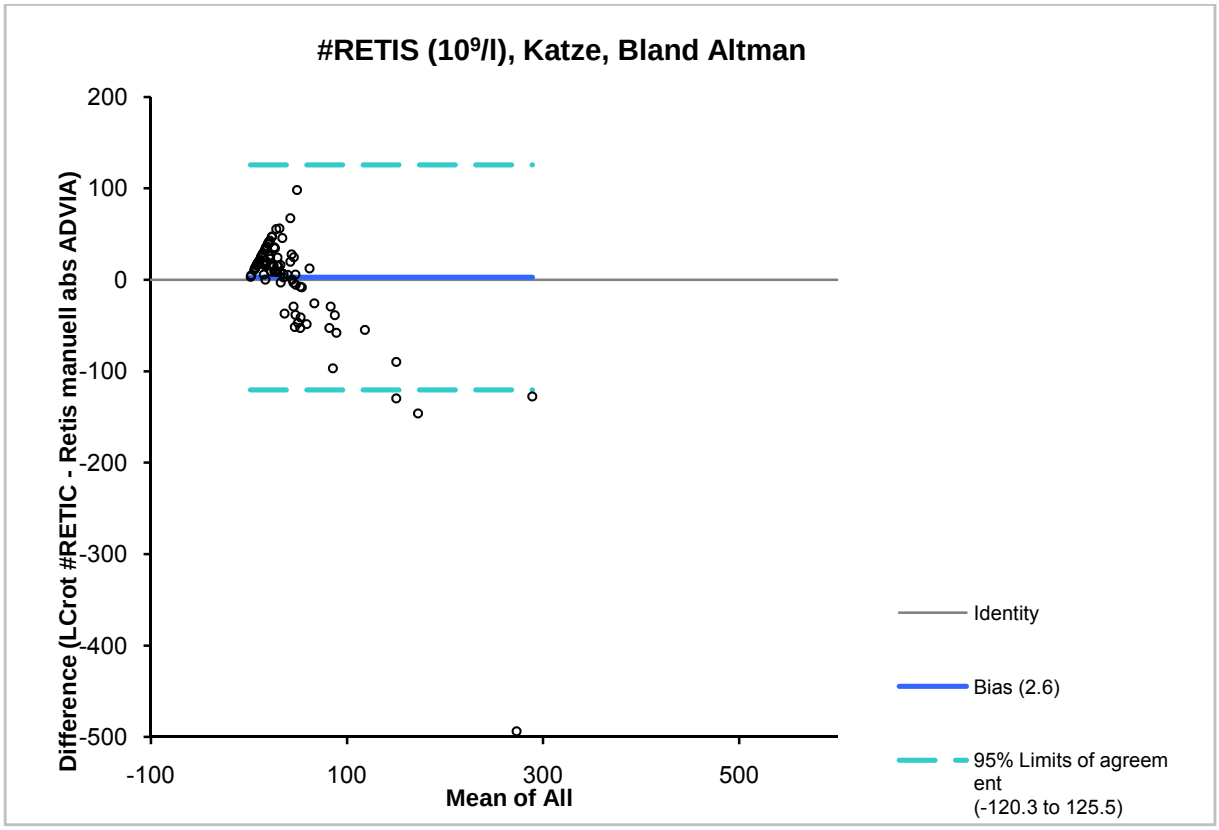


Abbildung 4.11: *#RETIS (10^9/l) Bland Altman [manuell –LCrot] Katze*

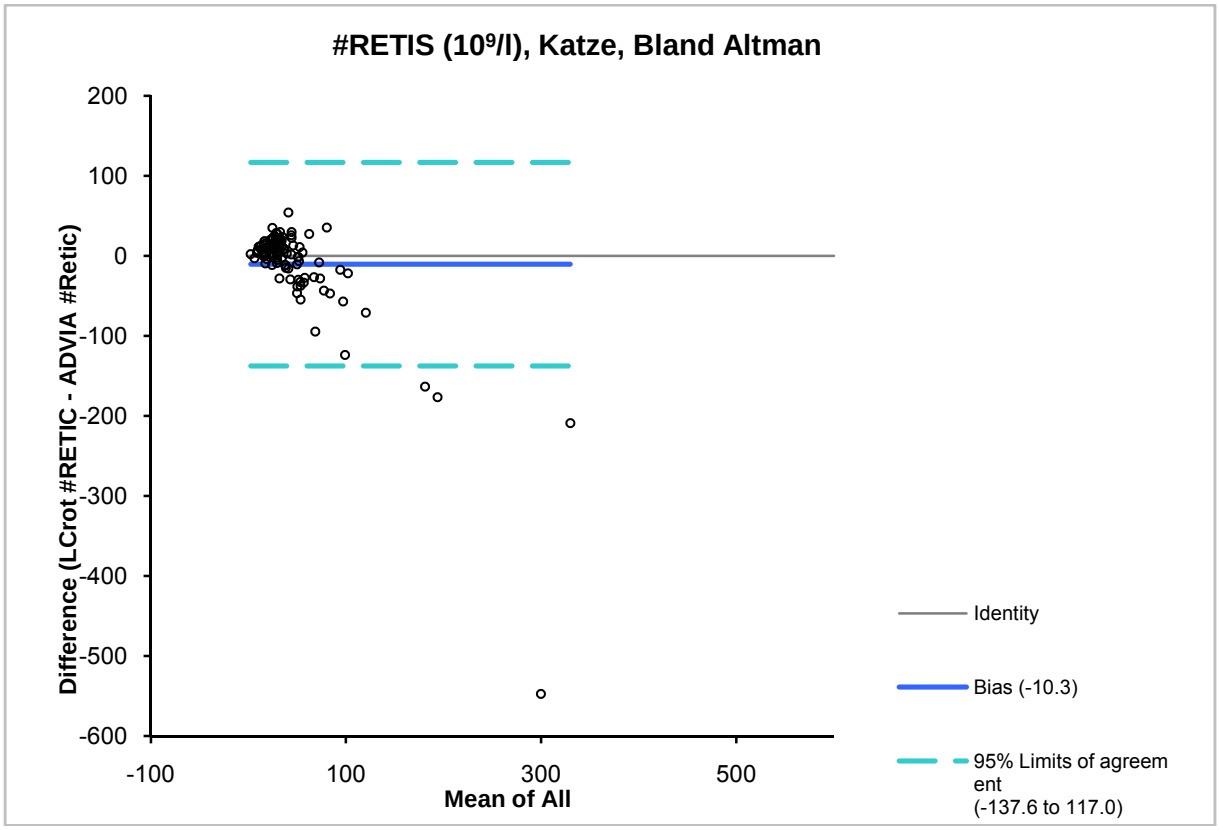


Abbildung 4.12: *#RETIS (10^9/l) Bland Altman [ADVIA 120-LCrot] Katze*

4.3 Gesunde Tiere

4.3.1 Referenzwerte

Die Referenzwerte für alle Parameter des roten Blutbildes werden von 60 gesunden Hunden und 44 gesunden Katzen erstellt.

In den Tabellen 4.13 und 4.14 sind die durch verschiedene Methoden berechneten eigenen Referenzwerte für Hund und Katze dargestellt.

HUND		nicht transformierte Daten		Box-Cox transformierte Daten		
		Standard	Robust	Standard	Robust	nicht-parametrisch
RBC 10^{12}/l	**ADVIA 120**	5,79-8,40	5,71-8,36	5,98-8,58	5,97-8,57	5,89-8,25
	LCrot	5,27-8,46	5,31-8,51	-	-	4,76-8,07
	LCblau	5,49-8,37	5,41-8,30	5,70-8,58	5,69-8,58	5,51-8,31
HGB mmol/l	**ADVIA 120**	8,58-12,88	8,48-12,78	8,84-13,12	8,84-13,13	8,80-12,95
	LCrot	9,09-14,11	8,93-13,98	9,17-14,15	9,05-14,03	9,30-14,45
	LCblau	8,20-12,46	8,00-12,28	8,55-12,81	8,54-12,79	8,48-12,73
HKT l/l	**PCV**	0,40-0,58	0,39-0,57	0,41-0,59	0,41-0,59	0,41-0,59
	ADVIA 120	0,40-0,57	0,39-0,56	0,40-0,57	0,40-0,57	0,40-0,56
	LCrot	0,36-0,58	0,37-0,58	0,36-0,57	0,36-0,57	0,34-0,56
	LCblau	0,38-0,60	0,38-0,60	0,39-0,61	0,39-0,61	0,39-0,60
MCV fl	**ADVIA 120**	63,0-72,6	63,3-72,9	63,0-72,6	63,3-72,9	62,2-71,4
	LCrot	63,6-73,8	63,6-74,1	62,7-73,1	62,7-73,1	62,8-72,4
	LCblau	66,0-75,6	66,1-75,8	65,5-75,2	65,6-75,3	65,8-74,9
MCH fmol	**ADVIA 120**	1,37-1,65	1,38-1,66	1,35-1,63	1,34-1,63	1,36-1,62
	LCrot	1,28-2,12	1,21-2,08	1,40-2,15	1,38-2,11	1,41-2,30
	LCblau	1,30-1,69	1,29-1,68	1,33-1,71	1,33-1,72	1,30-1,67
MCHC mmol/l	**ADVIA 120**	21,1-23,5	21,1-23,6	21,0-23,4	20,9-23,4	20,6-23,5
	LCrot	19,1-30,5	18,3-29,8	20,9-32,2	20,8-32,0	20,3-32,7
	LCblau	18,5-23,7	18,2-23,5	19,3-24,6	19,3-24,7	19,5-23,5
RDW %	**ADVIA 120**	11,4-14,2	11,3-14,1	11,6-14,4	11,6-14,4	11,5-14,5
	LCrot	14,0-16,0	13,9-15,9	14,0-16,0	13,9-15,9	14,2-16,4
	LCblau	14,3-16,5	14,1-16,4	-	-	14,6-16,6
#Retis 10^9/l	**Manuell**	0-87,4	0-85,2	-	-	0-104,8
	ADVIA 120	0-110,3	0-103,8	13,9-131,5	13,8-130,8	12,2-124,3
	LCrot	11,8-53,3	8,5-53,2	16,0-56,5	15,4-57,3	16,3-53,3
	LCblau	8,2-63,1	5,8-61,2	18,1-75,1	18,0-75,6	19,3-67,8
%Retis %	**Manuell**	0-1,19	0-1,15	0-1,26	0-1,23	0-1,30
	ADVIA 120	0-1,46	0-1,38	0,21-1,79	0,21-1,79	0,19-1,57
	LCrot	0,21-0,74	0,19-0,73	0,25-0,76	0,24-0,76	0,25-0,80
	LCblau	0,15-0,88	0,12-0,88	0,27-0,98	0,37-0,98	0,28-0,84
RI		0-1,31	0-1,28	0-1,34	0-1,31	0-1,44
RPI		0-1,31	0-1,28	0-1,34	0-1,31	0-1,44

Tabelle 4.13: *Referenzwerte Hund*

KATZE		nicht transformierte Daten		Box-Cox transformierte Daten		
		Standard	Robust	Standard	Robust	nicht-parametrisch
RBC 10^{12}/l	**ADVIA 120**	6,61-10,77	6,54-10,70	6,94-11,07	6,95-11,11	6,94-10,37
	LCrot	5,91-10,73	5,89-10,71	5,97-10,79	5,98-10,80	5,59-10,56
	LCblau	5,93-10,27	5,81-10,19	-	-	-
HGB mmol/l	**ADVIA 120**	5,99-9,55	6,05-9,66	5,79-9,37	5,80-9,39	5,82-9,39
	LCrot	6,51-10,60	6,53-10,72	6,24-10,38	6,22-10,41	6,53-10,21
	LCblau	6,61-9,23	6,25-9,36	5,86-8,96	5,88-8,98	-
HKT l/l	**PCV**	0,30-0,45	0,30-0,46	0,29-0,44	0,29-0,44	0,28-0,44
	ADVIA 120	0,28-0,43	0,28-0,44	0,27-0,43	0,27-0,43	0,27-0,42
	LCrot	0,29-0,48	0,29-0,48	0,27-0,46	0,27-0,46	0,26-0,45
	LCblau	0,28-0,44	0,28-0,45	0,24-0,42	0,25-0,42	-
MCV fl	**ADVIA 120**	34,4-48,3	34,4-48,4	34,1-48,0	34,0-48,0	31,5-48,3
	LCrot	36,2-55,3	36,8-55,8	35,5-52,6	35,3-52,6	25,7-53,2
	LCblau	35,7-53,0	35,8-53,3	-	-	-
MCH fmol	**ADVIA 120**	0,74-1,07	0,74-1,07	0,74-1,06	0,74-1,06	0,67-1,06
	LCrot	0,72-1,36	0,71-1,35	0,81-1,40	0,81-1,42	0,77-1,28
	LCblau	0,72-1,19	0,74-1,21	0,70-1,16	0,70-1,17	-
MCHC mmol/l	**ADVIA 120**	20,7-22,9	20,7-22,9	-	-	20,8-22,8
	LCrot	18,1-26,9	17,6-26,5	19,4-27,8	19,5-27,9	19,1-26,0
	LCblau	18,3-24,9	18,1-24,6	19,1-26,1	19,2-26,8	-
RDW %	**ADVIA 120**	13,3-17,5	13,2-17,5	13,5-17,7	13,5-17,7	13,1-17,1
	LCrot	16,8-20,0	16,9-20,0	16,7-19,9	16,7-19,9	16,5-19,8
	LCblau	17,5-23,8	16,9-23,5	18,4-25,0	18,3-24,8	-
#Retis 10^{9}/l	**Manuell**	0-49,8	0-45,4	0-49,8	0-45,4	0-56,0
	ADVIA 120	0-62,4	0-58,2	7,0-74,9	6,8-74,5	7,1-69,1
	LCrot	7,7-62,5	6,7-61,3	-	-	1,7-66,9
	LCblau	6,6-88,0	0,9-83,4	23,1-97,5	22,8-95,0	-
%Retis %	**Manuell**	0-0,57	0-0,52	-	-	0-0,78
	ADVIA 120	0-0,69	0-0,66	0,08-0,81	0,08-0,81	0,08-0,80
	LCrot	0,07-0,79	0,05-0,76	0,12-0,82	0,11-0,80	0,02-0,90
	LCblau	0-1,21	0-1,16	0-1,21	0-1,16	-

Tabelle 4.14: *Referenzwerte Katze*

Die unterschiedlichen Methoden zur Berechnung der Referenzwerte ergeben vergleichbare Ergebnisse. Für die weitere Arbeit werden die folgenden Referenzwerte übernommen:

Hund: Anämie PCV < 0,40 l/l
Regeneration > 60 x 10^9/l
MCV 63,0-72,6 fl
MCHC 20,6-23,5 mmol/l
RDW 11,5-14,5%

Katze: Anämie PCV < 0,28 l/l
Regeneration > 40 x 10^9/l
MCV 34,0-48,0 fl
MCHC 20,8-22,8 mmol/l
RDW 13,0-17,7%

Auffällig hohe Referenzbereiche sind für die prozentualen und absoluten Retikulozyten v.a. mit der manuellen Methode und für den ADVIA® 120 errechnet worden, aber im Hinblick auf die Unterschätzung der Retikulozytenzahlen des LaserCytes® auch bei diesem Gerät. Aus diesem Grund wird im Abschnitt 4.4.2.3 die optimale Anämieklassifikation durch die Erstellung von Receiver Operating Characteristic-Kurven (ROC-Kurven) näher untersucht.
Für die herkömmlichen Parameter der Regenerationbeurteilung wie dem RI und dem RPI werden gleiche Referenzwerte bestimmt, weil bei gesunden Hunden mit normalem Hämatokrit der Reifungsfaktor 1 benutzt wird. Die Werte für eine möglichst gute Anämieklassifikation werden daher bei den anämischen Tieren in Kapitel 4.4.2.3 festgelegt.

4.3.2 Morphologie gesunder Hunde und Katzen

Auf den Abbildungen 4.13 und 4.14 ist die Verteilung der Erythrozytenmorphologie auf Grundlage des TIC TAC TOE des ADVIA® 120 von gesunden Hunden und Katzen sichtbar. Beim Hund sind ca. ¼ der Proben rein normozytär-normochrom, 33% der Tiere zeigen außerdem makrozytär-normochrome Erythrozyten und 28% der Tiere normozytär-hyperchrome Zellen.

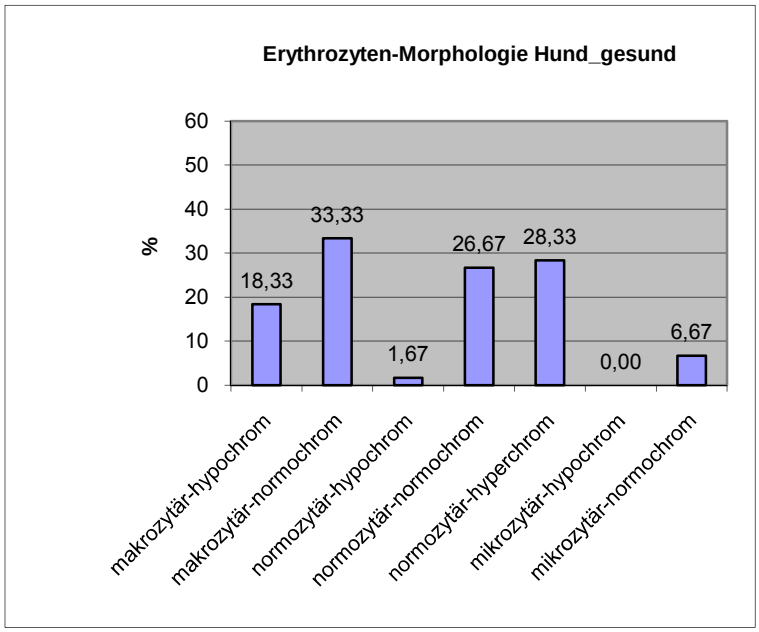


Abbildung 4.13: *Erythrozyten-Morphologie bei gesunden Hunden*

Bei den gesunden Katzen fällt knapp die Hälfte der Proben in den normozytär-normochromen Bereich, außerdem sind bei ca. je ¼ der Katzen normozytär-hypochrome bzw. makrozytäre Erythrozyten vorhanden.
Allerdings in anzumerken, dass die morphologischen Veränderungen im Gegensatz zu den meisten erkrankten Tieren als geringgradig einzustufen sind.

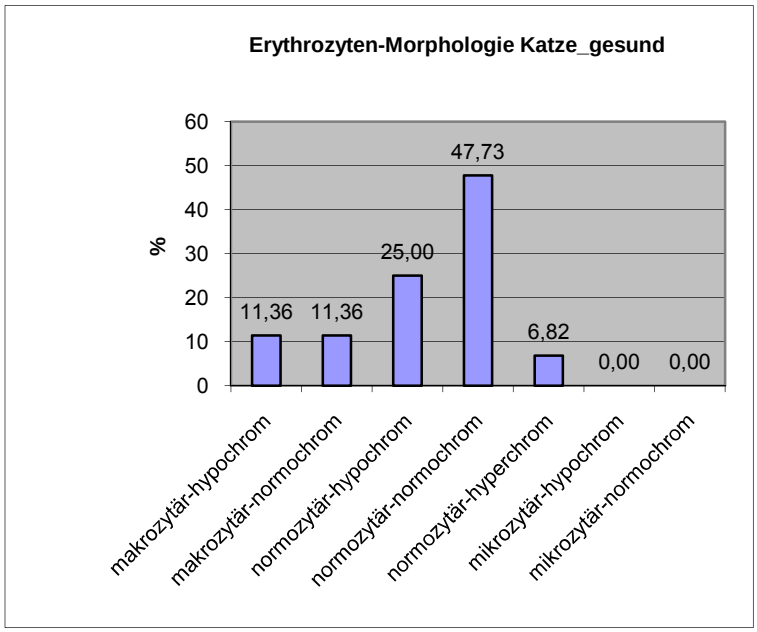


Abbildung 4.14: *Erythrozyten-Morphologie bei gesunden Katzen*

4.4 Kranke Tiere

4.4.1 Krank ohne Anämie

4.4.1.1 Hunde ohne Anämie

61 kranke Hunde ohne Anämie, aber mit morphologischen Veränderungen der Erythrozyten werden in die Studie eingeschlossen.

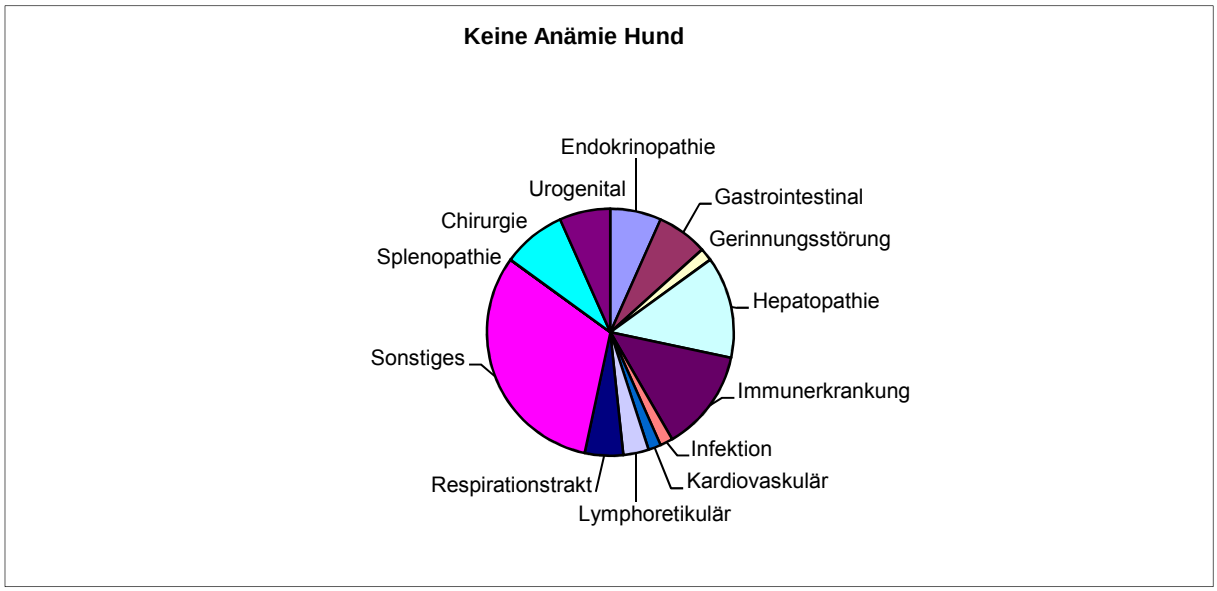


Abbildung 4.15: *Verteilung der Erkrankungen bei kranken Hunden ohne Anämie*

In Abbildung 4.15 ist die Verteilung der Krankheiten bei den Hunden ohne Anämie und mit morphologischen Veränderungen der Erythrozyten sichtbar. Die größte Gruppe stellt die Rubrik „Sonstiges“ dar, in der Tiere mit unbekannter Diagnose, unspezifischen Erkrankungen und Hunde mit Meningitis, Eisenmangelanämie und Pudelmakrozytose zusammengefasst sind. Die beiden nächstgrößten Gruppen sind die Hepatopathien, v.a. Hunde mit Lebershunt und Patienten mit Immunerkrankungen unter Therapie.

Ca. die Hälfte der Fälle weist trotz eines normalen Hämatokrits eine erhöhte Retikulozytenzahl auf (29 von 61). Von den 29 regenerativen Hunden sind 18 makrozytär-hypochrom und 10 haben gleichzeitig zu den erhöhten Retikulozyten einen erhöhten MCV. Der RDW ist bei 12 Hunden erhöht und der MCHC ist bei 17 Hunden erniedrigt. Bei 6 Fällen (21%) kann gleichzeitig eine erhöhte Retikulozytenzahl, ein erhöhter MCV und RDW und ein niedriger MCHC nachgewiesen werden.

Knapp die Hälfte der kranken Hunde ohne Anämie haben makrozytäre Zellen und ca. 17% weist mikrozytäre Erythrozyten auf (Abbildung 4.16).

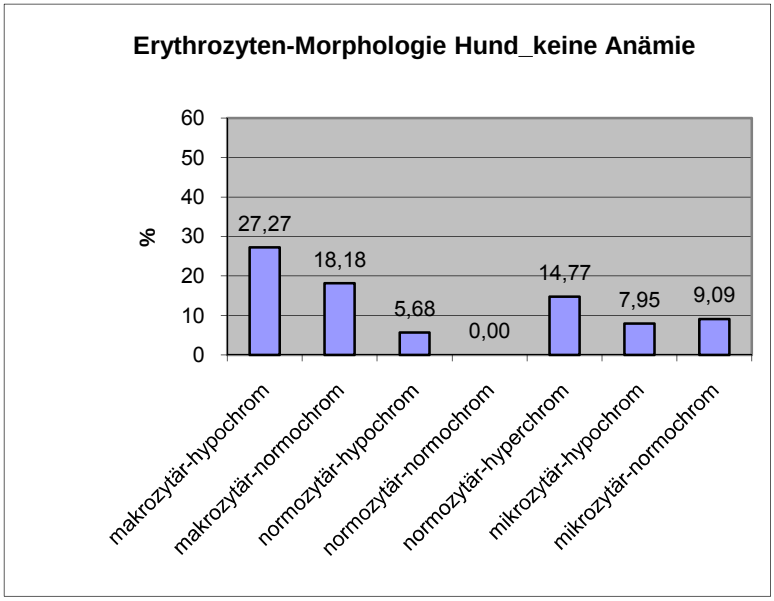


Abbildung 4.16: *Erythrozyten-Morphologie bei kranken Hunde ohne Anämie*

<u>Makrozytär-hypochrome Morphologie:</u>

24 Patienten zeigen makrozytär-hypochrome Zellen, 16 davon ausschließlich makrozytär-hypochrome Veränderungen. Von diesen 16 Hunden ist bei einem der MCV erniedrigt (90016092, Tendenz zu zusätzlich mikrozytären Erythrozyten, siehe Anhang auf CD), bei 9 normal und bei 6 erhöht. Der MCHC ist bei 10 niedrig verändert und bei 6 im normalen Bereich, während der RDW bei 12 Patienten normal und bei 4 erhöht ist.

3/4 der 24 Tiere mit makrozytär-hypochromen RBCs zeigen erhöhte Retikulozytenzahlen, davon ist bei 8 Tieren zuvor eine regenerative Anämie durch Immunhämolyse oder Blutungen vorhanden gewesen. Drei leiden unter einer endokrinologischen Grundursache (Hypophysentumor, Hyperadrenokortizismus, Phäochromozytom) und bei den anderen Patienten liegen unspezifische Erkrankungen vor.

Von den 6 Patienten ohne Regeneration stellen zwei Verlaufskontrollen einer ehemals regenerativen immunhämolytischen Anämie dar, ein Tier hat eine Leishmanien-Infektion und drei haben unspezifische Erkrankungen.

Makrozytär-normochrome Morphologie:

16 Fälle zeigen makrozytär-normochrome Erythrozyten, 3/4 sind regenerativ, 1/4 nicht regenerativ. Der MCV liegt bei drei Fällen im Referenzbereich, bei 13 ist er erhöht. Der MCHC ist bei 6 Tieren erniedrigt, bei 10 normal und der RDW ist bei 5 erhöht.

An Erkrankungen kommen drei Hunde mit Pudelmakrozytose, zwei mit Meningitis, drei Patienten mit immunhämolytischer Anämie, zwei mit gastrointestinalen Problemen und jeweils ein Fall mit Diabetes mellitus, Thrombozytopenie, Lymphom und Lungenkarzinom vor.

Normozytär-hypochrome Morphologie:

Bei 5 Patienten sind normozytär-hypochrome Zellen vorhanden. Bei diesen Tieren werden ein Fremdkörperileus, ein Lebershunt, eine Eisenmangelanämie (nach Bluttransfusion) und zwei unspezifische Erkrankungen diagnostiziert.

Normozytär-hyperchrome Morphologie:

In diese Gruppe fallen 13 Hunde, von denen 6 ausschließlich normozytär-hyperchrome Veränderungen zeigen. Bei diesen 6 Patienten lassen sich keine Veränderungen von MCV, MCHC und RDW nachweisen. An Erkrankungen liegen unspezifische Erkrankungen wie eine Tracheobronchitits, Juckreiz oder geringgradige Herzklappeninsuffizienzen vor.

Ca. 50% der 13 Tiere sind regenerativ.

Heinzkörpchen werden bei einem Fall im Blutausstrich gefunden.

Mikrozytär-hypochrome Morphologie:

Bei 7 Patienten sind die Erythrozyten mikrozytär-hypochrom verändert, die Hälfte zeigt Regeneration. Darunter sind drei Hunde mit portosystemischem Shunt, zwei mit immunhämolytischer Anämie, einer mit Eisenmangelanämie und einer mit Lymphom. Bei drei der 7 Fälle liegen neben den mikrozytär-hypochromen Zellen keine zusätzlichen Veränderungen vor. Bei allen wird ein Lebershunt nachgewiesen und sie zeigen jeweils einen normalen RDW und MCV und einen erniedrigten MCHC.

Mikrozytär-normochrome Morphologie:

Mikrozytäre Erythrozyten bei normalem Eisengehalt sind bei 8 Patienten vorhanden. 5 davon leiden an einer Hepatopathie (drei Lebershunts, eine Leberzirrhose, eine Leberfunktionsstörung unbekannter Genese). Die restlichen drei Fälle haben einen PDA, Wundheilungsstörung nach Operation bzw. einen Blasenhalstumor.

Von 6 Patienten mit ausschließlich mikrozytären Veränderungen liegt der MCV bei 5 erwartungsgemäß niedrig, bei einem im normalen Bereich (90024199, Tendenz zu zusätzlich makrozytär-normochromen Zellen). RDW und MCHC sind jeweils bei 4 Fällen normal und bei zwei verändert.

4.4.1.2 Katzen ohne Anämie

33 Katzen zeigen bei normalem Hämatokrit morphologische Veränderungen der Erythrozyten.

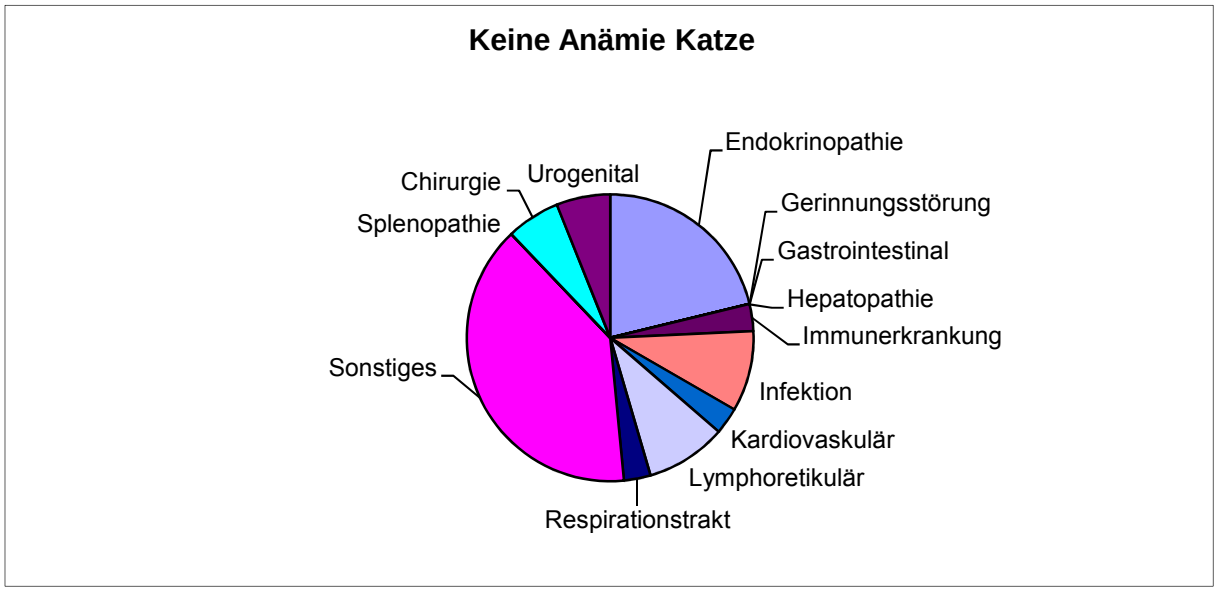


Abbildung 4.17: *Verteilung der Erkrankungen bei kranken Katzen ohne Anämie*

Wie in Abbildung 4.17 dargestellt ist die Gruppe „Sonstiges“ wie beim Hund am stärksten vertreten. Bei der Katze fallen darunter Patienten mit unbekannter Diagnose und unspezifischen Erkrankungen. Die zweithäufigste Rubrik stellen die Endokrinopathien mit Hyperthyreosen und einem Diabetes mellitus dar.

Bei über 50% der Tiere sind die roten Blutkörperchen normozytär-hypochrom und bei ca. 1/3 der Proben makrozytär-hypochrom. Mikrozytäre Erythrozyten sind nicht nachzuweisen (Abbildung 4.18).
Bei 2/3 der Patienten liegt die Retikulozytenzahl im Referenzbereich.

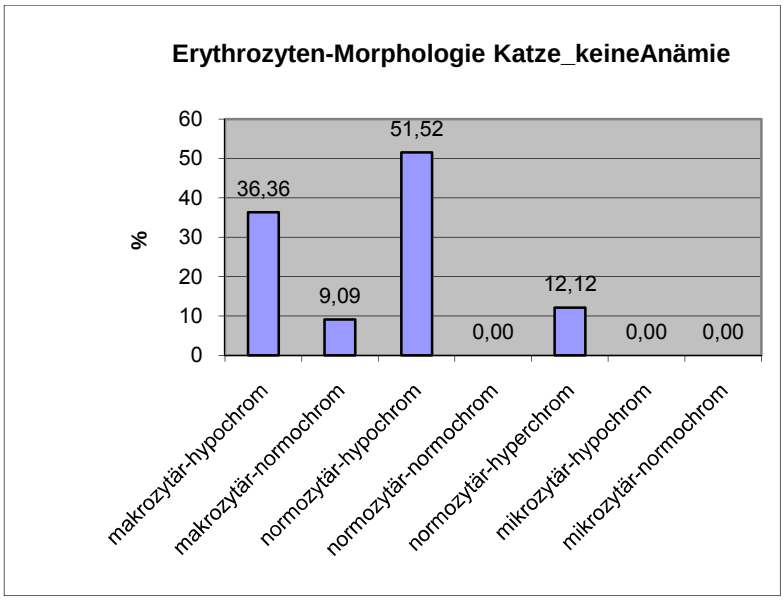


Abbildung 4.18: *Erythrozyten-Morphologie bei kranken Katzen ohne Anämie*

Makrozytär-hypochrome Morphologie:

12 Katzen zeigen makrozytär-hypochrome Erythrozyten, von denen 4 regenerativ und 7 nicht regenerativ sind. Der MCV liegt bei 4 Tieren oberhalb des Referenzbereiches, der MCHC ist bei 6 Patienten erniedrigt und der RDW ist 5x erhöht. Bei drei Tieren liegt eine Endokrinopathie vor (zwei Diabetes mellitus, eine Hyperthyreose nach Radio-Jod-Therapie), jeweils ein Tier hat ein Lymphom bzw. eine immunhämolytische Anämie unter Therapie und der Rest hat unspezifische Erkrankungen.

Makrozytär-normochrome Morphologie:

Makrozytär-normochrome Veränderungen liegen bei drei Katzen vor, welche alle eine nicht regenerative Anämie zeigen. MCV und RDW sind in jeweils einem Fall erhöht und MCHC bei zwei Tieren erniedrigt. Bei einem Patienten wird ein Lymphom mit FeLV-Infektion, bei einem eine FIV diagnostiziert und bei einer Katze ist die Erkrankung unbekannt.

Normozytär-hypochrome Morphologie:

Mit 17 Fällen stellen die normozytär-hypochromen Katzen die größte Gruppe dar. 11 Patienten weisen eine erhöhte Retikulozytenzahl auf.

Von den 17 Proben sind bei 13 außer den normozytär-hypochromen Zellen keine anderen Veränderungen sichtbar. Davon ist bei 8 Tieren der MCHC erniedrigt, RDW und MCV liegen im normalen Bereich. Die zugrunde liegenden Erkrankungen sind unspezifisch.

Normozytär-hyperchrome Morphologie:

4 Tiere haben normozytär-hyperchrome Zellen, alle sind nicht regenerativ. Bei allen ist der MCV normal und bei jeweils einem Fall sind MCHC und RDW verändert. Außer bei einem Tier können bei allen Heinzkörpchen im Blutausstrich erkannt werden.

Bei jeweils einem Patienten wird ein Diabetes mellitus, eine Sepsis, ein Lymphom Grad V versus ALL bzw. eine Hypokalzämie diagnostiziert.

4.4.2 Krank mit Anämie

4.4.2.1 Hunde mit Anämie

Von den 268 Hunden mit Anämie wird die Anämie bei 2/3 der Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung als regenerativ und bei 1/3 als nicht regenerativ klassifiziert. Die Anämie ist bei 78 Hunden geringgradig, bei 106 mittelgradig und bei 84 hochgradig.

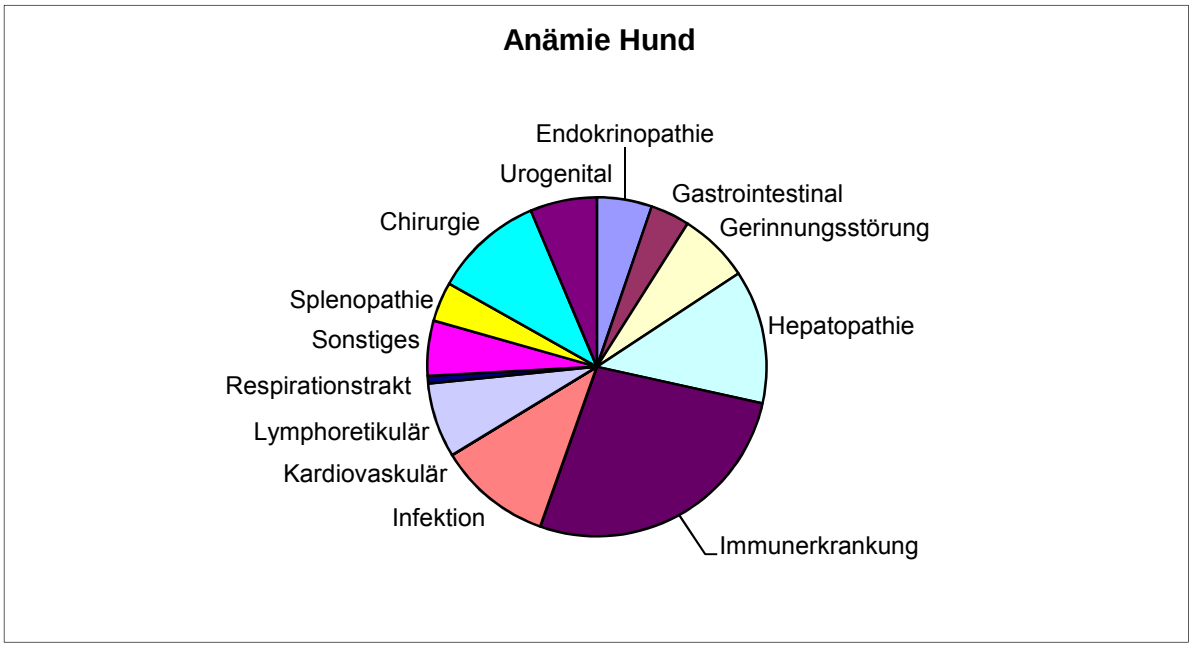


Abbildung 4.19: *Verteilung der Erkrankungen bei Hunden mit Anämie*

Hunde mit Anämie leiden am häufigsten unter einer primären oder sekundären Immunerkrankung. Außerdem wird die Anämie bei Hunden ebenfalls häufig durch Hepatopathien, chirurgische Erkrankungen und Infektionen wie Babesiose, Leishmaniose, Parvovirose oder einer Sepsis ausgelöst (Abbildung 4.19).

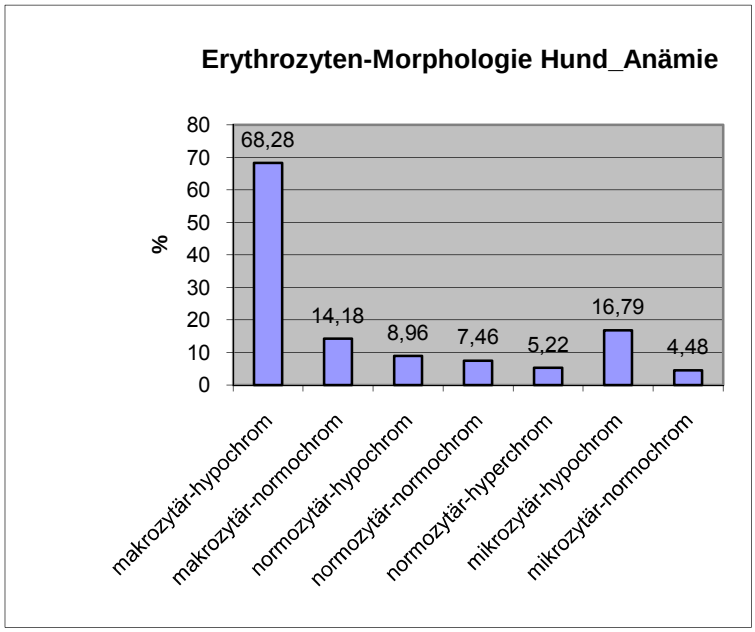


Abbildung 4.20: *Erythrozyten-Morphologie bei Hunden mit Anämie*

In Abbildung 4.20 ist die Verteilung der Erythrozytenmorphologie der anämischen Hunde veranschaulicht. Ca. 2/3 der Hunde haben eine makrozytär-hypochrome

Anämie, was mit der Menge an regenerativen Anämien übereinstimmt. Keine morphologischen Veränderungen sind nur bei einem geringen Prozentsatz zu verzeichnen. Mikrozytäre Erythrozyten kommen bei ca. 20% der Hunde vor.

Von den 172 Hunden mit einer regenerativen Anämie sind 151 makrozytär-hypochrom. Die 21 Hunde, die trotz Regeneration keine makrozytär-hypochromen Zellen haben, sind makrozytär-normochrom (6), normozytär-hypochrom (4) und mikrozytär-hypochrom (12).
Bei der Beurteilung aller Parameter, welche für eine Regeneration sprechen können (Retikulozyten, MCV, RDW, MCHC), ist eine gute Übereinstimmung von erhöhten Retikulozyten und einem erhöhten RDW zu verzeichnen (150/172). Zusätzlich zu einer Retikulozytose ist der MCV in 88 und der MCHC in 115 von 172 Fällen verändert. In 36% der Blutproben sind gleichzeitig erhöhte Retikulozyten, erhöhter MCV und RDW und ein niedriger MCHC nachzuweisen.

Die 88 nicht regenerativen Anämien der Hunde zeigen eine heterogene Verteilung hinsichtlich der Erythrozytenmorphologie. 17 von 88 haben normozytär-normochrome Zellen, die Mehrzahl der Erythrozyten zeigt eine makrozytär-hypochrome oder makrozytär-normochrome Morphologie.
Trotz einer niedrigen Retikulozytenzahl haben 38 von 88 Hunden einen erhöhten RDW, 32 einen erhöhten MCV und 21 einen erniedrigen MCHC.

<u>Makrozytär-hypochrome Anämie:</u>
Die Gruppe mit makrozytär-hypochromen Veränderungen stellt bei den Hunden mit 183 Fällen die größte Unterabteilung dar. Die meisten Patienten zeigen sich regenerativ (152), 25 sind nicht regenerativ.
Trotz der makrozytären Erythrozyten haben 6 einen erniedrigten MCV (90008196, 90009191, 90010124, 90016642, 90017222, 90021801), bei 5 dieser Hunde wird ein Lebershunt mit mikrozytären RBCs diagnostiziert. 80 haben einen normalen MCV und bei 97 Tieren ist er erhöht.
Bei 118 Fällen wird ein erniedrigter MCHC nachgewiesen, bei 57 keine Veränderung hinsichtlich des MCHC und bei 8 Patienten ist der MCHC erhöht. 6 der Patienten mit erhöhten MCHC-Werten haben eine immunhämolytische Anämie mit

Autoagglutination (90008299, 90009394, 90014182, 90020148, 90020250, 90020579), einer eine Babesiose (99990026) und einer ein Lymphom (99990091).
Der RDW ist 24 Mal normal und 11 Mal erhöht.
Bezüglich der Erkrankungen sind Patienten von allen Krankheits-Gruppen vertreten. Mit ca. 35% bilden die Tiere mit einer primären oder sekundären immunhämolytischen Anämie die größte Gruppe. Ca. 80% in dieser Gruppe zeigen eine Regeneration.
Tiere mit chirurgischen Problemen stellen mit 22 Fällen die nächstgrößte Gruppe dar. Darunter sind in absteigender Reihenfolge Diskopathien, Blutungsanämien nach Operationen, Wundheilungsstörungen, Bissverletzungen, Stöckchenverletzung, Paraparese und eine Lahmheit vertreten. Außer einem Tier sind alle regenerativ.
Von den Tieren mit infektiösen Erkrankungen haben 18 Tiere makrozytär-hypochrome Erythrozyten. Alle außer einem Fall zeigen erhöhte Retikulozytenzahlen. Babesiose (5), Leishmaniose (6) und Sepsis (7) werden bei diesen Patienten nachgewiesen.
14 Tiere mit einer Hepatopathie (11 mit erworbenem oder angeborenen Lebershunt, einer mit ungeklärten Leberfunktionsstörung, einer mit Leberzirrhose, einer mit Cholangiokarzinom) haben zu meist mikrozytären Zellen gleichzeitig makrozytär-hypochrome Erythrozyten. Alle diese Tiere haben eine regenerative Anämie.
5 Tiere mit Lymphom und 7 mit Knochenmarkserkrankungen (Panzytopenie, Myelofibrose, myelodysplastisches Syndrom, CLL) bilden die lymphoretikuläre Gruppe mit makrozytären Zellen. 4 der 12 Patienten zeigen keine Regeneration, diese haben eine Knochenmarkserkrankung.
Eine endokrinologische Grunderkrankung kann bei 12 Patienten festgestellt werden. 5 Proben eines Tieres mit einer Blutungsanämie durch Ovarialzysten, ein Hund mit einer Blutungsanämie im Rahmen eines Hypoadrenokortizismus, 4 Hunde mit einem Diabetes mellitus und jeweils ein Patient mit einem Hyperadrenokortizismus und einer Hypothyreose sind vorhanden. Bei 8 Patienten ist die Anämie regenerativ, bei 4 nicht regenerativ (zweimal Ovarialzyste, einmal Diabetes mellitus, einmal Hypothyreose).
11 Tiere leiden an einer Blutungsanämie durch eine Gerinnungsstörung, von denen 10 regenerativ sind. Dabei sind 5 Hunde mit Thrombozytopenie, drei mit Cumarinderivatintoxikationen, zwei Hämophilie-Tiere und eines mit tumorbedingter DIC vertreten.

Bei 10 Hunden kann eine Milzerkrankung (einmal eine eitrige Splenitis, einmal eine Milztorsion, 8 x Milztumor) festgestellt werden. Die meisten Tiere sind wie auch in der Gruppe der gastrointestinalen Erkrankungen regenerativ. 7 Hunde zeigen eine gastrointestinal bedingte Blutungsanämie, die durch entzündliche oder neoplastische Magen-Darmveränderungen verursacht wird.
Drei Hunde mit einer Niereninsuffizienz, ein Hund mit hämorrhagischer Zystitis und ein Hund mit einer Prostataerkrankung zeigen makrozytär-hypochrome Zellen. Alle Tiere habe hohe Retikulozytenzahlen.
Außerdem sind drei Tiere mit einer Eisenmangelanämie, ein Patient mit Bronchialkarzinom und zwei Tiere mit Anämie unbekannter Genese vorhanden.

Makrozytär-normochrome Anämie:

Insgesamt gehen 38 Hunde in die Gruppe der makrozytär-normochromen Anämie ein, von denen 75% keine Regeneration zeigen. Bei jeweils 50% ist der MCV im normalen Bereich bzw. erhöht, 10 Tiere haben einen niedrigen MCHC, 23 einen normalen und 5 einen erhöhten MCHC. Der RDW liegt bei 16 Hunden bei normalen Werten und ist bei 22 erhöht.
Erhöhte MCHC-Werte weisen die im oberen Abschnitt beschriebenen Patienten mit immunhämolytischer Anämie und Erythrozytenagglutinaten auf.
23 der 38 Fälle haben nur makrozytär-normochrome Zellen, davon sind 5 regenerativ und 18 nicht regenerativ. Bei 13 dieser 23 Tiere ist ein erhöhter MCV und bei 10 Tieren ein normaler MCV festzustellen.
Unter diese Gruppe fallen zwei Tiere mit Thrombozytopenie, 4 mit immunhämolytischer Anämie, einer mit Leishmaniose, zwei mit Lymphom, einer mit nicht-regenerativer Anämie, einer mit Lymphknotenabszess, 6 mit chronischer Niereninsuffizienz, einer mit nephrotischem Syndrom, zwei mit Blutungsanämie nach Operationen, einer mit steril-eitriger Meningitis, einer mit multiplen Hirninfarkten, einer mit PDA und einer mit Verdacht auf ektopischen Ureter.

Normozytär-hypochrome Anämie:

24 Patienten gehen in die Gruppe der normozytär-hypochromen Anämie ein, wovon 2/3 regenerativ und 1/3 nicht regenerativ sind.
Bei den regenerativen Proben sind i.d.R. zusätzlich makrozytäre Zellen vorhanden.

Die nicht regenerativen Patienten sind an einer Sepsis, Babesiose (drei), Diabetes mellitus, Lebershunt (zwei) oder einer Thrombozytopenie erkrankt.
Bei den Patienten, bei denen keine makro- oder mikrozytären Zellen zusätzlich sichtbar sind, weisen alle einen normalen RDW, 6 von 7 einen normalen MCV und 4 von 7 einen normalen MCHC auf. Bei den Proben mit einem erniedrigen MCHC (90009183, 90015585, 90018370) ist die Hypochromasie auf dem DotPlot deutlicher ausgeprägt als bei denen mit normalem MCHC (90012380, 90014160, 90017246, 99990002).

Normozytär-normochrome Anämie:

Es können 20 Tiere mit Anämie und normozytär-normochromen Erythrozyten gezählt werden. 5 Hunde mit einem portosystemischen Shunt und ein Tier mit Eisenmangelanämie zeigen neben der körpereigenen mikrozytären Erythrozyten-Population nach Bluttransfusion eine normozytär-normochrome Population vom gesunden Spendertier. Bei einem Patienten mit nicht regenerativer immunbedingter Anämie sind neben morphologisch unveränderten Erythrozyten makrozytär-normochrome Zellen im Sinne von Agglutinaten sichtbar.
Bei allen anderen Proben sind alle Erythrozyten morphologisch unverändert. Davon leiden 4 unter einer chronischen Niereninsuffizienz, zwei an einer immun-hämolytischen Anämie, zwei unter einer akuten Blutungsanämie nach Operation und zwei an einem Lymphom. Außerdem ist jeweils ein Patient mit Protein-Loosing-Enteropathie, Babesiose, nicht regenerativer Anämie und Fieber vorhanden.
Von den morphologisch unveränderten Proben wird jeweils einmal ein erniedrigter MCV (90013408, chronische Niereninsuffizienz, Tendenz zur Mikrozytose), ein erniedrigter MCHC (90018416, akute Blutungsanämie; Tendenz zur Regeneration) und ein erhöhter RDW (90018417, akute Blutungsanämie; Tendenz zur Regeneration) gemessen.

Normozytär-hyperchrome Anämie:

Bei 14 Patienten sind normozytär-hyperchrome Erythrozyten sichtbar und 50% davon zeigen eine erhöhte Retikulozytenzahl. Ein Hund mit Leberversagen und ein Hund mit Babesiose und DIC haben neben den normozytär-hyperchromen Zellen keine zusätzliche Makro- oder Mikrozytose. Bei beiden Tieren sind MCV, MCHC und RDW unverändert. Alle anderen Patienten (drei mit Immunerkrankung, drei mit Infektion,

einer mit Lymphom, einer mit Eisenmangel, einer mit Metaldehydvergiftung, einer mit Stöckenverletzung, einer mit Wundheilungsstörung nach Magendrehung, einer mit einer Milztorsion) weisen Veränderungen von MCV, MCHC und RDW entsprechend der zusätzlichen mikro- oder makrozytären Zellen auf.
Heinzkörperchen werden bei ca. 50% der Proben im Ausstrich gefunden (Immunhämolytische Anämie, Wundheilungsstörung, zweimal Sepsis, Lymphom, Stöckenverletzung, Milztorsion). Bei einem Teil dieser Tiere erfolgte eine Behandlung mit NSAIDs.

Mikrozytär-hypochrome Anämie:

Von den 45 Hunden mit einer mikrozytär-hypochromen Anämie überwiegen Patienten mit einer Leberfunktionsstörung aufgrund eines intra- oder extrahepatischen portosystemischen Shunts (44%) oder einer ungeklärten Leberfunktionsstörung (1 Patient). 9 Tiere mit mikrozytär-hypochromen Erythrozyten leiden an einer primären oder sekundären immunhämolytischen Anämie, wobei alle Patienten zusätzlich makrozytär-hypochrome Zellen aufweisen. Bei 5 Hunden wird eine Eisenmangelanämie nachgewiesen, die Ursache für die vermutete Blutung als Grund für den Eisenmangel kann allerdings nicht gefunden werden. Blutungen sind bei einem Tier mit Meläna unbekannter Genese, einem Hund mit metastasiertem Darmtumor, einem Patienten mit Hämophilie A und einem Tier mit Milztumor Ursache für die Anämie. Außerdem kommen mikrozytär-hypochrome Erythrozyten bei zwei Parvovirosen, einer Leishmaniose, einem Lymphknotenabszess und einem Tier mit Hautnekrosen nach einer Penisamputation vor.
Von den 45 Hunden mit mikrozytär-hypochromer Anämie zeigten 28 eine Regeneration und 12 keine erhöhte Retikulozytenzahl.
Bei 24 der 45 Hunde mit Mikrozytose ist gleichzeitig ein erniedrigtes MCV feststellbar. 19 dieser Patienten haben eine Leberfunktionsstörung (18 einen portosystemischen Shunt), zwei gastrointestinale Blutungen und je einer eine Parvovirose, eine Leishmaniose und eine Eisenmangelanämie. 11 Tiere weisen einen normalen MCV auf. Dabei sind unterschiedliche Erkrankungen vertreten, bei denen bei 7 neben den mikrozytären Zellen makrozytär-hypochrome Erythrozyten (90015417, 90015721, 90016224, 90016285, 90016415, 99990052, 99990074), bei zwei Patienten nach einer Bluttransfusion normozytär-normochrome Zellen (90007979, 90015541), bei einem Hund normozytär-hypochrome Zellen (90016370) vorhanden sind und bei

einem Tier (90008802) die Mikrozytose auf dem Dot-Plot nur ansatzweise ausgeprägt ist.
10 Patienten zeigen trotz mikrozytärer Erythrozyten einen erhöhten MCV. Dies sind 8 Tiere mit immunhämolytischer Anämie (90007858, 90007975, 90012337, 90012473, 90015715, 90019502, 90020579, 90030154) und ein Hund mit Eisenmangelanämie (90016362), die aufgrund einer Regeneration zusätzlich makrozytär-hypochrome Erythrozyten haben. Ein Hund mit Lymphknotenabszess (90018419) ist nicht regenerativ, ein Teil der Erythrozyten ist aber makrozytär-normochrom. Bei diesem Patienten und 4 weiteren (Parvovirose, drei portosystemische Shunts) kann ein normaler RDW nachgewiesen werden, bei allen anderen Messungen ist der RDW erhöht.
Der MCHC ist bei 38 von 45 Tieren erwartungsgemäß niedrig, bei 6 Tieren (Darmtumor (90025702), zwei portosystemische Shunts (90015721, 90021801), Immunhämolyse (99990074), Parvovirose (90008802), Eisenmangel (90007979)) ist der MCHC normal und bei einem Tier mit immunhämolytischer Anämie mit Erythrozytenagglutination (90020570) erhöht.

Mikrozytär-normochrome Anämie:
Eine mikrozytär-normochrome Anämie ist bei 12 Hunden nachzuweisen, zwei sind regenerativ, 8 nicht regenerativ. 4 Patienten haben eine Leberfunktionsstörung (drei davon portosystemischer Shunt), bei zwei Patienten sind Blutungen aufgrund einer Thrombozytopenie bzw. eines v.-Willebrand-Faktor-Mangels vorhanden, die restlichen Patienten haben andere Erkrankungen (chronische Niereninsuffizienz, Metaldehydvergiftung, Parvovirose, Hypoadrenokortizismus, immunhämolytische Anämie).
Bei 5 der 12 Proben ist der MCV erniedrigt, bei 7 im normalen Bereich. Jeweils 4 Mal sind ein erniedriger MCHC und ein erhöhter RDW messbar.
Bei den Proben mit einem normalen MCV bzw. erniedrigten MCHC oder einem erhöhten RDW sind zusätzlich makrozytär-normochrome oder makrozytär-hypochrome Zellen nachweisbar.

Da es sich bei den Hunden mit Anämie um eine unübersichtlich große Gruppe handelt, werden die Veränderungen von MCV, MCHC und RDW in den einzelnen morphologischen Gruppen zur besseren Übersichtlichkeit in Tabellenform präsentiert:

	Makrozytär-hypochrom	Makrozytär-normochrom	Normozytär-hypochrom	Normozytär-normochrom	Normozytär-hyperchrom	Mikrozytär-hypochrom	Mikrozytär-normochrom
MCV niedrig	6	-	3	5	2	24	5
MCV normal	80	19	17	16	9	11	7
MCV hoch	97	19	4	-	3	10	-
MCHC niedrig	118	10	14	6	4	38	4
MCHC normal	57	23	9	15	10	6	8
MCHC hoch	8	5	1	-	-	1	-
RDW normal	24	16	12	13	7	5	8
RDW hoch	111	22	12	8	7	40	4

Tabelle 4.15: *Veränderungen von MCV, MCHC und RDW in den morphologischen Gruppen*

4.4.2.2 Katzen mit Anämie

Bei 44 Katzen wird eine Anämie festgestellt. Im Unterschied zum Hund gibt es regenerative und nicht regenerative Anämien zu ungefähr gleichen Anteilen. Bei jeweils 15 Tieren ist die Anämie mittel- bzw. hochgradig und bei 14 Katzen geringgradig.

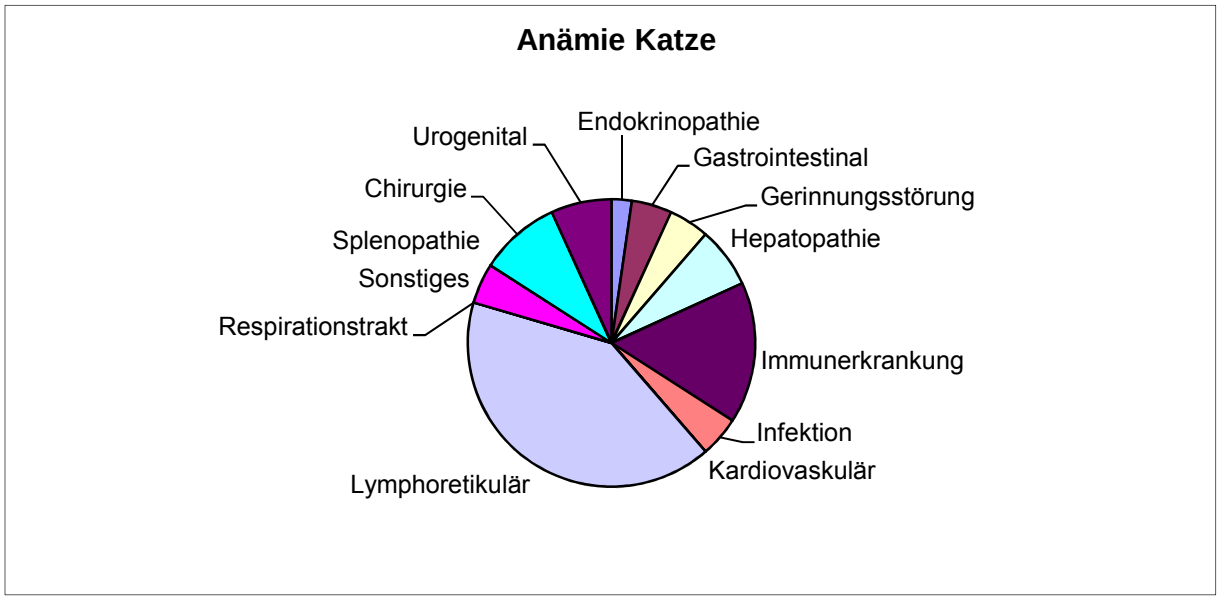


Abbildung 4.21: *Verteilung der Erkrankungen bei Katzen mit Anämie*

Wie aus Abbildung 4.21 ersichtlich ist die Anämie bei Katzen zu einem hohen Prozentsatz durch lymphoretikuläre Erkrankungen bedingt.

In Grafik 4.22 ist die Verteilung der Erythrozyten-Morphologie aufgezeigt. Die makrozytär-hypochrome Gruppe ist mit 45% am häufigsten vertreten, die zweithäufigste Morphologie bei anämischen Katzen ist die normozytär-hyperchrome Gruppe. Mikrozytäre Zellen können auf keinem Dotplot des ADVIA® 120 festgestellt werden.

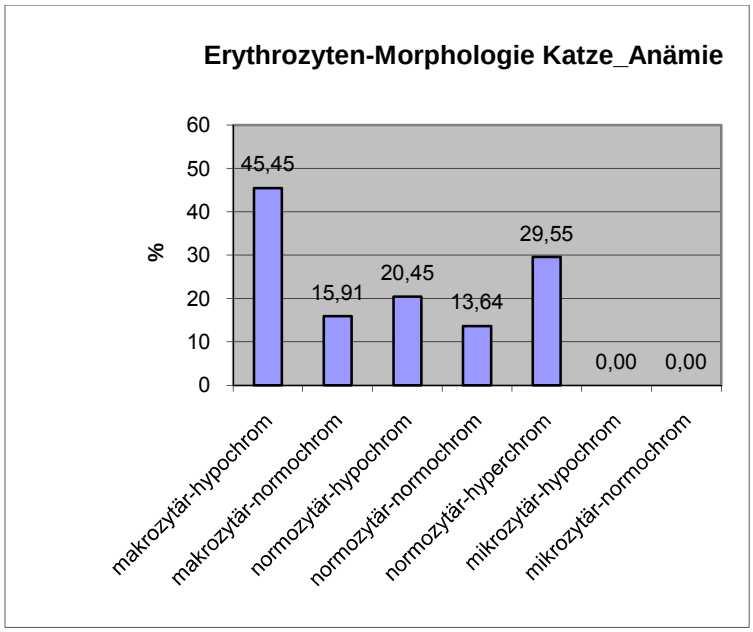


Abbildung 4.22: *Erythrozyten-Morphologie bei Katzen mit Anämie*

Makrozytär-hypochrome Anämie:

Von den 20 Katzen mit makrozytär-hypochromen Erythrozyten sind 18 regenerativ und bei 18 ist der RDW erhöht. Während der MCHC bei 9 erniedrigt, bei 10 normal und bei einem Tier erhöht ist (90012280, zusätzlich normozytär-hyperchrome Erythrozyten), liegt der MCV bei 14 Katzen im Referenzbereich und ist bei 6 erhöht.

Die Krankheitsverteilung bildet in den Immun- und lymphoretikulären Erkrankungen einen Schwerpunkt. 6 Proben von zwei verschiedenen Katzen mit einer immunhämolytischen Anämie werden gemessen, bei zwei Tieren werden ein Lymphom, bei drei Proben eines Katers eine Panzytopenie und bei einem Patienten eine nicht regenerative Anämie diagnostiziert. Desweiteren ist einmal eine Hyperthyreose, einmal ein Pyothorax und jeweils einmal eine Blutungsanämie durch eine Afibrinogenämie, nach Operation, nach Trauma und nach einer Bissverletzung nachweisbar.

Makrozytär-normochrome Anämie:

Makrozytär-normochrome Erythrozyten liegen bei 7 Patienten vor, 5 davon haben eine nicht regenerative Anämie. Der RDW ist bei 5 Tieren und der MCV bei drei Patienten erhöht und der MCHC liegt bei allen Katzen im Referenzbereich.

Ca. 70% der Tiere leiden an einer lymphoretikulären Erkrankung, bei 3 dieser 5 Patienten ist eine Anämie im Zusammenhang mit einer FeLV-Infektion nachweisbar. Die restlichen beiden Patienten haben eine Sepsis bzw. eine Hirnstammläsion.

Normozytär-hypochrom:

9 Tiere weisen normozytär-hypochrome Veränderungen auf, ca. die Hälfte ist regenerativ. 8 der 9 Katzen haben einen normalen MCV, 4 einen erniedrigten MCHC und 4 einen erhöhten RDW.

Das Spektrum der Krankheiten ist weit: Es sind zwei Tiere mit einer chronischen Niereninsuffizienz und jeweils ein Tier mit einem Darmtumor, Durchfall, einer Zubildung im Thorax, einer immunhämolytischen Anämie, Blutungen durch ein Leberproblem, eine Erythroleukämie und eine Gerinnungsstörung in dieser Gruppe.

Normozytär-normochrom:

Eine Anämie ohne morphologische Veränderungen ist bei 6 der 44 Katzen feststellbar. Alle Patienten sind nicht regenerativ und außer jeweils einer Probe mit

hohem RDW (99990097) bzw. niedrigem MCHC (99990106) sind MCV, RDW und MCHC unverändert. Unter diesen Tieren ist ein Kater mit portosystemischem Shunt, ein Tier mit chronischer Niereninsuffizienz, ein Patient mit nicht regenerativer Anämie und drei Tiere mit Lymphom (davon ein Fall FeLV positiv).

Normozytär-hyperchrom:

Von den 13 Patienten mit normozytär-hyperchromen Zellen liegen bei drei Tieren außer den hyperchromen Zellen keine zusätzlichen morphologischen Veränderungen vor. Von diesen drei Katzen ist bei zweien der RDW erhöht und jeweils bei einem Tier MCHC erhöht und MCV erniedrigt. Die Anämie liegt bei den drei Tieren im nicht regenerativen Bereich und die Grunderkrankung ist lymphoretikulär.
Bei 92% der Proben werden im Blutausstrich Heinzkörperchen nachgewiesen.

4.4.2.3 Anämieklassifikation

Aufgrund der deutlich unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Retikulozyten durch die manuelle Methode und die durchflusszytometrischen Verfahren des ADVIA® 120 und des LaserCytes® werden Sensitivität und Spezifität sowie ROC-Kurven für die Anämieklassifikation beider Geräte bestimmt.
Für die Klassifikation in regenerative und nicht regenerative Anämien wird für einen Cut-off-Wert von 60 x 10^9/l (Hund) bzw. 40 x 10^9/l (Katze) Retikulozyten die Sensitivität und Spezifität für den ADVIA® 120 und den LaserCyte® berechnet. Dabei ergibt sich für den ADVIA® 120 eine hohe Sensitivität von 97,0% für den Hund und 100,0% für die Katze und eine mäßige Spezifität von 77,1% für den Hund und 90,0% für die Katze. Der LaserCyte® liegt in der Sensitivität mit 71,6% für den Hund und 54,5% für die Katze deutlich unter dem Wert des ADVIA® 120, weist aber beim Hund eine höhere Spezifität von 88,5% (Tabelle 4.15).

	Sensitivität Hund	Spezifität Hund	Sensitivität Katze	Spezifität Katze
ADVIA 120	97,0%	77,1%	100,0%	90,0%
LaserCyte	71,6%	88,5%	54,5%	77,8%

Tabelle 4.15: *Sensitivitäten und Spezifitäten bei Hund und Katze zur Anämie-klassifikation (Cut-off Retikulozytenzahl bei 60 x 10^9/l für den Hund bzw. 40 x 10^9/l für die Katze)*

Aufgrund der deutlichen Unterschätzung der Retikulozytenzahl durch den LaserCyte® (Kapitel 4.2) und der schlechten Sensitivität ist zu überlegen, ob durch gerätespezifische Referenzwerte die Sensitivität verbessert werden kann.
Aus diesem Grunde werden ROC-Kurven angefertigt (Abbildung 4.23 und 4.24). Die Fläche unter der Kurve (AUC) liegt für den Hund beim ADVIA® 120 bei 97% und beim LaserCyte® etwas niedriger bei 91%. Bei der Katze ist die AUC für den ADVIA® 120 mit 98% vergleichbar mit den Werten des Hundes, der LaserCyte® schneidet mit einer AUC von 78% für die Tierarzt Katze deutlich schlechter ab.

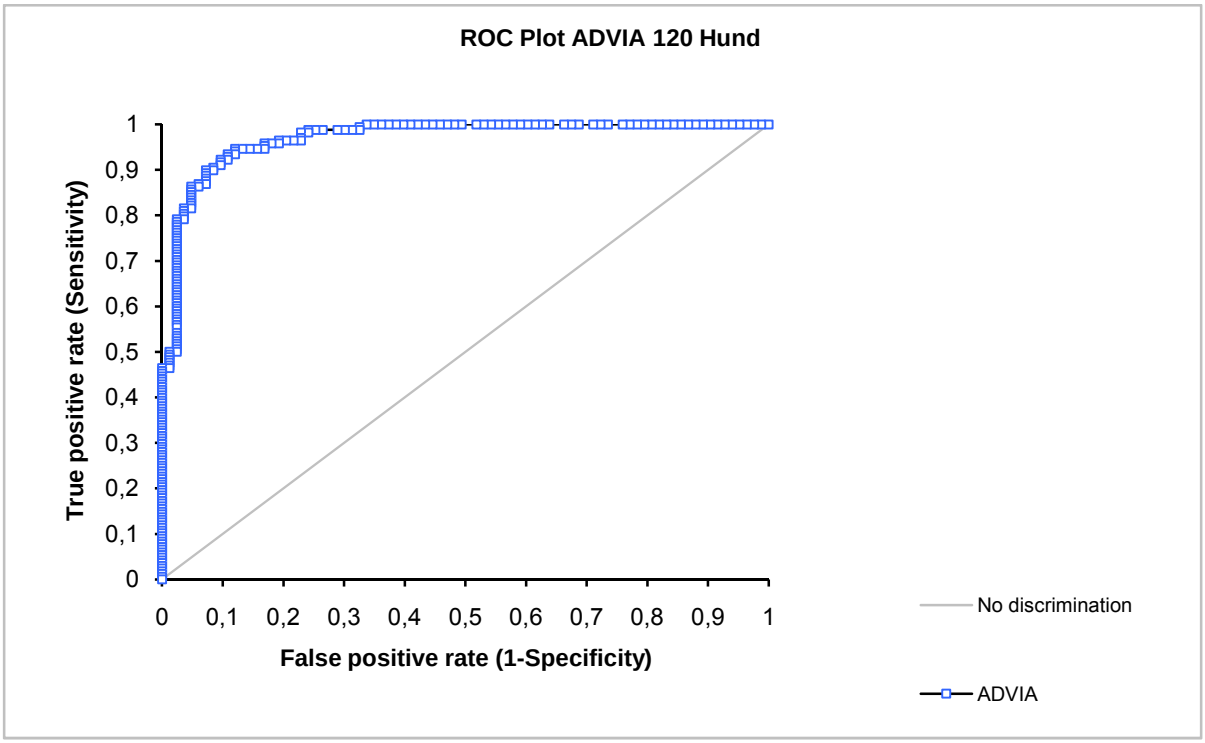


Abbildung 4.23: *ROC-Kurve ADVIA 120 Hund*

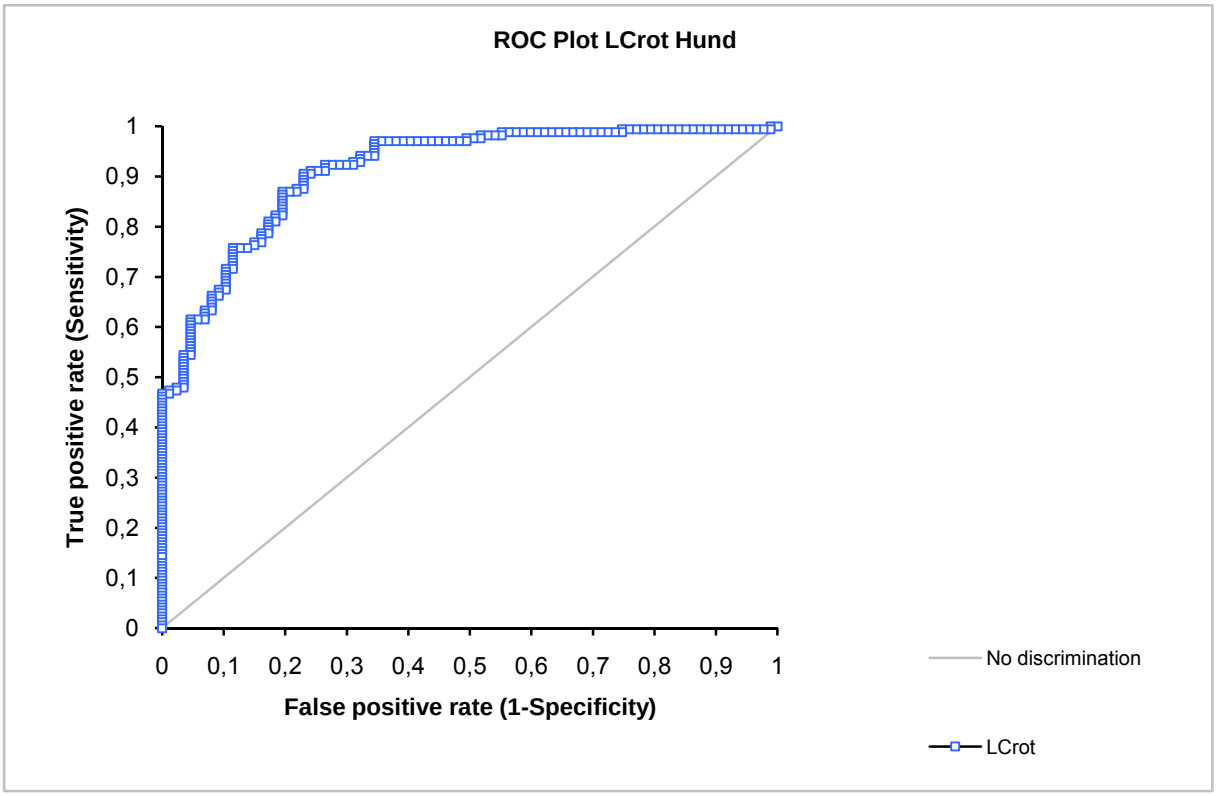


Abbildung 4.24: *ROC-Kurve LCrot Hund*

Möchte man gleichzeitig eine möglichst gute Sensitivität und Spezifität erreichen, ergibt sich eine Sensitivität und Spezifität für die Retikulozytenbestimmung beim ADVIA® 120 von je über 90% und von je über 80% beim Lasercyte® für die Tierart Hund, wenn man den Cut-off der Retikulozyten für die Regeneration beim ADVIA® auf 80 x 10^9/l erhöht und beim LaserCyte® auf 46 x 10^9/l herabsetzt (Abbildung 4.25 und 4.26).

Durch die Erstellung von ROC-Kurven für den RI und den RPI beim Hund kann gezeigt werden, dass die AUC für beide Parameter bei 100% liegt. Bei einem Cut-off von 1 für den RI und von 0,5 für den RPI können optimale Sensitivitäten und Spezifitäten mit Werten zwischen 94% und 98% erlangt werden.

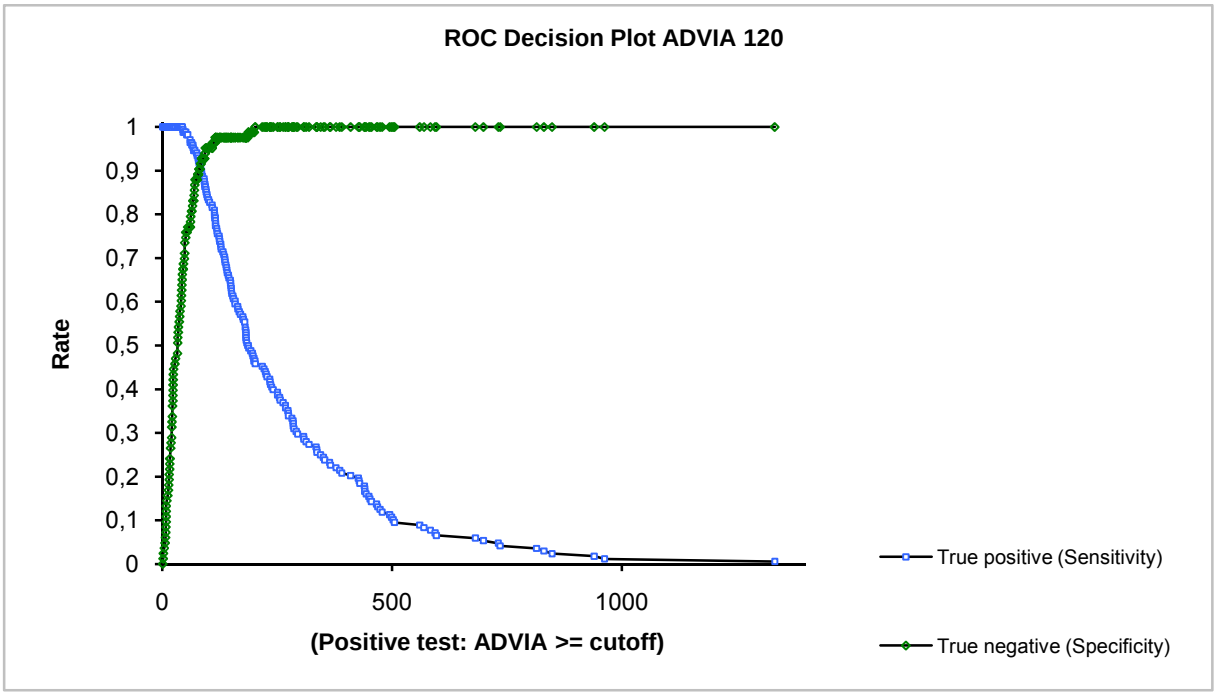


Abbildung 4.25: *ROC-Entscheidungs-Kurve ADVIA 120 Hund*

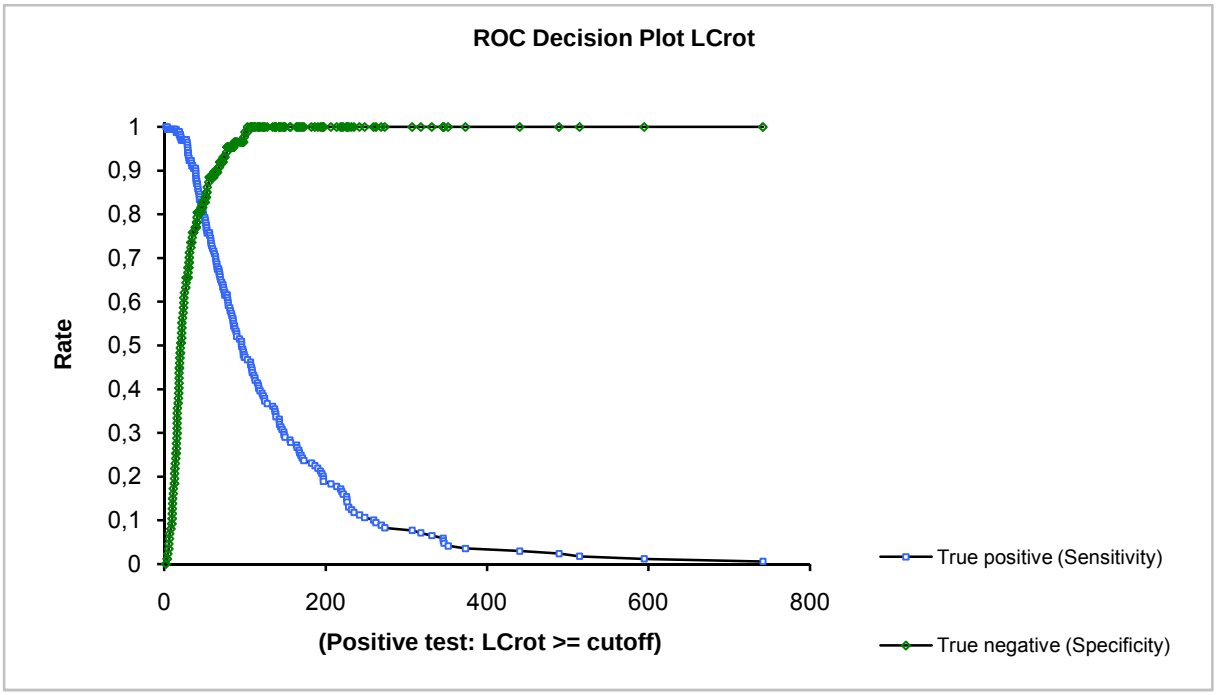


Abbildung 4.26: *ROC-Entscheidungs-Kurve LCrot Hund*

Bei der Katze sind die Ergebnisse für den ADVIA® 120 beim Cut-off von 40 x 10^9/l sehr zufrieden stellend, für den LaserCyte® sind auch nach Herabsetzen des Cut-off-Wertes auf 31 x 10^9/l nur Sensitivitäten und Spezifitäten von knapp über 70% zu erreichen.

Setzt man einen Graubereich für das jeweilige Gerät fest, in welchem keine Klassifikation der Anämie möglich ist, können Sensitivitäten und Spezifitäten von über 90% sowohl für den LaserCyte® als auch für den ADVIA® 120 erreicht werden. Der Graubereich für den ADVIA® 120 wird beim Hund zwischen 70 und 90 x 10^9/l, für den LaserCyte® beim Hund zwischen 35 und 70 x 10^9/l und bei der Katze zwischen 20 und 60 x 10^9/l gewählt. Damit liegt die Sensitivität bzw. Spezifität für den ADVIA® 120 beim Hund bei 95% bzw 93% und für den LaserCyte® beim Hund bei 91% bzw. 92% sowie für den LaserCyte® bei der Katze bei 91% bzw. 94%. Aufgrund der sehr guten Ergebnisse für den Cut-off-Wert von 40 x 10^9/l für den ADVIA® 120 bei der Tierart Katze ist es nicht notwendig, einen Graubereich zu wählen.

4.4.3 Grafische Darstellungen mit Fallbeispielen

In der im Anhang beigefügten Präsentation der Erythrozytenmorphologie ist beim Vergleich der grafischen Darstellungen von ADVIA® 120 und LaserCyte® festzustellen, dass der LaserCyte® morphologische Veränderungen in ähnlicher Weise darstellen kann wie der ADVIA® 120. Die Trennlinien im TIC TAC TOE des ADVIA® stellen eine Hilfe zur Erkennung der abweichenden Erythrozytenpopulation dar. In entsprechender Art kann es dem menschlichen Auge durch das zugefügte Kreuz in der Grafik des LaserCytes® erleichtert werden, auch die Morphologie der Erythrozyten auf dem Dotplot des LaserCytes® zu erkennen.

Im Folgenden werden einige repräsentative Fallbeispiele aus der Präsentation erläutert.

1. Fallbeispiel:

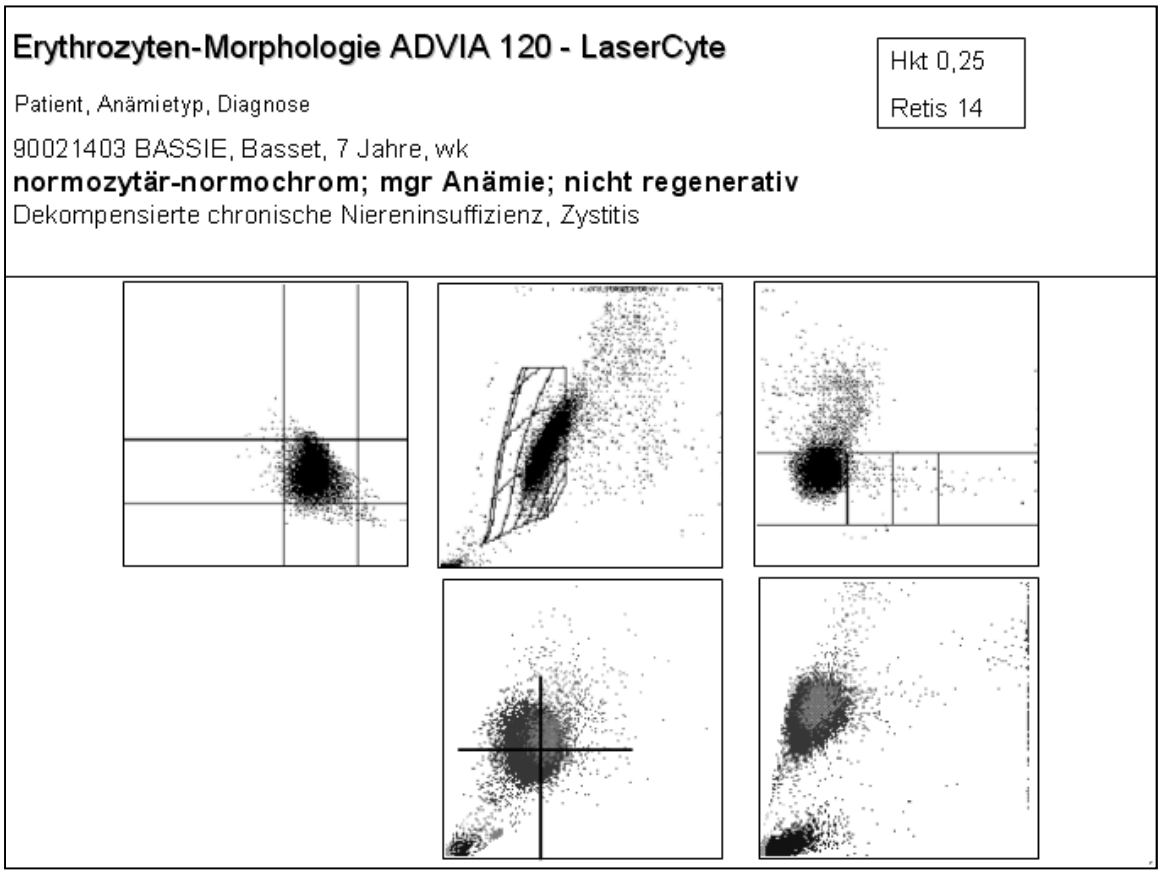


Abbildung 4.27: *1. Fallbeispiel*

In Abbildung 4.27 sind die Grafiken einer 7jährigen Basset-Hündin mit einer dekompensierten chronischen Niereninsuffizienz als Grunderkrankung dargestellt. Die mittelgradige Anämie ist nicht regenerativ und hat ausschließlich normozytär-normochromen Charakter, wie es bei einer sekundären Knochenmarkserkrankung zu erwarten ist. MCV, MCHC und RDW liegen im Referenzbereich.

2. Fallbeispiel:

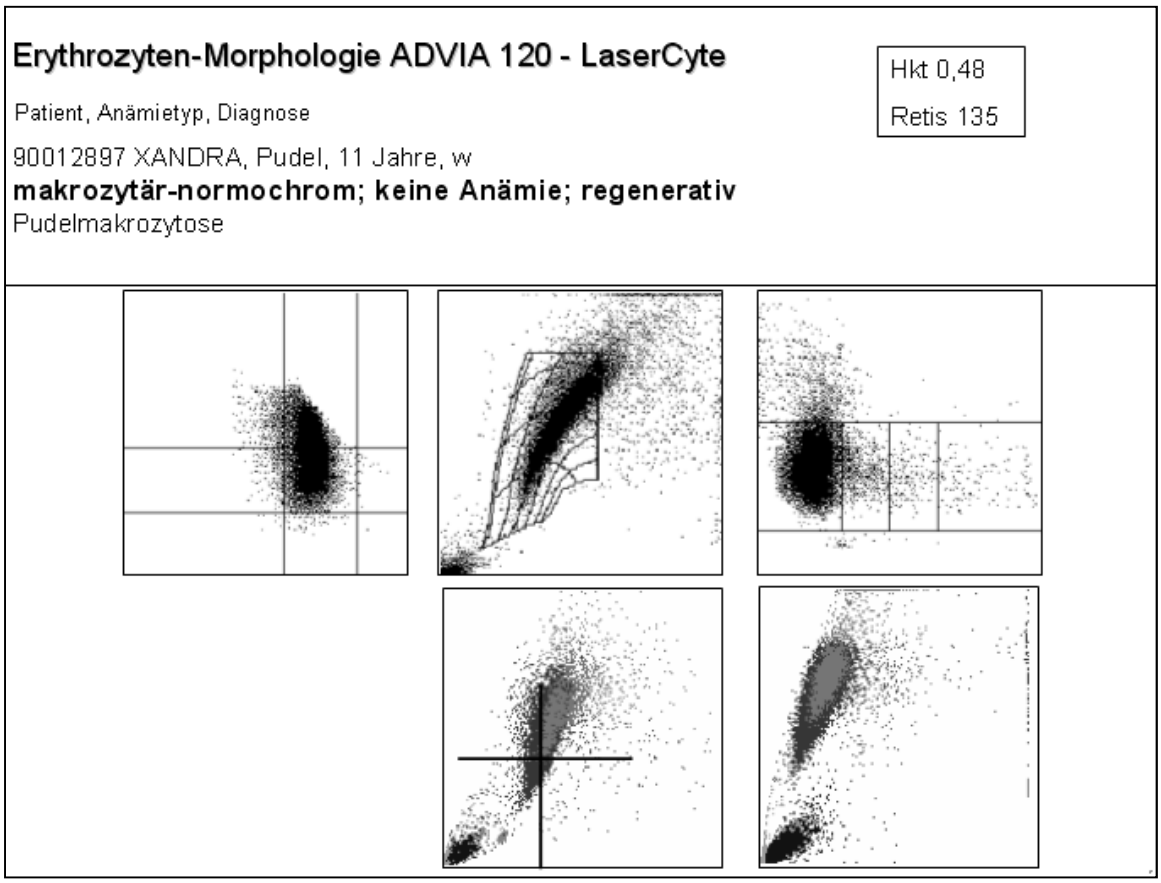


Abbildung 4.28: *2. Fallbeispiel*

Bei diesem Pudel in Abbildung 4.28 sind die Erythrozyten sehr deutlich makrozytär geprägt. Dies stellt bei Pudeln eine Rassebesonderheit dar, die bei den betroffenen Tieren keinerlei Krankheitssymptome auslösen muss (Canfield and Watson 1989). Der MCV-Wert liegt mit 87,4 fl deutlich über dem Referenzbereich von 63,0-72,6 fl. Der MCHC ist leicht erniedrigt und der RDW ist erhöht.

3. Fallbeispiel:

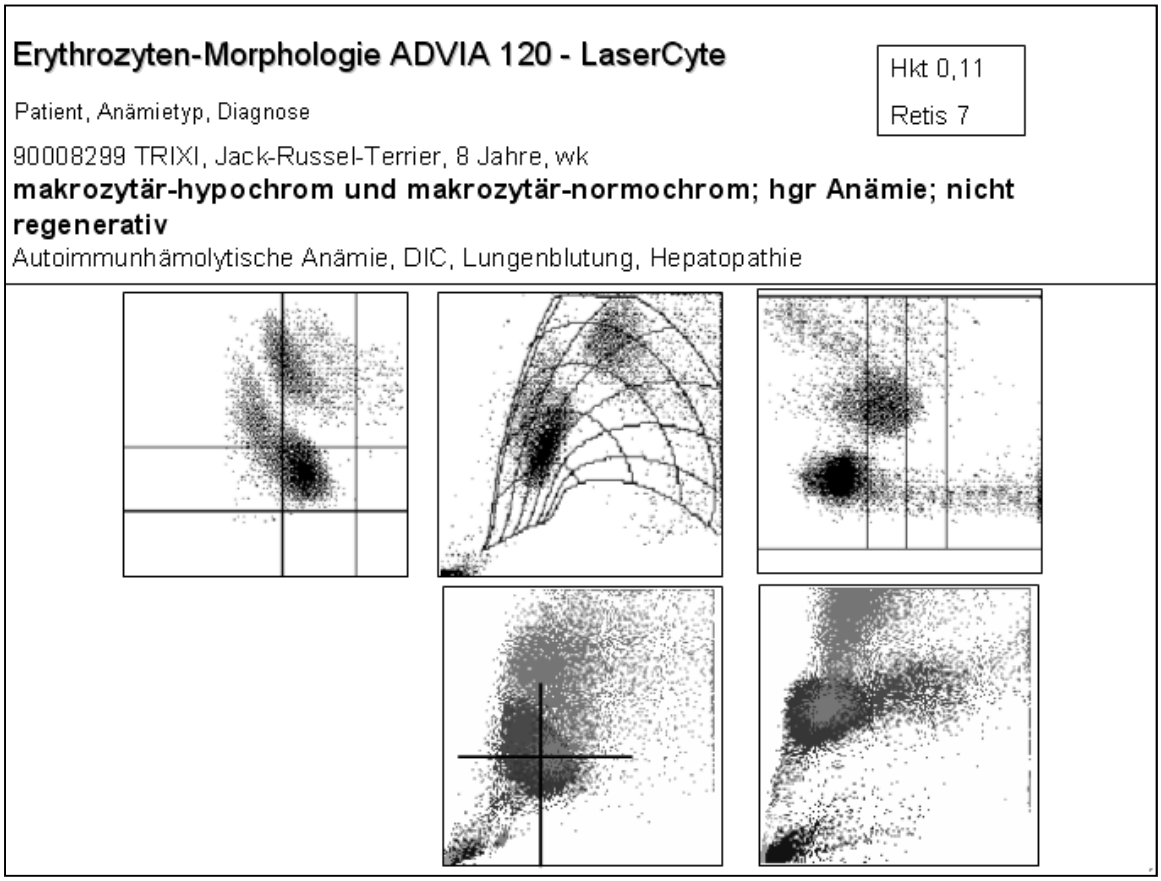


Abbildung 4.29: *3. Fallbeispiel*

In Abbildung 4.29 ist eine 8jährige Jack-Russel-Terrier-Hündin mit hochgradiger, nicht regenerativer Anämie sichtbar. Es befinden sich Zellen im makrozytär-hypochromen Bereich, die für eine beginnende Regeneration sprechen könnten. Die Erythrozyten im makrozytär-normochromen Ausschnitt stellen Agglutinate der Erythrozyten dar, die sich entweder als unregelmäßige Zellen oder als Cluster von scheinbar makrozytär-normochromen Zellen oberhalb der normalen RBCs darstellen können (Tvedten *et al* 2000). Eine RBC-Autoagglutination kann im Rahmen einer immunbedingten Anämie entstehen. Dieser Befund wird durch einen positiven Autoagglutination-Test auf dem Objektträger bei „Trixi“ bestätigt. MCV, MCHC und MCV sind deutlich erhöht.

4. Fallbeispiel:

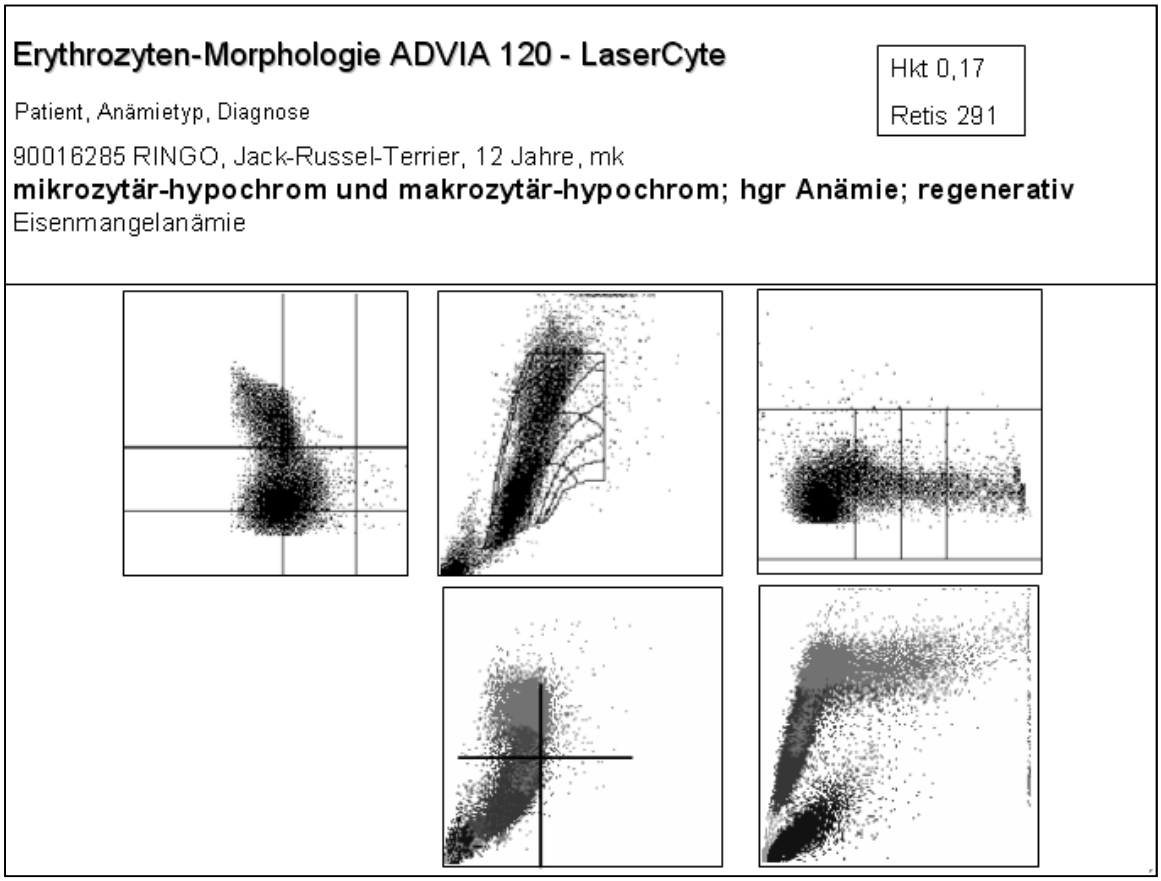


Abbildung 4.30: *4. Fallbeispiel*

„Ringo“ zeigt eine regenerative Anämie durch einen Eisenmangel mit mikrozytär-hypochromen Zellen als Hauptpopulation. Die gleichzeitig vorhandenen makrozytär-hypochromen Erythrozyten sind auf die mit 291 x 10^9/l Retikulozyten deutliche Regeneration zurückzuführen. Durch das Vorhandensein von Mikro- und Makrozytose ist der MCV normal, der MCHC ist erniedrigt und der RDW erhöht.

5. Fallbeispiel:

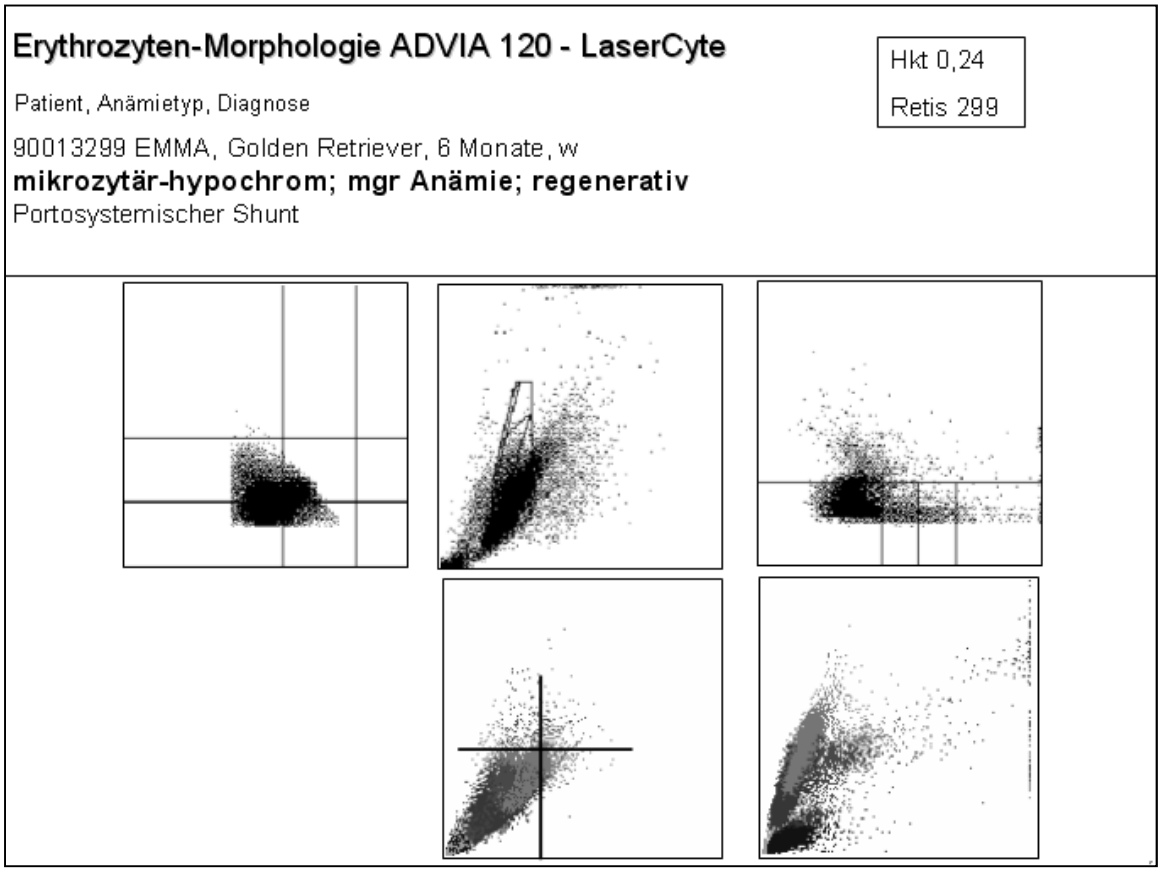


Abbildung 4.31: 5*. Fallbeispiel*

In den Abbildungen 4.31-4.33 ist der Verlauf des roten Blutbildes eines jungen Golden Retrievers mit angeborenem intraheptischem portosystemischem Shunt ersichtlich. In Abbildung 4.31 sind die durch die Leberfunktionsstörung entstandenen mikrozytär-hypochromen Erythrozyten deutlich zu erkennen. Der MCV ist mit 44,80 fl deutlich zu niedrig, der MCHC ist ebenfalls unter dem Referenzbereich und der RDW ist erhöht. Im folgenden Bild (Abbildung 4.32) ist zusätzlich eine Population mit normozytär-normochromen Zellen vorhanden, die die Zellen eines gesunden Spendertieres von einer Bluttransfusion darstellen. Dadurch ist der MCV in den unteren Referenzbereich gekommen, während MCHC nach wie vor erniedrigt und RDW erhöht sind. In der dritten Darstellung (Abbildung 4.33) ist die körpereigene Produktion von Retikulozyten anhand der makrozytär-hypochromen Erythrozyten zusätzlich erkennbar. Der MCV ist normal, der MCHC liegt im unteren Referenzbereich und der RDW ist erhöht.

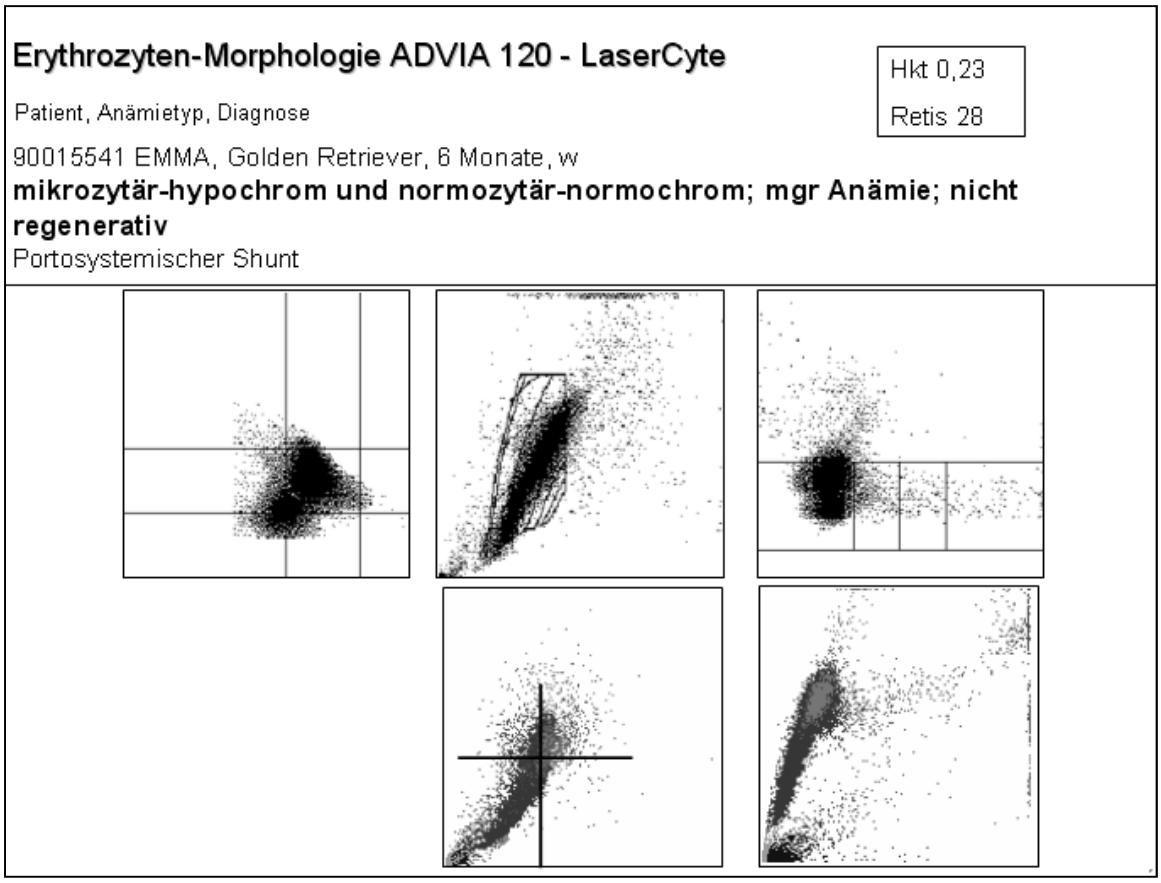


Abbildung 4.32: *5. Fallbeispiel*

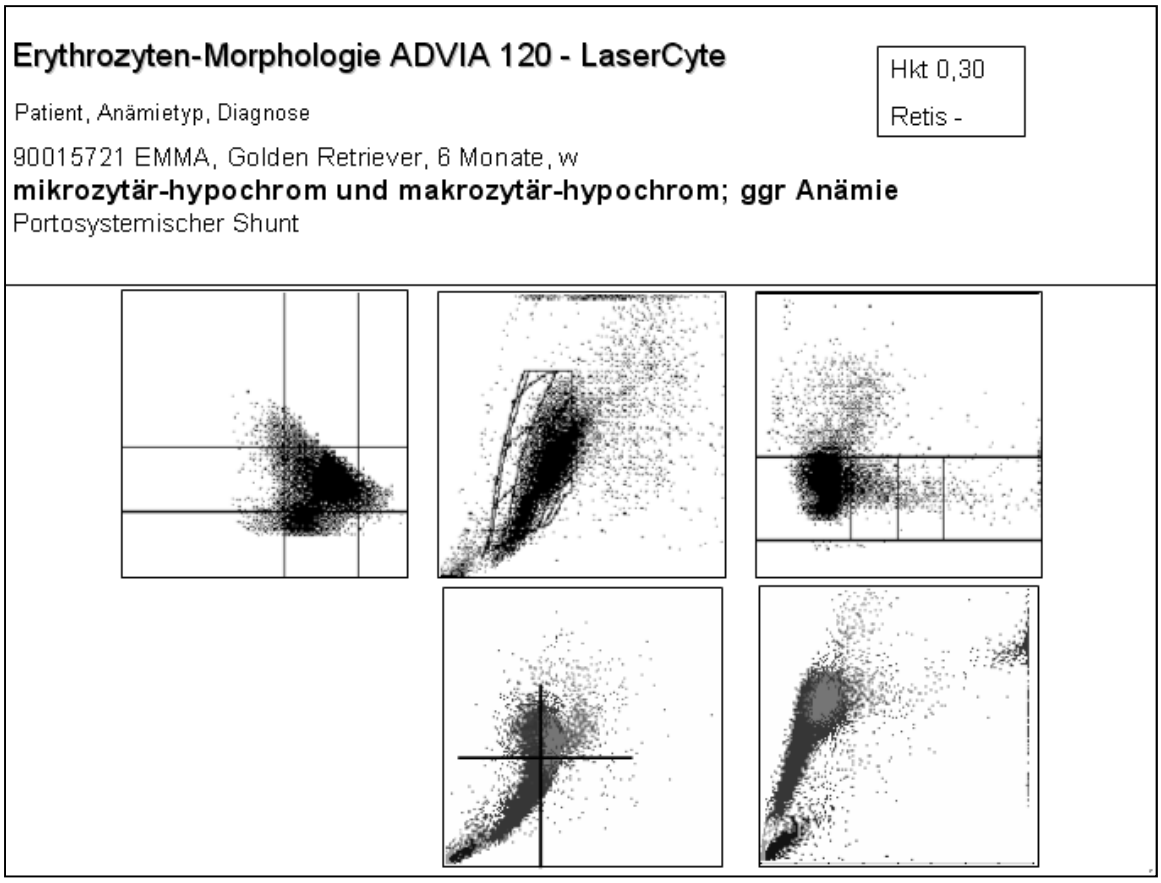


Abbildung 4.33: *5. Fallbeispiel*

6. Fallbeispiel:

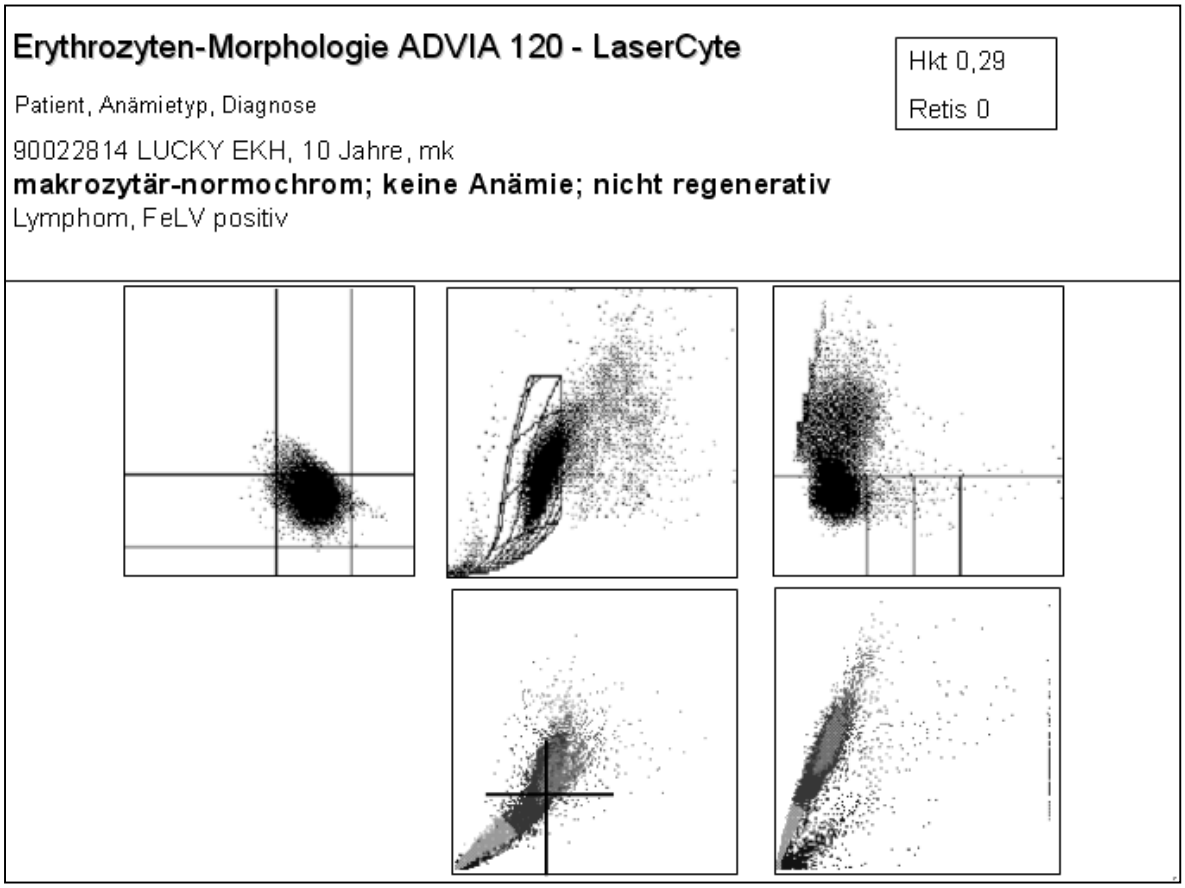


Abbildung 4.34: *6. Fallbeispiel*

Abbildung 4.34 präsentiert die DotPlots eines 10jährigen Europäisch-Kurzhaar-Katers ohne Anämie und ohne Retikulozytose. Die makrozytär-normochromen Erythrozyten sind sehr wahrscheinlich auf die FeLV-Infektion zurückzuführen, da es durch die Viren im Knochenmark zur Ausreifung von megaloblastischen Erythrozyten kommen kann (Christopher 2000, Grondin *et al* 2006, Linenberger and Abkowitz 1995). Während RDW und MCHC im Referenzbereich liegen, ist der MCV signifikant erhöht.

5. Diskussion

Die automatischen Hämatologiesysteme ADVIA® 120 und LaserCyte® wurden für die Kleintiermedizin bereits evaluiert (Becker 2007, Meyer 2005, Moritz *et al* 2004, Wenger-Riggenbach 2006). Die Evaluierungen der Geräte zeigen, dass diese gut für die routinemäßige Blutanalyse bei Hunden und Katzen geeignet sind (Becker 2007, Meyer 2005, Moritz *et al* 2004, Wenger-Riggenbach 2006).

In dieser Studie werden die Geräte hinsichtlich des Einsatzes bei anämischen Tieren und Tieren mit morphologischen Erythrozytenveränderungen überprüft. Die grafischen Darstellungen der Geräte werden in die Interpretation mit einbezogen.

5.1 Präzision innerhalb der Serie

Die Wiederholungsmessungen werden zur Beurteilung der Präzision von Messergebnissen und damit zur Abschätzung des Zufallsfehlers einer Methode herangezogen (Jensen and Kjelgaard-Hansen 2006, Westgard 2003).

Ein Variationskoeffizient von unter 3% wird als exzellent bezeichnet (Meyer 2005, Neuerer 2005).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung beim Hund sind vergleichbar mit anderen durchgeführten Präzisionsstudien (Becker 2007, Moritz 2000, Neuerer 2005, Wenger-Riggenbach 2006).

Wie aus Tabelle 5.1 ersichtlich ist, ergeben sich für die Parameter RBC, HGB, HKT, MCV, MCH, MCHC und RDW für die Großlaborgeräte ADVIA® 120 und CellDyn® 3500 exzellente Präzisionen mit Variationskoeffizienzen unter 3%. Die Retikulozyten erreichen in der eigenen Studie und in der Auswertung von Moritz übereinstimmend akzeptable Ergebnisse beim Hund (Moritz 2000).

Präzision Hund [CV (%)]							
	Eigene Studie	Eigene Studie	Becker 2007	Becker 2007	Wenger-Riggenbach 2006	Neuerer 2005	Moritz 2000
	LaserCyte	*ADVIA 120*	*LaserCyte*	*CellDyn 3500*	*LaserCyte*	*CellDyn 3500*	*ADVIA 120*
RBC	4,59-7,51	0,77-1,27	4,1	0,5	2,3-3,1	0,76	0,90
HGB	2,45-4,95	1,00-1,49	2,9	0,6	1,5-1,6	0,81	0,97
HKT	4,28-7,38	0,68-1,64	3,9	0,7	2,3-3,1	0,88	1,48
MCV	0,52-1,29	0,33-0,68	0,4	0,6	0,3-0,4	---	1,06
MCH	3,55-7,77	0,75-1,92	---	---	3,1-3,9	---	1,17
MCHC	3,53-7,78	0,45-1,87	---	---	3,2-3,9	---	1,73
RDW	0,44-1,23	0,42-0,77	---	---	0,4-0,5	---	0,64
RETIS	5,83-28,75	4,79-9,93	---	---	42,7-102	---	12,2

Tabelle 5.1: *Präzision Hund mit Literaturvergleich*

Die Präzision des LaserCyte® der eigenen Studie kann mit zwei Studien von Becker und Wenger-Riggenbach am selben Gerät verglichen werden (Becker 2007, Wenger-Riggenbach 2006). Dabei zeigen sich im Vergleich zum ADVIA® 120 und zum Cell-Dyn® 3500 deutlich schlechtere Variationskoeffizienten in allen drei Studien. Die Präzisionsergebnisse beim Patienten ohne Anämie stimmen mit den bisherigen Studien gut überein. Der LaserCyte® stellt das einzige In-House-Hämatologiegerät auf der Basis der Lasertechnologie dar. Fluktuationen durch Instabilitäten des Laserstrahls (sog. „Rauschen“ oder „noise“) könnten für das schlechtere Abschneiden hinsichtlich der Präzisionen des LaserCytes® verantwortlich sein (Becker 2007). Aufgrund der relativ langen Messdauer einer Einzelprobe von 13 Minuten könnten bei 10maliger Messung auch beginnende Effekte der Zellalterung zur schlechteren Präzision beitragen. Durch Lagerung bei Zimmertemperatur über 24 Stunden kann z.B. ein Anstieg des MCV um 2-5% (Furlanello *et al* 2006) oder um 3-4 fl (Medaille *et al* 2006) bei kaninen Erythrozyten festgestellt werden. Normozytäre kanine Erythrozyten scheinen um einen höheren Prozentsatz zu schwellen als veränderte mikrozytäre und makrozytäre Subpopulationen (Furlanello *et al* 2006, Goodfellow *et al* 2008). Des Weiteren steigen die Hämatokritwerte durch die Lagerung signifikant an, während der MCHC sinkt. Die artifiziellen Veränderungen von MCV, HKT und MCHC passen zu einem erhöhten intrazellulären Wassergehalt (Medaille *et al* 2006).

Zusätzlich zu einer möglichen beginnender Zellalterung ist beim LaserCyte® ein Überhitzungsproblem bei ununterbrochenen Analysen bekannt.
Auffallend sind die schlechteren Variationskoeffizienten des LaserCytes® bei den Hunden mit Anämie. Da in vorausgegangenen Arbeiten nicht explizit Tiere mit Blutarmut untersucht wurden, ist ein Vergleich schwierig.
Die manuelle Methode der Retikulozytenzählung ist relativ unpräzise, für Hundeblut sind Variationscoeffizienten zwischen 8 und 23% beschrieben (Abbott and McGrath 1991). Durch die durchflusszytometrische Messung kann die Präzision der Retikulozytenmessung eine deutliche Verbesserung erreichen (Buttarello *et al* 2001).
So konnten d'Onofrio und Mitarbeiter eine zehnmal höhere Präzision mit der automatischen Messung als mit der manuellen Methode nachweisen (d'Onofrio *et al* 1997). Perkins und Grindem stellten einen Variationskoeffizienten für die manuelle Auszählung bei Katzenretikulozyten von > 25% fest, während der CV durch das Hämatologiegerät bei 2,8% lag (Perkins and Grindem 1995).
Für Hunderetikulozyten konnten mittels Durchflusszytometrie gute Präzisonen mit CV-Werten zwischen 3 und 12% ermitteln werden (Abbott and McGrath 1991, Moritz 2000).
In den eigenen Untersuchungen lässt sich für den ADVIA® 120 ebenfalls eine gute Präzision nachweisen (CV 4,78-10,31%).
Die Retikulozyten am LaserCyte® mit Variationskoeffizienten von bis zu 28,75% weisen allerdings auf eine deutliche Impräzision dieser Messung hin. Mit Variationskoeffizienzen von 42,7-102% lag die Impräzision der Retikulozyten in der Studie von Wenger-Riggenbach am LaserCyte® noch deutlich höher, was die Beobachtung einer inakkuraten Retikulozytenmessung dieses Gerätes unterstützt (Wenger-Riggenbach 2006).

5.2 Methodenvergleich

Im Methodenvergleich werden die Richtigkeit und falls vorhanden die Fehler einer Methode beurteilt (Westgard 2003). In dieser Studie erfolgt der Methodenvergleich zwischen dem in der Veterinärmedizin akzeptierten Großlaborgerät ADVIA® 120 und dem LaserCyte®, dem ersten In-House-Gerät basierend auf der Laserdurchflusszytometrie.

Für die Beurteilung wurden die Korrelationskoeffizienten r (lineare Korrelation) bzw r_s, (Spearman Korrelation), der Achsenabschnitt = Intercept, die Steigung = Slope sowie der Mittelwertsunterschied = Bias herangezogen und mit bisherigen Studien verglichen (siehe Tabellen 5.2-5.9). In den Tabellen sind beispielhaft jeweils die Werte aus dem Vergleich ADVIA® 120-LCrot dargestellt. Beim HKT stammen die Werte aus dem Vergleich des jeweiligen Gerätes mit dem PCV und bei den Retikulozyten wird der Vergleich mit der manuellen Methode herangezogen. Die detaillierten Aufzeichnungen sind Kapitel 4.2 zu entnehmen.

In den Daten von Welles und Mitarbeitern wurden der LaserCyte® und drei weitere Blutanalysegeräte dem ADVIA® 120 gegenübergestellt (Welles *et al* 2009). Becker hat in ihrer Arbeit sieben verschiedene Hämatologiegeräte mit dem ADVIA® 120 bei Hund und Katze (Becker 2007) verglichen. Die Geräte LaserCyte® und Cell-Dyn® 3500 wurden aus dieser Arbeit zum Vergleich ausgewählt. In den Studien von Meyer und Moritz wurde der ADVIA® 120 mit seinem Vorgängermodel Technicon® H*1 verglichen (Meyer 2005, Moritz 2000), während Neuerer eine Evaluierung des Cell-Dyn® 3500 bei Hund und Katze durchführte (Neuerer 2005). In der Arbeit von Wenger-Riggenbach erfolgte die Gegenüberstellung des LaserCyte® und des Cell-Dyn® 3500 (Wenger-Riggenbach 2006).

Die Erythrozytenzahl wird bei allen Geräten für Hund und Katze mit einem sehr guten Ergebnis gemessen. Eine Ausnahme stellt der Vergleich des Cell-Dyn® 3500 mit manuellen Methoden dar, wo die Steigung der Komponentengleichung mit 0,897 unterhalb des idealen Wertes 1 liegt.

In der eigenen Studie wird klar, dass die Unterschiede zwischen den beiden LaserCyte®-Geräten z.T. deutlicher sind als der Unterschied zwischen einem LaserCyte® und dem ADVIA® 120. Bei den Erythrozytenzahlen misst der LCblau beim Hund höhere und bei der Katze jeweils niedrigere Werte als der ADVIA® und der LCrot.

RBC (10^{12}/l) Hund						
Studie	**Gerät**	**r**	**r_s**	**Steigung**	**y-Achsen-abschnitt**	**Mittelwerts-unterschied**
Eigene Studie	LaserCyte	0,98	0,98	1,01	-0,11	-0,1
Welles et al, 2009	LaserCyte	0,978	---	---	---	---
Becker 2007	LaserCyte	0,983	---	1,02	-0,05	0,04
Becker 2007	Cell-Dyn 3500	0,985	---	1,00	0,01	0,00
Wenger-Riggenbach 2006	LaserCyte	0,961	---	0,978	0,032	---
Neuerer 2005	Cell-Dyn 3500	0,927	---	0,897	0,88	---
Moritz 2000	Advia 120	0,995	---	0,98	0,02	---
RBC (10^{12}/l) Katze						
Studie	**Gerät**	**r**	**r_s**	**Steigung**	**y-Achsen-abschnitt**	**Mittelwerts-unterschied**
Eigene Studie	LaserCyte	0,98	0,96	1,02	-0,34	-0,3
Becker 2007	LaserCyte	0,981	---	1,00	0,03	0,01
Becker 2007	CellDyn 3500	0,979	---	1,06	0,13	0,52
Wenger-Riggenbach 2006	LaserCyte	0,968	---	0,986	0,053	---
Neuerer 2005	CellDyn 3500	0,960	---	0,886	1,007	---
Meyer 2005	Advia 120	0,997	---	---	---	---

Tabelle 5.2: *Methodenvergleich RBC mit Literaturvergleich*

Beim Hämoglobin ergeben sich für Hund und Katze sehr gute Übereinstimmungen der Geräte, die im Einklang mit den bisherigen Studien stehen. Beim Vergleich des LaserCyte® mit dem ADVIA® 120 ist sowohl in den eigenen Untersuchungen als auch in der Studie von Becker ein positiver proportionaler Fehler mit einer Steigung von 1,05 festzustellen.
Außerdem sind wie beim RBC Differenzen innerhalb der LaserCyte®-Geräte vorhanden (Abbildung 4.3).

HGB (mmol/l) Hund						
Studie	**Gerät**	**r**	**r_s**	**Steigung**	**y-Achsen-abschnitt**	**Mittelwerts-unterschied**
Eigene Studie	LaserCyte	0,98	0,99	1,05	0,36	0,7
Welles et al, 2009	LaserCyte	0,873	---	---	---	---
Becker 2007	LaserCyte	0,988	---	1,05	-0,68	0,13
Becker 2007	Cell-Dyn 3500	0,995	---	0,97	0,17	-0,30
Wenger-Riggenbach 2006	LaserCyte	0,962	---	0,960	0,443	---
Neuerer 2005	Cell-Dyn 3500	0,971	---	1,081	0,483	---
Moritz 2000	Advia 120	0,999	---	0,95	0,15	---
HGB (mmol/l) Katze						
Studie	**Gerät**	**r**	**r_s**	**Steigung**	**y-Achsen-abschnitt**	**Mittelwerts-unterschied**
Eigene Studie	LaserCyte	0,99	0,99	1,03	0,57	0,7
Becker 2007	LaserCyte	0,983	---	0,99	0,16	0,10
Becker 2007	CellDyn 3500	0,987	---	0,99	0,16	0,08
Wenger-Riggenbach 2006	LaserCyte	0,985	---	1,023	-0,039	---
Neuerer 2005	CellDyn 3500	0,957	---	1,062	0,042	---
Meyer 2005	Advia 120	0,994	---	---	---	---

Tabelle 5.3: *Methodenvergleich HGB mit Literaturvergleich*

Für Hund und Katze zeigen sich gute Korrelationen für den Hämatokrit. Bei beiden Tierarten fällt ein systematischer proportionaler Fehler in positiver Richtung bei der Gegenüberstellung von PCV und LaserCyte® auf (Hund: Vergleich PCV-LCblau; Katze: Vergleich PCV-LCrot). Dieser positive proportionale Fehler ist auch in den Studien von Becker (Steigung 1,06) und Wenger-Riggenbach (Steigung 1,12)

nachzuweisen (Becker 2007, Wenger-Riggenbach 2006). In der Arbeit von Welles und Mitarbeitern ergibt sich hingegen ein negativer proportionaler Fehler (Welles *et al* 2009). Da der Parameter HKT von den Geräten aus RBC und MCV errechnet wird, können sich Einzelfehler von RBC und MCV beim HKT summieren. Hinzu kommt die Divergenz zwischen den beiden LaserCyte®-Geräten: Beim Hund misst der LCblau und bei der Katze liefert der LCrot höhere Werte als alle drei anderen Messmethoden.

HKT (l/l) Hund						
Studie	**Gerät**	**r**	**r_s**	**Steigung**	**y-Achsen-abschnitt**	**Mittelwerts-unterschied**
Eigene Studie	LaserCyte	0,98	0,98	1,01	-0,02	-0,0
Eigene Studie	Advia 120	0,99	0,99	0,99	0,00	-0,0
Welles et al, 2009	LaserCyte	0,973	---	0,914	---	---
Becker 2007	LaserCyte	0,982	---	1,04	-0,38	1,09
Becker 2007	Cell-Dyn 3500	0,971	---	1,03	0,80	2,29
Wenger-Riggenbach 2006	LaserCyte	0,960	---	1,036	-1,756	---
Neuerer 2005	Cell-Dyn 3500	0,979	---	1,021	.0,964	---
Moritz 2000	Advia 120	0,997	---	1,01	0,01	---

HKT (l/l) Katze						
Studie	**Gerät**	**r**	**r_s**	**Steigung**	**y-Achsen-abschnitt**	**Mittelwerts-unterschied**
Eigene Studie	LaserCyte	0,97	0,95	1,09	-0,02	-0,0
Eigene Studie	Advia 120	0,99	0,99	0,97	0,00	-0,0
Becker 2007	LaserCyte	0,981	---	1,06	-0,39	1,37
Becker 2007	CellDyn 3500	0,950	---	1,14	1,98	6,61
Wenger-Riggenbach 2006	LaserCyte	0,944	---	1,120	-1,437	---
Neuerer 2005	CellDyn 3500	0,969	---	0,956	1,160	---
Meyer 2005	Advia 120	0,992	---	---	---	---

Tabelle 5.4: *Methodenvergleich HKT mit Literaturvergleich*

Beim MCV (Tabelle 5.5) können in der Arbeit von Wenger-Riggenbach und Welles und Mitarbeitern bessere Korrelationen gefunden werden (Welles *et al* 2009, Wenger-Riggenbach 2006). Die eigenen Ergebnisse stimmen für die Katze mit den Befunden von Becker überein, während beim Hund beim Vergleich LaserCyte®-ADVIA® 120 der LaserCyte® deutlich niedrigere Werte bestimmt und in der Studie von Becker die Werte des LaserCytes® höher sind als die des ADVIA® 120 (Becker 2007). Dies deutet auf deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Geräten des LaserCytes® hin, was in den eigenen Daten anhand von Steigungswerten von 1,10 beim Hund und 1,07 bei der Katze beim Vergleich LCrot-LCblau bestätigt werden kann.

MCV (fl) Hund						
Studie	**Gerät**	**r**	**r_s**	**Steigung**	**y-Achsen-abschnitt**	**Mittelwerts-unterschied**
Eigene Studie	LaserCyte	0,87	0,83	0,71	18,58	-2,5
Welles et al, 2009	LaserCyte	0,916	---	---	---	---
Becker 2007	LaserCyte	0,813	---	1,15	-10,15	0,65
Becker 2007	Cell-Dyn 3500	0,938	---	1,03	-0,37	1,87
Wenger-Riggenbach 2006	LaserCyte	0,951	---	0,941	4,960	---
Neuerer 2005	Cell-Dyn 3500	---	---	---	---	---
Moritz 2000	Advia 120	0,892	---	0,99	2,04	---
MCV (fl) Katze						
Studie	**Gerät**	**r**	**r_s**	**Steigung**	**y-Achsen-abschnitt**	**Mittelwerts-unterschied**
Eigene Studie	LaserCyte	0,80	0,77	0,93	7,30	3,1
Becker 2007	LaserCyte	0,759	---	0,93	2,46	-1,15
Becker 2007	CellDyn 3500	0,953	---	1,25	-8,41	3,69
Wenger-Riggenbach 2006	LaserCyte	0,953	---	1,041	1,799	---
Neuerer 2005	CellDyn 3500	---	---	---	---	---
Meyer 2005	Advia 120	0,975	---	---	---	---

Tabelle 5.5: *Methodenvergleich MCV mit Literaturvergleich*

MCH (fl) Hund						
Studie	**Gerät**	**r**	**r_s**	**Steigung**	**y-Achsen-abschnitt**	**Mittelwerts-unterschied**
Eigene Studie	LaserCyte	0,51	0,63	2,28	-1,66	0,3
Welles et al, 2009	LaserCyte	0,386	---	---	---	---
Becker 2007	LaserCyte	---	---	---	---	---
Becker 2007	Cell-Dyn 3500	---	---	---	---	---
Wenger-Riggenbach 2006	LaserCyte	0,712	---	1,181	-4,009	---
Neuerer 2005	Cell-Dyn 3500	---	---	---	---	---
Moritz 2000	Advia 120	0,868		0,89	0,13	---
MCH (fl) Katze						
Studie	**Gerät**	**r**	**r_s**	**Steigung**	**y-Achsen-abschnitt**	**Mittelwerts-unterschied**
Eigene Studie	LaserCyte	0,59	0,54	2,19	-0,91	0,2
Becker 2007	LaserCyte	---	---	---	---	---
Becker 2007	CellDyn 3500	---	---	---	---	---
Wenger-Riggenbach 2006	LaserCyte	0,845	---	1,309	-4,050	---
Neuerer 2005	CellDyn 3500	---	---	---	---	---
Meyer 2005	Advia 120	0,978	---	---	---	---

Tabelle 5.6: *Methodenvergleich MCH mit Literaturvergleich*

Für MCH und MCHC zeigen sich bei Moritz und Meyer gravierend bessere Übereinstimmungen der Geräte als bei den eigenen Ergebnissen (Meyer 2005, Moritz 2000). Eine Erklärung könnte der Vergleich sehr ähnlicher Methoden sein, da in diesen beiden Studien der ADVIA® 120 mit seinem direkten Vorläufermodell verglichen wird.

Die Korrelation von LaserCyte® und ADVIA® 120 beim MCHC und MCH ist ebenso wie in den Daten von Welles und Mitarbeitern (Welles *et al* 2009) und ähnlich wie die Übereinstimmung von LaserCyte® und Cell-Dyn® 3500 (Wenger-Riggenbach 2006) als inakzeptabel anzusehen. Durch deutlich höhere MCHC- und MCH-Werte des LaserCytes® ergibt sich ein extremer systematischer Fehler.

Da es sich bei diesen Parametern um errechnete Werte handelt, verwundert die fehlende Übereinstimmung nicht. Der MCHC wird beispielsweise aus der HGB-Konzentration und dem HKT errechnet, wobei auch der HKT des

Hämatologiesystems aus MCV und der RBC-Konzentration bestimmt wird. Somit summieren sich beim MCHC die Unterschiede der einzelnen Parameter. Das bedeutet, dass für die einzelnen Geräte eigene Referenzwerte erstellt werden müssen.

MCHC (mmol/l) Hund						
Studie	**Gerät**	**r**	**r_s**	**Steigung**	**y-Achsen-abschnitt**	**Mittelwerts-unterschied**
Eigene Studie	LaserCyte	0,22	0,29	3,3	-38,54	4,4
Welles et al, 2009	LaserCyte	-0,031	---	---	---	---
Becker 2007	LaserCyte	---	---	---	---	---
Becker 2007	Cell-Dyn 3500	---	---	---	---	---
Wenger-Riggenbach 2006	LaserCyte	0,094	---	19,605	-638,49	---
Neuerer 2005	Cell-Dyn 3500	---	---	---	---	---
Moritz 2000	Advia 120	0,768	---	0,74	4,59	---
MCHC (mmol/l) Katze						
Studie	**Gerät**	**r**	**r_s**	**Steigung**	**y-Achsen-abschnitt**	**Mittelwerts-unterschied**
Eigene Studie	LaserCyte	0	0,10	7,60	-140	2,8
Becker 2007	LaserCyte	---	---	---	---	---
Becker 2007	CellDyn 3500	---	---	---	---	---
Wenger-Riggenbach 2006	LaserCyte	0,276	---	5,638	-158,9	---
Neuerer 2005	CellDyn 3500	---	---	---	---	---
Meyer 2005	Advia 120	0,758	---	---	---	---

Tabelle 5.7: *Methodenvergleich MCHC mit Literaturvergleich*

Für den RDW ist eine mäßige Korrelation mit einem negativen proportionalen Fehler zu erkennen. Dies bedeutet, dass die Werte des LaserCytes® deutlich unter den Ergebnissen des ADVIA® 120 liegen. Die Befunde sind in gleicher Art bei Wenger-Riggenbach nachzuweisen, bei Welles sind die Übereinstimmungen geringgradig besser (Welles *et al* 2009, Wenger-Riggenbach 2006). Da die Referenzwerte für den RDW aufgrund unterschiedlicher Messmethoden gerätespezifisch sein sollten (Neiger *et al* 2002), kann eine mäßige Übereinstimmung beim Gerätevergleich toleriert werden.

RDW (%) Hund						
Studie	**Gerät**	**r**	**r_s**	**Steigung**	**y-Achsen-abschnitt**	**Mittelwerts-unterschied**
Eigene Studie	LaserCyte	0,77	0,89	0,43	9,49	0,1
Welles et al, 2009	LaserCyte	0,864	---	---	---	---
Becker 2007	LaserCyte	---	---	---	---	---
Becker 2007	Cell-Dyn 3500	---	---	---	---	---
Wenger-Riggenbach 2006	LaserCyte	0,777	---	0,503	8,077	---
Neuerer 2005	Cell-Dyn 3500	---	---	---	---	---
Moritz 2000	Advia 120	---	---	---	---	---
RDW (%) Katze						
Studie	**Gerät**	**r**	**r_s**	**Steigung**	**y-Achsen-abschnitt**	**Mittelwerts-unterschied**
Eigene Studie	LaserCyte	0,73	0,74	0,42	12,01	1,6
Becker 2007	LaserCyte	---	---	---	---	---
Becker 2007	CellDyn 3500	---	---	---	---	---
Wenger-Riggenbach 2006	LaserCyte	0,754	---	0,517	9,525	---
Neuerer 2005	CellDyn 3500	---	---	---	---	---
Meyer 2005	Advia 120	0,995	---	---	---	---

Tabelle 5.8: *Methodenvergleich RDW mit Literaturvergleich*

#RETIS (10^9/l) Hund						
Studie	**Gerät**	**r**	**r_s**	**Steigung**	**y-Achsen-abschnitt**	**Mittelwerts-unterschied**
Eigene Studie	LaserCyte	0,79	0,78	0,41	16,27	-64,5
Eigene Studie	Advia 120	0,89	0,89	0,91	10,56	2,6
Welles et al, 2009	LaserCyte	0,568	---	---	---	---
Becker 2007	LaserCyte	0,789	---	---	---	-36,20
Becker 2007	Cell-Dyn 3500	---	---	---	---	---
Wenger-Riggenbach 2006	LaserCyte	0,360	---	-0,240	21,982	---
Neuerer 2005	Cell-Dyn 3500	---	---	---	---	---
Moritz 2000	Advia 120	0,920	---	1,11	0,22	---

#RETIS (10^9/l) Katze						
Studie	**Gerät**	**r**	**r_s**	**Steigung**	**y-Achsen-abschnitt**	**Mittelwerts-unterschied**
Eigene Studie	LaserCyte	0,55	0,44	0,49	22,81	2,6
Eigene Studie	Advia 120	0,94	0,75	0,98	13,77	9,7
Becker 2007	LaserCyte	0,862	---	---	---	-0,75
Becker 2007	CellDyn 3500	---	---	---	---	---
Wenger-Riggenbach 2006	LaserCyte	0,128	---	15,612	-179,54	---
Neuerer 2005	CellDyn 3500	---	---	---	---	---
Meyer 2005	Advia 120	0,697	---	---	---	---

Tabelle 5.9: *Methodenvergleich #RETIS mit Literaturvergleich*

In den eigenen Untersuchungen können gute Korrelationen beim Vergleich der manuellen Auszählung und den Retikulozytenzahlen am ADVIA® 120 für Hund und Katze nachgewiesen werden.

Der Vergleich des ADVIA® 120 und des LaserCytes® hinsichtlich der Retikulozytenzahlen ergibt einen deutlichen negativen systematischen proportionalen Fehler, der bei hohen Retikulozytenzahlen stärker wird.

In der Studie von Becker wurde beim Vergleich der Retikulozyten am ADVIA® 120 und am LaserCyte® ein vergleichbarer systematischer Fehler festgestellt (Becker 2007). Da in dieser Studie kein Vergleich zu einer manuellen Methode durchgeführt wurde, konnte zu diesem Zeitpunkt nicht beantwortet werden, ob die Zahl der Retikulozyten am ADVIA® 120 überschätzt oder durch den LaserCyte® unterschätzt wird.

In der eigenen Arbeit kann durch den Vergleich mit den Retikulozyten auf dem Blutausstrich eine deutliche Unterschätzung der Retikulozyten am LaserCyte® im Vergleich zur manuellen Methode und zum ADVIA 120 bewiesen werden. Entsprechend dieser Unterschätzung beim LaserCyte® können auch die schlechten Korrelationen in weiteren Studien erklärt werden (Welles *et al* 2009, Wenger-Riggenbach 2006).

Bei der Auswertung der Ergebnisse muss beachtet werden, dass es sich bei der manuellen Auszählung und der Durchflusszytometrie um zwei sehr unterschiedliche Methoden handelt. So werden bei der automatischen Retikulozytenzählung über 50.000 Zählen untersucht, während auf dem Blutausstrich nur 1.000 Erythrozyten

ausdifferenziert werden. Die Retikulozytenzählung mittels Durchflusszytometrie stellt durch bessere Präzisionen, Unabhängigkeit vom Untersucher und niedrige Variabiliät der Ergebnisse die bessere und überlegene Methode im Vergleich zur manuellen Auszählung dar (Abbott and McGrath 1991, Buttarello *et al* 2001, Perkins *et al* 1995, Perkins and Grindem 1995, Siekmeier *et al* 2000). Trotzdem ist die Auswertung manueller Methoden im Hinblick auf den Nachweis einer Unter- oder Überschätzung eines Gerätes nicht zu ersetzen. Cowgill und Mitarbeiter sehen die manuelle Auszählung zur Retikulozytenevaluierung trotz der automatisierten Messmöglichkeiten nach wie vor als Golden Standard an (Cowgill *et al* 2003).

Katzenretikulozyten sind durch das Vorkommen von aggregierten und punktierten Formen schwieriger auszudifferenzieren als kanine oder humane Erythrozyten (Bienzle *et al* 2000). Durch verschiedene Studien ist belegt, dass die durchflusszytometrischen Verfahren nur mit der Anzahl aggregierter feliner Retikulozyten und nicht mit der Gesamtzahl (aggregierte und punktierte) Retikulozyten korrelieren (Perkins and Grindem 1995, Reagan *et al* 1992). Punktierte Retikulozyten enthalten nur noch Rest-Organellen wie Mitochondrien oder die Mengen an Rest-RNA sind gering, sodass in diesen Studien postuliert wurde, sie könnten mittels Durchflusszytometrie nicht erkannt werden (Perkins and Grindem 1995). Durch die getrennte Untersuchung von punktierten und aggregierten Retikulozyten konnten Korrelationen für aggregierte feline Retikulozyten von r=0,697 (Meyer 2005), r=0,72 (Perkins and Grindem 1995) bzw. r=0,88 (Reagan *et al* 1992) erreicht werden. Die eigenen Untersuchungen der Katzenretikulozyten bestätigen die in der Literatur nachgewiesenen guten bis mäßigen Korrelationen mit aggregierten Retikulozyten. Technisch betrachtet können feline punktierte Retikulozyten sehr wohl durch Schwellenwertverschiebung detektiert werden. Da allerdings die aggregierten Retikulozyten repräsentativer für die aktuelle Regeneration sind, werden die Analysegeräte speziell auf die Erkennung dieser Population eingestellt.

Am Beispiel des MCV bei der Katze, des HGB, des RBC und des HKT können in dieser Arbeit Messunterschiede zwischen den zwei LaserCyte®-Geräten nachgewiesen werden, die z.T. größer sind als der Unterschied eines LaserCytes® zum ADVIA® 120. Die Qualibeads bieten zwar die Möglichkeit einer internen Qualitätskontrolle jeder einzelnen Messung (Idexx Laboratories 2008), aber eine zufriedenstellende Übereinstimmung der Ergebnisse einer Probe, die an zwei verschiedenen Geräten analysiert wurde, ist nicht immer gegeben.

Im Rahmen von Geräteevaluierungen ist die Beurteilung des Korrelationskoeffizienten r weit verbreitet. Ein hoher Korrelationskoeffizient bedeutet einen positiven linearen Zusammenhang zwischen zwei Methoden, widerspiegelt aber nicht eine gute Übereinstimmung zweier Werte. Systematische Fehler werden durch den Korrelationskoeffizienzen nicht dargestellt. Aus diesem Grund sollten für die Beurteilung der Akzeptanz einer Messmethode die Werte Steigung, y-Achsenabschnitt (aus linearer, Deming oder Passing&Bablok-Regression) und Mittelwertsunterschied (aus Bland-Altman-Analyse) mit herangezogen werden (Jensen and Kjelgaard-Hansen 2006, Petrie and Watson 2006, Westgard 2003). In den eigenen Daten wird dies am Beispiel des HKT deutlich, wo sich beim Vergleich aller Methoden exzellente Korrelationskoeffizienten ergeben (Tabelle 4.6). Erst durch die Einbeziehung der Komponentengleichung und der grafischen Darstellung wird der systematische Fehler zwischen dem LCblau und den anderen Methoden beim Hund bzw. zwischen dem LCrot und den anderen Methoden bei der Katze offensichtlich.

5.3 Gesunde Tiere

5.3.1 Referenzbereiche

In den folgenden Tabellen werden die erstellten Referenzwerte den Daten aus der Literatur gegenübergestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit werden aus der eigenen Studie nur die Werte des ADVIA® 120 sowie der PCV und die manuell ausgezählte Retikulozytenzahl als nicht-parametrische Verteilung und aus der Robust-Methode untransformierter Daten ausgewählt. Die Referenzbereiche der LaserCyte®-Geräte und die detaillierten Ergebnisse der verschiedenen Methoden können in den Tabellen 4.13 und 4.14 eingesehen werden.

Referenzwerte Hund						
	Moritz, 2000	**Jain, 1993**	**Tvedten, 1999**	**Kraft, 1999**	**Eigene Studie**	**Eigene Studie**
	ADVIA 120	*Manuell*	*Technicon H*1*	*Cell-Dyn 3500*	*ADVIA 120*	*Manuell*
RBC 10^{12}/l	5,68-9,08	5,5-8,5	6,15-8,7	5,5-8,5	5,89-8,25	
HGB mmol/l	8,55-12,65	7,45-11,17	8,75-12,41	9,3-11,8	8,80-12,95	
HKT l/l	0,42-0,62	0,37-0,55	0,43-0,59	0,44-0,52	0,40-0,56	0,41-0,59
MCV fl	62,7-74,6	60-77	63-77,1	60-77	62,2-71,4	
MCH fmol	1,27-1,54	1,21-1,52	1,31-1,54	1-1,4	1,36-1,62	
MCHC mmol/l	19,6-21,3	19,9-22,4	18,56-22,1	19-21	20,6-23,5	
RDW %	12,0-13,15		11,9-14,9		11,5-14,5	
#Retis 10^9/l	10,9-111,0			0-60	0-103,8 12,2-124,3	0-85,2 0-104,8
%Retis %	0,14-1,48	0-1,5	bis 1,0	0,5-1,0	0-1,38 0,19-1,57	0-1,15 0-1,30

Tabelle 5.10: *Referenzwerte Hund mit Literaturvergleich*

Referenzwerte Katze						
	Moritz, 2000	**Jain, 1993**	**Tvedten, 1999**	**Kraft, 1999**	**Eigene Studie**	**Eigene Studie**
	ADVIA 120	*Manuell*	*Technicon H*1*	*Cell-Dyn 3500*	*ADVIA 120*	*Manuell*
RBC 10^{12}/l	5,92-11,16	5,00-10,00	6,12-11,86	5,00-10,00	6,94-10,37	
HGB mmol/l	5,07-9,47	4,97-9,31	5,59-9,68	5,60-9,30	5,82-9,39	
HKT l/l	0,24-0,46	0,24-0,45	0,29-0,50	0,30-0,44	0,27-0,42	0,28-0,44
MCV fl	37,0-55,0	39,0-55,0	41,9-54,8	40,0-55,0	31,5-48,3	
MCH fmol	0,70-1,07	0,78-1,09	0,78-1,09	0,80-1,0	0,67-1,06	
MCHC mmol/l	16,3-22,3	18,6-22,4	17,4-19,9	19,0-22,0	20,8-22,8	
RDW %	13,8-21,1		14,2-17,6		13,1-17,1	
#Retis 10^9/l	3,66-94,06			0-60	0-58,2 7,12-69,06	0-45,4 0-55,98
%Retis %	0,05-1,17	0,2-1,6	0-0,4	0,5-2,0	0-0,66 0,08-0,80	0-0,52 0-0,78

Tabelle 5.11: *Referenzwerte Katze mit Literaturvergleich*

Aus den Tabellen 5.10 und 5.11 ist ersichtlich, dass die erstellten Referenzwerte für den Hund und die Katze sehr gut mit den Daten aus der Literatur übereinstimmen. Für die prozentualen und absoluten Retikulozytenzahlen werden ähnlich erhöhte Werte wie in der Arbeit von Moritz und Mitarbeitern festgestellt (Moritz 2000, Moritz *et al* 2004). Die Literatur gibt eine Regeneration ab einer absoluten Retikulozytenzahl von 60 x 10^9/l beim Hund (Jain 1993, Moritz *et al* 2004, Villiers 2007, Weiss 2008) und von 40 x 10^9/l bei der Katze an (Kohn *et al* 2006, Perkins *et al* 1995, Villiers 2007). Die vom ADVIA® 120 bestimmten felinen und kaninen Retikulozytenzahlen waren in der Studie von Moritz höher als die in der Literatur beschrieben Zahlen, welche auf der manuellen Auszählung basieren. Eine Erklärung war, dass die laserbasierte Analyse der chromogen-angefärbten RBCs sensitiver für die Entdeckung der RNA sein könnte als das menschliche Auge bei der mikroskopischen Auszählung (Moritz *et al* 2004). In der eigenen Studie werden durch die manuelle Retikulozytenauszählung allerdings ebenfalls hohe Werte bestimmt, die mit den Daten des ADVIA® übereinstimmen. Somit müssen zusätzliche Faktoren in der Population der gesunden Tiere gesucht werden. Mit einigen der gesunden Hunde wird regelmäßig Hundesport durchgeführt (Agility), sodass die sportliche Aktivität zu einer Erhöhung der Retikulozyten geführt haben könnte. So wies Sassnau in einer Studie an Schlittenhunden nach, dass es durch den körperlichen Einsatz in der Trainings- und Wettkampfphase zu einem signifikanten Anstieg der Erythrozytenzahl, des Hämoglobingehalts und des Hämatokritwerts der Tiere kommt. Die beim Training entstandene Sauerstoffschuld führt über eine erhöhte Sekretion an Erythopoetin zu einer gesteigerten Erythropoese, um die Sauerstofftransportkapazität des Blutes zu erhöhen (Sassnau 2007).

Die Retikulozytenwerte der gesunden Katzen sind zwar auch etwas höher als die Zahlen aus der Literatur (Tabellen 5.12 und 5.13), liegen aber deutlich unter den von Moritz veröffentlichten Daten (Moritz 2000). Hinzu kommt die schwierige Differenzierung von aggregierten und punktierten Retikulozyten bei der Tierart Katze (Bienzle *et al* 2000).

Bei der Interpretation der Werte des LCblau bei der Katze ist zu beachten, dass nur 30 anstatt 44 Individuen an diesem Gerät gemessen wurden, dadurch die Berechnung durch manche Methoden nicht durchführbar war und andere Ergebnisse möglich sind.

Grad der Regeneration	Kanine Retikulozyten	Aggregierte feline Retikulozyten	Punktierte feline Retikulozyten
Keine	< 60 x 10^9/l (< 1,5%)	< 40 x 10^9/l (< 0,5%)	< 200 x 10^9/l
Geringgradig	60-150 x 10^9/l (1,5-4%)	41-70 x 10^9/l (0,5-2%)	200-500 x 10^9/l
Mittelgradig	150-300 x 10^9/l (5-20%)	70-100 x 10^9/l (3-4%)	500-1000 x 10^9/l
Hochgradig	> 500 x 10^9/l (> 20%)	> 200 x 10^9/l (> 4%)	1000-1500 x 10^9/l

Tabelle 5.12: *Retikulozytenwerte Literatur: Aus Villiers 2007*

Referenzwerte Retikulozyten Katze aus der Literatur				
	Aggregierte Retikulozyten		**Punktierte Retikulozyten**	
Perkins et al. 1995	8,5-42,0 x 10^9/l	0,1-0,5%	22,5-1270 x 10^9/l	2-17%
Weiss 2008	< 15 x 10^9/l		< 200 x 10^9/l	
Kohn et al. 2006	< 40 x 10^9/l			

Tabelle 5.13: *Referenzwerte Retikulozyten Literatur*

Limitierend bei der Erstellung der Referenzwerte in dieser Studie ist die geringe Anzahl an verfügbaren gesunden Hunden und Katzen. Damit sind internationale Empfehlungen der IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) und der CLSI (Clinical Laboratory and Standards Institute), Referenzbereiche aus mindestens 120 Tieren mit der nicht-parametrischen Methode zu erstellen, nicht erfüllt.

Wenn nur eine geringere Zahl an Probanden zur Verfügung steht, kann die Normalverteilung nicht evaluiert werden, sodass der Vergleich verschiedener Methoden zur Referenzwerterstellung inklusive neuerer Methoden wie der „Robust"-Methode empfohlen wird (Geffre *et al* 2009a, Geffre *et al* 2009b). In dieser Studie werden die Referenzwerte entsprechend dieser Empfehlungen erstellt.

Dabei ist festzustellen, dass die einzelnen Methoden vergleichbare Ergebnisse erzielen, die Verwendung mehrerer Methoden aber durchaus ihre Berechtigung hat. So ergibt z.B. die Berechnung des MCV bei der Katze mit der nicht-parametrischen Methode mit 31,5-48,5 im Vergleich zur Literatur sehr niedrige Werte, alle vier anderen Methoden setzen einen höheren unteren Wert fest (34,0-48,4), der zwar immer noch niedrig ist, aber besser zu den bekannten Zahlen aus der Literatur passt (Tabellen 4.14 und 5.11). Durch den Vergleich aller Methoden sind auch bei der

Bestimmung von Referenzwerten anhand einer kleinen Population repräsentative Ergebnisse möglich.

5.4 Kranke Tiere

Sowohl Tiere mit Anämie als auch kranke Tiere ohne Anämie, aber mit morphologischen Veränderungen werden in diesem Abschnitt hinsichtlich der Grunderkrankung und des Regenerationsvermögens diskutiert. Dabei wird die erythroide Morphologie durch die Interpretation von MCV, MCHC und RDW sowie die Beurteilung der grafischen Darstellungen der Erythrozyten mit einbezogen.

5.4.1 Tiere ohne Anämie

Bei den kranken Tieren ohne Anämie hat beim Hund ca. die Hälfte und bei der Katze ca. 1/3 der Patienten trotz eines normalen Hämatokrits eine erhöhte Retikulozytenzahl. Bei den makrozytär-hypochromen Tieren fällt im Gegensatz zu den Fällen mit Anämie auf, dass MCHC, MCV und RDW bei weniger Tieren verändert sind. Die Ausprägung der morphologischen Veränderungen bei nicht anämischen Tieren scheint also nicht so ausgeprägt zu sein, dass sie bei der Mehrzahl der Fälle dazu ausreicht, die Indizes zu verändern.
Von den Hunden mit makrozytär-hypochromen Erythrozyten sind 2/3 regenerativ. Einige Patienten sowohl mit als auch ohne erhöhte Retikulozyten stellen Patienten mit einer Immunhämolyse oder Blutungen unter Therapie dar. Auch in der Gruppe der makrozytär-normochromen Hunde sind Patienten mit einer ehemals immunbedingten Anämie vorhanden, die zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht regenerativ sind. Dies legt die Diskussion nahe, dass morphologische Veränderungen bei ehemals regenerativen Erkrankungen länger vorhanden sind als die Retikulozytose. Dies bestätigen Tvedten und Mitarbeiter, die die Anzahl der makrozytär-hypochromen Erythrozyten als einen sensitiven Indikator für eine gesteigerte Erythropoese, besonders in der späten Phase der Regeneration, ansehen, da die Retikulozyten in ihrer Anzahl zu diesem Zeitpunkt bereits wieder absinken (Tvedten *et al* 2000).

Unter den Hunden mit einer makrozytär-normochromen Erythrozytenveränderung sind drei Hunde mit einer Pudelmakrozytose als Rassebesonderheit hervorzuheben, wie sie von Canfield und Watson beschrieben ist (Canfield and Watson 1989).

Außerdem wurden alle Patienten mit einer immunhämolytischen Anämie oder Thrombozytopenie (vier) und die Fälle mit einer steroid-responsiven Meningitis (zwei) in dieser Gruppe mit Azathioprin als immunsuppressives Medikament behandelt. Eine Makrozytose der Erythrozyten ist eine gut bekannte Nebenwirkung von Azathioprin, die in einer Vielzahl von Studien bei Versuchstieren und beim Menschen dokumentiert ist (Al Safi *et al* 2002, Kim *et al* 1998, Zazgornik 1997). Die Makrozytose entsteht durch eine Interaktion des Azathioprin mit der DNA-Synthese und ist neben Doppelkernigkeit, fragmentierten Nukleoli, Riesenformen und atypischen Mitosefiguren ein weiteres Zeichen der Dyserythropoese (Weiss 2010).

Bei den Katzen ohne Anämie ist die normozytär-hypochrome Morphologie mit ca. 50% am häufigsten vertreten. Dementsprechend müssen gerätespezifische Verschiebungen im TIC TAC TOE mit in Betracht gezogen werden (Diskussion siehe unten).

In allen morphologischen Gruppen der Hunde und Katzen ohne Anämie sind Tiere mit unspezifischen Erkrankungen vertreten, sodass keine Aussage über das Auslösen einer bestimmten Morphologie durch eine entsprechende Erkrankung gemacht werden kann.
Die zweitgrößte Gruppe bei felinen Patienten ohne Anämie sind Katzen mit einer Endokrinopathie (drei mit Diabetes mellitus, 4 mit Hyperthyreose). Eine Katze mit Hyperthyreose weist makrozytär-hypochrome RBCs auf, so wie Christopher ebenfalls Katzen mit Hyperthyreose meist ohne Anämie mit einem erhöhten MCV beschreibt (Christopher 2000). Die anderen drei Tiere mit Hyperthyreose weisen normozytär-hypochrome Zellen auf, wovon die Ursache unbekannt ist.
Bei den an Diabetes mellitus erkrankten Tieren sind bei einem Fall hyperchrome Erythrozyten aufgrund von Heinzkörperchen vorhanden, was in der Literatur beim Diabetes mellitus bekannt ist (Christopher 2000, Weiss and Tvedten 2006). Die anderen zuckerkranken Katzen haben makrozytär-hypochrome Zellen ohne Regeneration.

5.4.2.1 Tiere mit Anämie

Krankheitshäufigkeit:

In der eigenen Studie ist bei den Hunden mit ca. 27% die Gruppe der Immunerkrankung am häufigsten vertreten. Dies entspricht Berichten aus der Literatur, wo die immunvermittelte hämolytische Anämie (IMHA) als die häufigste nicht-traumatische Anämieform bei Hund und Katze beschrieben ist (Balch and Mackin 2007a, Squires 1993). Bei der Katze kommt sie signifikant weniger häufig vor (Balch and Mackin 2007a, Kohn *et al* 2006), was in dieser Studie bestätigt werden kann, da bei nur 3 von 44 Katzen mit Anämie eine immunhämolytische Anämie diagnostiziert wurde.

Die nächsthäufigsten Erkrankungen beim Hund fallen in die Gruppen Hepatopathie, Chirurgie und Infektion. Die ungewöhnlich hohe Frequenz der Tiere mit einer Leberfunktionsstörung lässt sich mit der überrepräsentativ häufigen Vorstellung von Hunden mit einem portosystemischen Shunt aufgrund einer Spezialisierung der Klinik für Kleintiere in Gießen für einen kathetergestützen Verschluss des Shuntgefäßes erklären. In die Gruppe Chirurgie fallen Tiere mit Anämien nach einer Operation, die zusammen mit den Gerinnungsstörungen, gastrointestinalen Blutungen und neoplastischen Gefäßrupturen den Großteil von Patienten mit einer Blutungsanämie ausmachen. Neben hämolytischen Vorgängen stellen Hämorrhagien den zweiten, großen Ursachenkomplex der regenerativen Anämien dar (Köck 1998). Entsprechend den eigenen Daten wurden in der Arbeit von Köck Hunde mit Blutverlust, Nephropathien, Hämolysen, Gerinnungsstörungen, Neoplasien und hämatopoetischen Tumoren in absteigender Reihenfolge nachgewiesen (Köck 1998). Bei Katzen mit Anämie überwiegen Patienten mit lymphoretikulären Erkrankungen. Es kommen sowohl Knochenmarkerkrankungen (z.B. Panzytopenie, Erythroleukämie, aplastische Anämie) als auch Lymphome vor. Dabei ist häufig eine FeLV-Infektion nachzuweisen, was die große Bedeutung dieses Virus bei anämischen Katzen, wie in zahlreichen Studien belegt, unterstreicht (George *et al* 2002, Gleich and Hartmann 2009, Kohn *et al* 2006, Linenberger and Abkowitz 1995, Quigley *et al* 2000).

Regeneration:

Bei den anämischen Hunden mit regenerativer Anämie zeigen 88% erwartungsgemäß eine makrozytär-hypochrome Erythrozytenmorphologie, außerdem sind zusätzlich einige Fälle makrozytär-normochrom, was ebenfalls im Rahmen einer

Regeneration beschrieben ist (Stockham and Scott 2008). Von den Tieren, die trotz Regeneration keine makrozytären Zellen aufweisen, hat über die Hälfte eine mikrozytäre Erythrozytenpopulation. Dies lässt vermuten, dass mikrozytäre Zellen bei einer Regeneration nicht oder schwerer in den makrozytären Bereich kommen. Dies bestätigt sich in einer retrospektiven Studie von Sellon und Pullman, die bei Tieren mit einer Retikulozytose und normalem MCV Erkrankungen mit chronischem Blutverlust und Eisenmangel sowie antiinflammatorische Behandlung mit NSAIDs nachwiesen (Sellon and Pullman 2005).

In den eigenen Untersuchungen haben beim Hund 150 von 172 regenerativen Patienten gleichzeitig einen erhöhten RDW. Bei 115 Fällen ist das MCHC erniedrigt und bei 88 Tieren der MCV zusätzlich zu den Retikulozyten erhöht. Bei nur 36% der regenerativen Fälle sind gleichzeitig Retikulozyten, RDW und MCV erhöht und MCHC erniedrigt. Bei den regenerativen Katzen haben 35% einen erhöhten MCV, 39% einen erniedrigten MCHC und 83% einen erhöhten RDW. Bei 17% der Katzen sind alle Parameter verändert. In einer Studie von DeNicola und Mitarbeitern zeigten 22,5% der Hunde mit einer regenerativen Anämie einen erhöhten MCHC, 15,6% einen erhöhten MCV und nur 8,3% sowohl einen erhöhten MCHC als auch einen erhöhten MCV. Die Autoren schlussfolgern, dass die Veränderungen der Erythrozytenindices MCHC und MCV zur Erkennung einer Regeneration unzuverlässig sind (DeNicola *et al* 2006).

Eine große Veränderung in der Anzahl der Makrozyten kann den MCV erhöhen, der RDW ändert sich schon bei einer kleineren Anzahl an Makrozyten, wodurch die Möglichkeit einer früheren Erkennung an morphologischen Erythrozytenveränderungen besteht (Bessman and Johnson 1975). In Übereinstimmung mit dieser Aussage ist auch in den eigenen Untersuchungen der RDW besser zur Erkennung einer Regeneration geeignet als MCV und MCHC.

Durch einen Anstieg des RDW um 1% erhöht sich in einer Studie von Neiger und Mitarbeitern die Wahrscheinlichkeit eines anämischen Hundes regenerativ zu sein um den Faktor 1,3 und durch die Erhöhung des MCV um 1 fL um den Faktor 1,14 (Neiger *et al* 2002). Mit einem Cut-off-Wert für den RDW von 16,25% und für den MCV von 68,2 fL konnte die Anämie von 75% der Hunde korrekt klassifiziert werden. Die Sensitivität lag bei 53% und die Spezifität bei 88% (Neiger *et al* 2002).

Die Anfälligkeit des MCV als alleiniger Wert zur Beurteilung einer Regeneration unterstützen Jones und Gruffydd-Jones, die aussagen, dass der MCV auch bei

osmotischen Effekten oder einer Autoagglutination fälschlicherweise ansteigen kann (Jones and Gruffydd-Jones 1991). Außerdem fanden Kohn und Mitarbeiter bei 13 von 18 Katzen mit primärer IMHA einen erhöhten MCV, aber nur bei 8 der Tiere konnte eine Retikulozytose nachgewiesen werden. Ein erhöhter MCV kann demnach auch bei Patienten mit einer schweren Erythrozytenagglutination entstehen, bei denen das Blutanalysegerät die einzelnen Erythrozyten nicht identifizieren kann (Kohn *et al* 2006).

Bei den nicht regenerativen Hunden haben nur 17 von 88 Tieren eine normozytär-normochrome Erythrozytenmorphologie auf dem TIC TAC TOE. Bei der Mehrzahl der Patienten sind makrozytär-hypchrome oder makrozytär-normochrome Zellen vorhanden. Bei 38 von 88 Hunden fällt ein erhöhtes RDW, bei 32 einen erniedrigten MCHC und bei 21 einen erhöhten MCV auf. Diese Befunde im Zusammenhang mit der Interpretation der grafischen Darstellungen legen bei einigen Patienten eine beginnende Regeneration nahe, die sich noch nicht in einer Retikulozytose im peripheren Blut zeigt. In diesem Zusammenhang wären Verlaufsuntersuchungen sehr interessant.

Makrozytär-hypochrome Anämie:

Bei Hund und Katze stellt die Gruppe der makrozytär-hypochromen Anämie die größte Fraktion dar. Bei den meisten Tieren kommt die Makrozytose im Rahmen einer Regeneration zustande, wie z.B. bei immunhämolytischen Anämien, Blutungsanämien, Infektionen und Leberfunktionsstörungen. Dementsprechend wiesen Bovy und Mitarbeiter beim Menschen eine positive Korrelation zwischen Retikulozyten und den makrozytär-hypochromen Erythrozyten in der grafischen Darstellung nach (Bovy *et al* 2005). In diese Gruppe fallen aber auch Patienten mit einem Diabetes mellitus, einer Hypothyreose oder einer Hyperthyreose, wo eine Regeneration nicht unbedingt zu erwarten ist und anhand der Retikulozytenzahlen hier auch nicht nachweisbar ist. In der grafischen Darstellung zeigen aber auch diese Patienten Hinweise auf eine beginnende Regeneration, sodass die hämatologischen Veränderungen evtl. nicht alleine durch die Endokrinopathie ausgelöst werden, sondern ein vielschichtigeres und undurchsichtiges Krankheitsbild zugrunde liegen könnte.

Makrozytär-normochrome Anämie:

Während bei kaninen Patienten makrozytär-normochrome Anämien meist bei regenerativen Tieren vorkommen, leiden ¾ der anämischen Katzen mit einer Makrozytose an einer lymphoretikulären Erkrankung, bei der meist FeLV eine nachgewiesene oder vermutete Rolle spielt. Eine Makrozytose im Zusammenhang mit einer FeLV-Infektion ist in zahlreichen Studien dokumentiert. Diese kommt bei natürlich infizierten Katzen sowohl mit als auch ohne Anämie vor (Carmichael *et al* 2002, Christopher 2000, Weiser and Kociba 1983a, Weiss and Tvedten 2006). Die Makrozytose im peripheren Blut kommt durch eine gestörte Ausreifung der Erythrozyten und der Bildung von megaloblastischen Zellen mit defekter DNA-Synthese zustande, die zu einer verminderten Mitose im Knochenmark führt (Christopher 2000, Linenberger and Abkowitz 1995).

Normozytär-hypochrome Anämie:

Diese eher unübliche Form der Morphologie (Stockham and Scott 2008) scheint bei Hunden im Rahmen von Regenerationen vorzukommen. Die meisten Tiere mit dieser morphologischen Veränderung sind regenerativ, die nicht regenerativen haben Anzeichen für eine beginnende erythroide Nachbildung im TIC TAC TOE. Da 20% der Katzen mit Anämie hypochrome Zellen haben und in den meisten Fällen eine normozytär-normochrome Anämie erwartet worden ist, kann die speziesspezifische Geräteeinstellung des Lasers eine zusätzliche Rolle spielen. Dies wird dadurch unterstützt, dass 25% der gesunden Katzen und 50% der kranken Katzen ohne Anämie in dieser Studie ebenfalls einige Zellen im normozytär-hypochromen Bereich haben.

Normozytär-normochrome Anämie:

Obwohl die Ursachen für eine normozytär-normochrome Anämie mannigfaltig sind (siehe Kapitel 2.2.3.3), treten in dieser Studie nur 7,5% der Hunde und 13,6% der Katzen mit dieser Anämieform auf. Es sind Tiere mit chronischer Niereninsuffizienz und akuter Blutungsanämie vertreten, aber auch Patienten mit Infektionen, Lymphomen und anderen Erkrankung dabei, sodass auch hier eine chronische Begleitanämie als Ursache der Anämie eine Rolle spielen kann (Sellon and Pullman 2005, Weiss 2009). Die Mehrzahl der Patienten in dieser Gruppe ist erwartungsgemäß nicht regenerativ und hat i.d.R. normale Indizes. Da in dieser

Studie der Schwerpunkt auf Anämien mit morphologischen Veränderungen lag und nicht alle Hunde und Katzen mit Anämien eingeschlossen wurden, ist der geringe Prozentsatz nicht repräsentativ für die Häufigkeit einer normozytär-normochromen Anämie.

Normozytär-hyperchrome Anämie:

Das Auftreten normozytär-hyperchromer Erythrozyten kommt meist im Zusammenhang mit anderen morphologischen Veränderungen vor. Der MCHC ist dabei nur in Ausnahmefällen wie dem Vorhandensein von agglutinierten Erythrozyten erhöht. Der in bisherigen Studien beschriebene Zusammenhang zwischen hyperchromen Erythrozyten und nachweisbaren Heinzkörperchen im Blutausstrich (Tvedten *et al* 2000, Tvedten and Holan 1996), kann bei 50% der Hunde und bei 92% der Katzen mit hyperchromen Zellen nachvollzogen werden. Bei einigen Tieren kommt der oxidative Stress durch eine NSAID-Behandlung als Auslöser der Heinzkörperchen-Bildung in Frage. 30% der anämischen Katzen-Proben sind normozytär-hyperchrom. Hiermit kann bestätigt werden, dass die Bildung von Heinzkörperchen bei verschiedenen Erkrankungen bei Katzen häufiger vorkommt als bei Hunden (Christopher 2000, Weiss and Tvedten 2006).

Mikrozytäre Anämie:

Hunde mit mikrozytären Erythrozyten haben in dieser Studie Leberfunktionsstörungen, einen Eisenmangel unbekannter Ursache oder chronische Blutungen unterschiedlicher Genese. Diese Erkrankungen entsprechen denen in der Literatur beschriebenen Ursachen einer Mikrozytose (Ferrell *et al* 2003, Meyer and Harvey 1994, Moritz *et al* 2006, Seguin and Bunch 2001, Squires 1993, Weiss and Tvedten 2006). Bei einigen der restlichen Tiere mit mikrozytären Zellen kommt eine AID (anemia of chronic disease) als Ursache der Anämie im Rahmen der schweren Entzündungsprozesse der Grunderkrankung in Frage (Sellon and Pullman 2005, Weiss 2009), wohingegen bei anderen durch eine Retikulozytose die AID eher unwahrscheinlich ist.

Bei den felinen Patienten kommen im Patientengut keine mikrozytären Anämien vor. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Katzen mit portosystemischem Shunt seltener auftreten als Hunde und dass Katzen durch eine größere Eisenresorption aus der Nahrung weniger anfällig für die Entwicklung einer Eisenmangelanämie sind (Fulton *et al* 1988, Harvey 2008a).

Ein erwartungsgemäß erniedrigter MCV kann nicht in allen Fällen nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Insensitivität des MCV, wenn der Wert als alleiniger Faktor zur Detektion einer Mikrozytose herangezogen wird, da eine relativ hohe Prozentzahl an Mikrozyten vorhanden sein muss, um den MCV zu verändern (Harvey 2008a). In den meisten Fällen mit normalem MCV sind zusätzlich makrozytäre Zellen als Regenerationsanzeichen nachzuweisen, sodass die Mikrozytose maskiert wird. In ähnlicher Weise kann die Mikrozytose durch einen Eisenmangel bei säugenden Katzenwelpen durch das gleichzeitige Vorhandensein von Makrozyten nach der Geburt oft nicht am MCV erkannt werden (Weiser and Kociba 1982).

Die Diagnose eines unkomplizierten und chronischen Eisenmangels stützt sich auf die klassische Hämatologie und biochemische Abnormalitäten wie z.B. eine mikrozytäre, hypochrome Anämie, verminderte Serumferritin-Konzentrationen, verminderte Serum-Eisen-Konzentrationen, erhöhte Totale Eisen-Bindungskapazität, verminderte prozentuale Transferrin-Sättigung (Steinberg and Olver 2005). Einen frühen Eisenmangel festzustellen ist weitaus schwieriger, da die genannten Verfahren dafür zu insensitiv sind.

Studien von Steinberg und Olver sowie Fry und Kirk haben gezeigt, dass Retikulozytenindizes wie CHr (retikulozytärer Hämoglobingehalt) und rMCV (retikulozytärer MCV) bessere Indikatoren für den Eisenstatus, sowohl für die Entstehung als auch für das Ansprechen auf Therapie, darstellen als die konventionelle Hämatologie und biochemische Indizes (Fry and Kirk 2006, Steinberg and Olver 2005).

Eine Auswertung dieser Parameter bei Tieren mit Eisenmangel in Zusammenhang mit den grafischen Darstellungen wäre für weitere Studien ein ergänzender Aspekt.

5.4.2.2 Anämieklassifikation

Für die in der Literatur üblichen Cut-off-Werte für Retikulozyten bei Hund und Katze kann für den ADVIA® 120 eine sehr gute Sensitivät, aber nur eine mäßige Spezifität in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Somit werden durch dieses Gerät zwar wenige regenerative Tiere als nicht regenerativ klassifiziert, aber es gibt einige falsch-positive Ergebnisse, was bedeutet, dass Patienten mit einer nicht regenerativen Anämie zum Zeitpunkt der Messung als regenerativ eingestuft werden.

Durch die Anhebung des Cut-off-Wertes auf 80 x 10^9/l können für den ADVIA® 120 mit einer Sensitivität von 92% (Hund) bzw. 100% (Katze) und einer Spezifität von 90% (Hund und Katze) Geräte-spezifische und somit praktikable Ergebnisse für die Einteilung in regenerative und nicht regenerative Anämien erreicht werden.
Beim LaserCyte® hingegen ist durch die Anpassung des Cut-off-Wertes der Retikulozyten auf 35 x 10^9/l zwar eine Verbesserung der Sensitivität erreichbar, allerdings wird bei Sensititvitäten und Spezifitäten von ca. 80% die Anämie von zu vielen Patienten missklassifiziert. Zum Erreichen einer Sensitivität und Spezifität von mind. 90% müssen für den LaserCyte® sowohl für den Hund als auch für die Katze Graubereiche definiert werden, in denen keine Klassifikation der Anämie vorgenommen werden kann. Das Festsetzen von Graubereichen ist bei vielen Tests üblich, wurde bezüglich der Retikulozyten bis zum jetzigen Zeitpunkt allerdings nicht angewendet.
Durch die ROC-Kurven von RI und RPI können sehr gute Sensitivitäten und Spezifitäten nachgewiesen werden. Allerdings wird in der eigenen Arbeit als Golden Standard für die Regeneration der Vergleich mit den absoluten Retikulozytenzahlen gewählt, welche auf der manuell ausgezählten Retikulozytenprozentzahl basieren. In die Berechnung von RI und RPI gehen dieselben Prozentzahlen der Retikulozyten ein, sodass eine gute Übereinstimmung dieser beiden Methoden nicht verwundert. Ein Vergleich der Sensitivitäten und Spezifitäten von RI und RPI mit denen der Geräte erscheint aus diesem Grund nicht sinnvoll.
In der Literatur wird beschrieben, dass der RPI im Anfangsstadium einer Anämie, in der die Retikulozytose ihr volles Ausmaß noch nicht erreicht hat, unempfindlicher zu reagieren scheint. Der RPI ist deswegen zur Beurteilung der Regenerativität weniger geeignet als die absolute Retikulozytenzahl (Köck 1998).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Retikulozytenanalyse mittels Durchflusszytometrie durch den ADVIA® 120 für die Tierarten Hund und Katze eine sehr gute Alternative zur manuellen Auszählung darstellt.
Für den LaserCyte® sind durch die Unterschätzung der Retikulozyten schlechtere Ergebnisse nachzuweisen. Die Differenzierung zwischen reifen Erythrozyten und Retikulozyten durch unterschiedliche Absorption und Streuung der ribosomalen Fragmente der Retikulozyten beim LaserCyte® scheint weniger gut zu funktionieren als beim ADVIA® 120. Es ist zu klären, ob die Retikulozytenmessung durch eine

Veränderung des Schwellenwerts, der die Trennung zwischen reifen Erythrozyten und Retikulozyten festsetzt, verbessert werden kann. Dieser Schwellenwert wird bei der Durchflusszytometrie durch statistische Analysen definiert, was zu einer inakkuraten Zählung führen kann (Lippi *et al* 2005, Riley *et al* 2001). Als Alternative kann für den LaserCyte® auch ein angepasst niedrigerer Cut-off-Wert mit Festsetzung eines gerätespezifischen Referenzbereiches für die Retikulozytenanalyse benutzt werden.

5.4.3 Grafische Darstellungen

In allen morphologischen Gruppen ist nachzuweisen, dass die grafischen Darstellungen zur Detektion morphologischer Veränderungen der Auswertung von RDW, MCV und MCHC überlegen sind. Wenn nur eine geringe Anzahl an Zellen der Erythrozytenpopulation (5-20%) morphologisch verändert ist, geben die Erythrozytenindizes oft keinen Hinweis auf die Art der Anämie (Weiss and Tvedten 2006).

Als Beispiel ist die Gruppe der makrozytär-normochromen Tiere zu nennen, wo bei nur ca. 50% der Hunde und Katzen die Makrozytose durch einen erhöhten MCV erkannt wird. Bei den mikrozytär-hypochromen Anämien beim Hund ist der MCV bei 24 von 45 Hunden erniedrigt. Sobald andere Zellpopulationen z.B. nach einer Bluttransfusion oder durch körpereigene Regeneration zusätzlich vorhanden sind, kann eine Mikrozytose bzw. Makrozytose an den Wintrobe-Indizes nicht mehr erkannt werden, wohl aber an der grafischen Darstellung oder im Blutausstrich.

Der MCV und der MCHC sind nicht sensitiv genug, geringgradige oder frühe Veränderungen der Erythrozytenmorphologie zu erkennen, da sie Durchschnittswerte der gesamten Erythrozytenpopulation darstellen (Tvedten 1999). Dies gilt v.a. für Katzen, wo 5% an aggregierten Retikulozyten bereits eine gute regenerative Antwort bedeuten, aber nicht dazu in der Lage sind, MCV und MCHC zu verändern (Tvedten 1999).
Ebenso können RDW und Blutausstrich das Vorhandensein einer Retikulozytose nicht präzise reflektieren (Sellon and Pullman 2005).

Der ADVIA® 120 ist gut dazu geeignet, Veränderung der Erythrozyten zu registrieren, da er Volumen und Hämoglobingehalt jedes einzelnen Erythrozyten erfasst. Im Erythrozyten-Zytogramm werden physiologische und veränderte Erythrozyten-populationen anhand ihrer Größe und ihres Hämoglobingehalts dargestellt (Weiss and Tvedten 2006).
Ebenso ist der ADVIA® 120 durch die Messung der Anzahl mikrozytärer Zellen und deren graphische Darstellung ein sensitiverer Test für einen Eisenmangel als MCV und MCHC. Durch das gleichzeitige Vorhandensein von großen, jungen RBCs kann durch die herkömmlichen Indizes die Mikrozytose verpasst werden oder die Anzahl der mikrozytär-hypochromen Zellen ist zu klein um nur mit dem MCV und dem MCHC entdeckt zu werden (Tvedten *et al* 2000).
Der LaserCyte® ist durch seine Dotplots ebenfalls in der Lage morphologische Veränderungen der Erythrozyten zu detektieren. Es ist allerdings schwerer, auf der mit der MIE MAP des ADVIA® vergleichbaren Darstellung (linke Abbildung) dezente Veränderungen zu sehen. Es ist zu prüfen, ob es technisch möglich ist, eine dem TIC TAC TOE ähnliche Darstellung zu programmieren, damit auch für weniger geschultes Personal eine Beurteilung einfach möglich ist und erste Abweichungen in der Morphologie besser erkennbar sind.

Die folgenden Beispiele aus den eigenen Messungen zeigen, dass auf den grafischen Darstellungen erste Veränderungen schon erkennbar sind, während die Retikulozyten und die vom Gerät gemessenen für die Beurteilung der Regeneration anwendbaren Parameter MCV, MCHC und RDW später reagieren. Es ist also sinnvoll, die Dotplots bei Veränderungen der Morphologie in die Interpretation des klinischen Falls mit einzubeziehen.

Beispiel 1 (Abbildungen 5.1-5.3):

In Abbildung 5.1 dargestellt sind die Dotplots einer 4jährigen Dackelhündin mit hochgradiger Anämie, die zum Zeitpunkt der Vorstellung mit 20 x 10^9/l Retikulozyten nicht regenerativ ist. Im TIC TAC TOE sind einige normozytär-hyperchrome Zellen und einige makrozytär-normochrome Zellen erkennbar. MCV, MCHC und RDW sind normal.

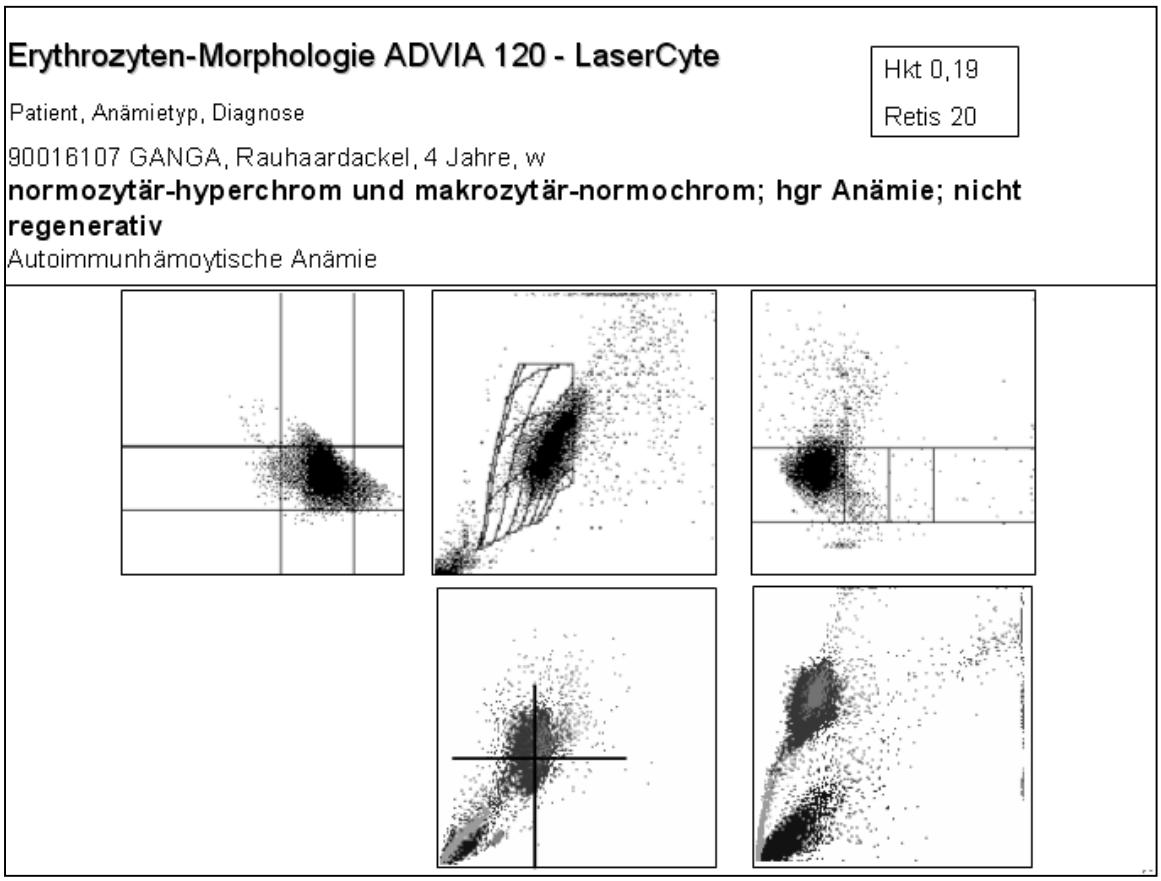


Abbildung 5.1

2 Tage später (Abbildung 5.2) ist der Hämatokrit nach einer Bluttransfusion leicht angestiegen, die Retikulozyten sind nicht erhöht, aber auf dem Dotplot entwickeln sich mehr Punkte in den makrozytären Bereich und es sind auch vereinzelt makrozytär-hypochrome Zellen sichtbar. Der MCV liegt über dem Referenzbereich, während MCHC und RDW nicht verändert sind. Diese Befunde lassen sich als eine beginnende Regeneration interpretieren, die in die Beratung der Besitzer und Entscheidung über eine weitere Therapie mit einfließen sollten.

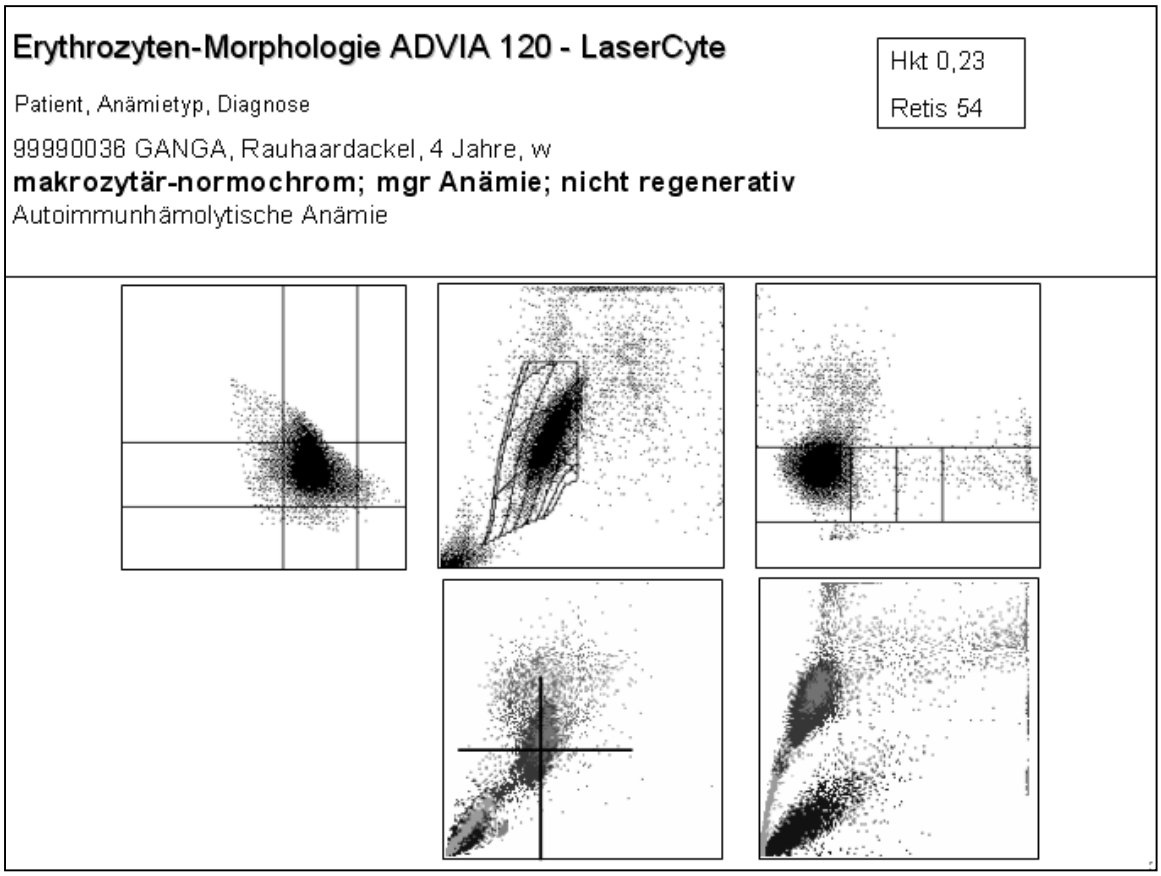


Abbildung 5.2

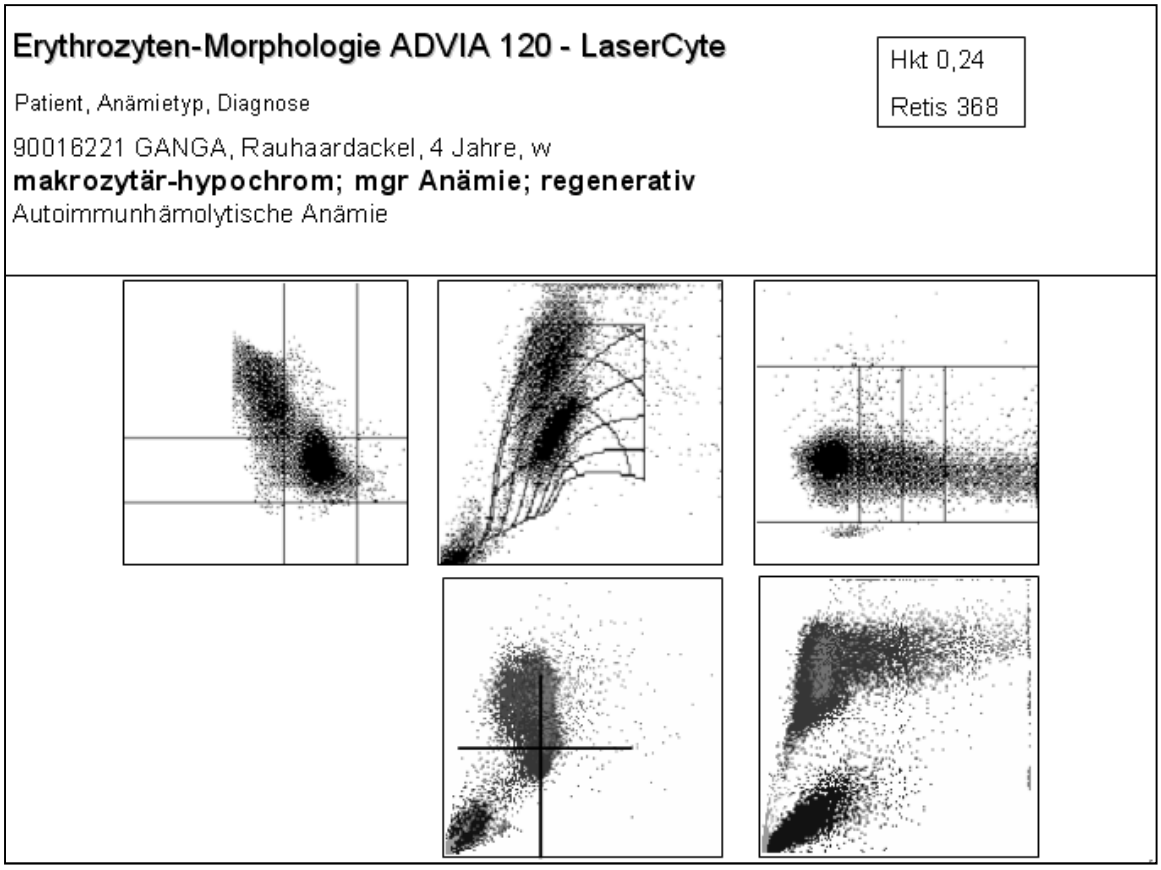


Abbildung 5.3

In diesem Fall sind die Befunde noch einmal 4 Tage später eindeutig (Abbildung 5.3): Deutlich erhöhte Retikulozyten, makrozytär-hypochrome Erythrozyten durch eine Regeneration, RDW und MCV erhöht, MCHC erniedrigt.

Beispiel 2 (Abbildungen 5.4 und 5.5):

Bei einer 10jährigen Jagdterrierhündin mit immunhämolytischer Anämie wird die Anämie als mittelgradig und nicht regenerativ klassifiziert. MCV, MCHC und RDW liegen im Normbereich. Die Morphologie der Erythrozyten ist hauptsächlich normozytär-normochrom, aber es sind auch einzelne Punkte im makrozytär-hypochromen Bereich sichtbar, was für eine beginnende Regeneration sprechen könnte (Abbildung 5.4).

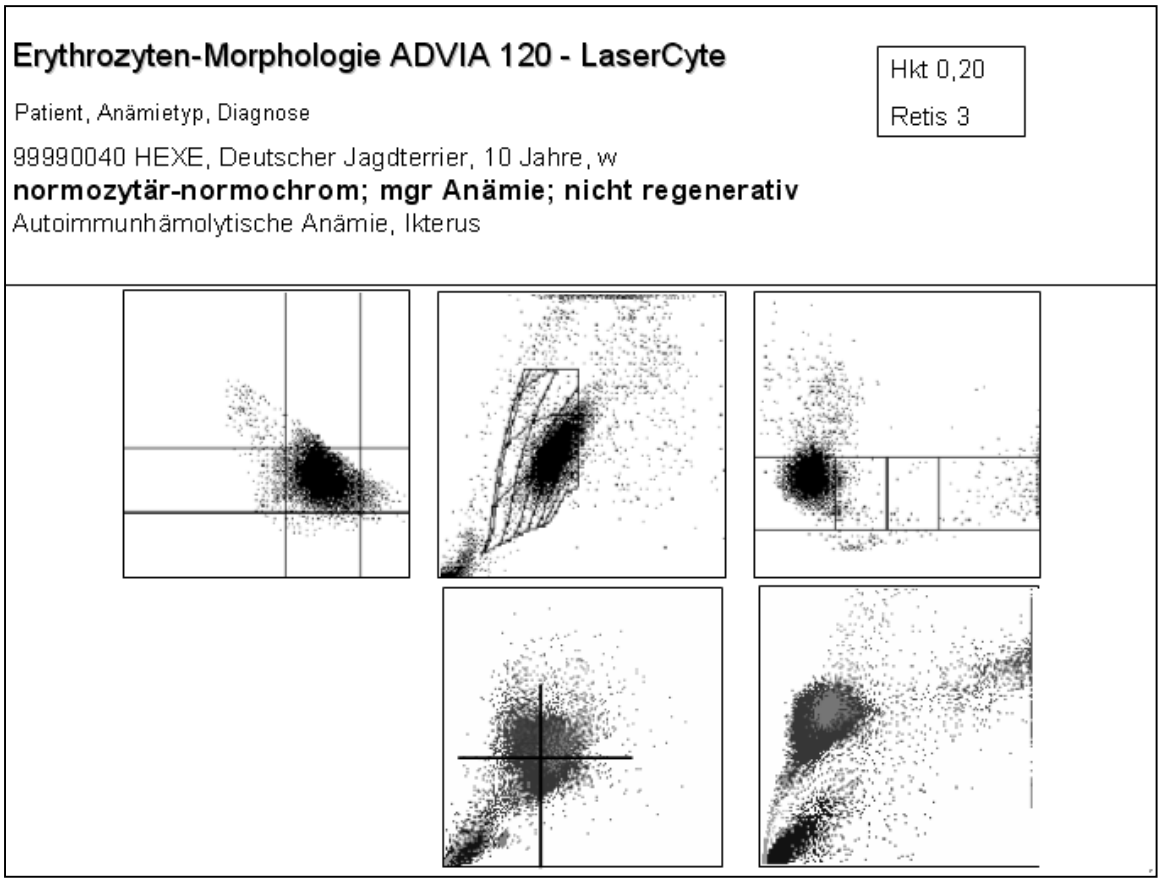


Abbildung 5.4

2 Tage später ist in Abbildung 5.5 die Regeneration erkennbar: Erhöhte Retikulozyten, makrozytär-hypochrome Erythrozyten, MCV, RDW erhöht, MCHC normal.

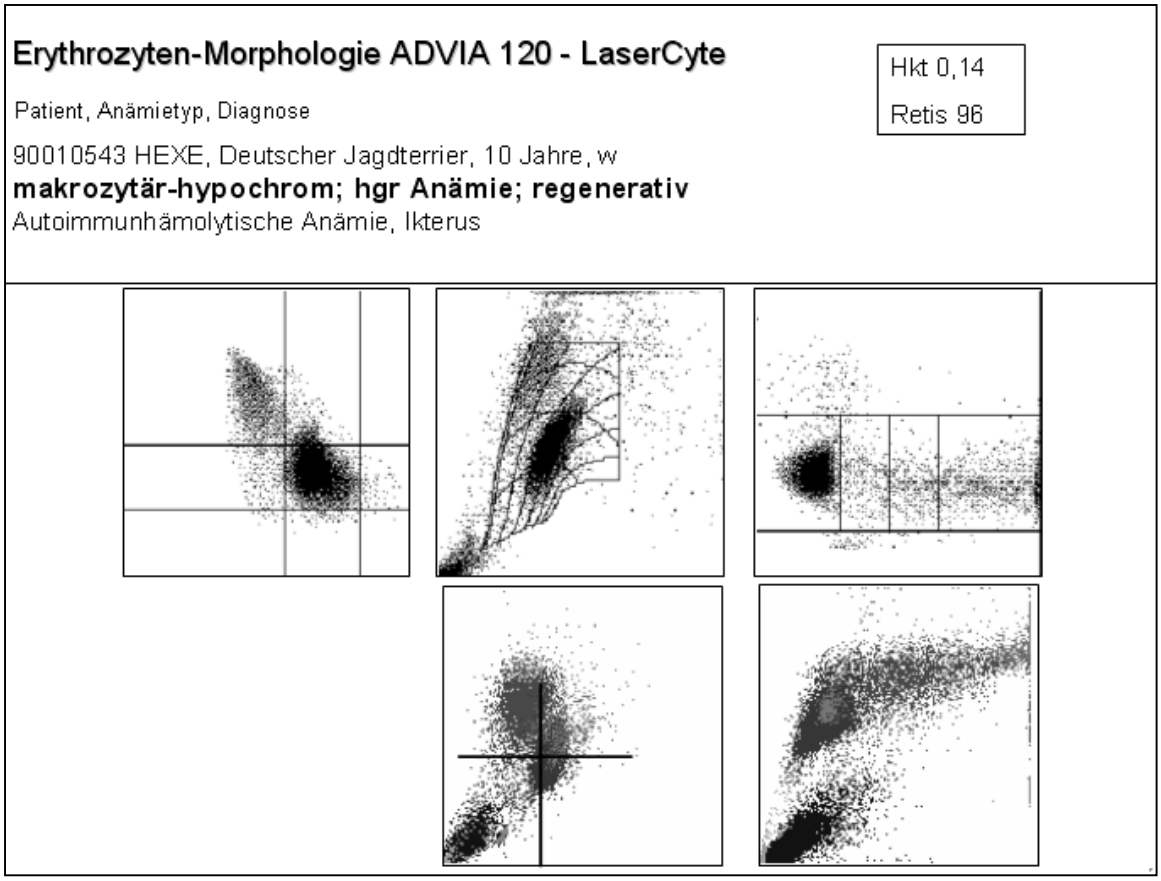


Abbildung 5.5

Die Technologie der Durchflusszytometrie wurde in den letzten 20 Jahren u.a. für die Anwendung in Hämatologiegeräten immer mehr verbessert. Die Durchflusszytometrie ergänzt und erweitert gerade durch die grafischen Darstellungen das Wissen, welches durch die lichtmikroskopische Untersuchung erlangt werden kann (Weiss 2002a).

Viele erythrozytäre Abnormalitäten können allerdings mittels automatisierter Hämatologie-Analyse nicht entdeckt werden. Dazu gehören kanine Sphärozyten, Blutparasiten, Akanthozyten, Fragmentation, basophile Tüpfelung und Howell-Jolly-Körperchen. Daher bleibt die Evaluierung von Blutausstrichen von anämischen Tieren enorm wichtig (Tvedten *et al* 2000).

6. Zusammenfassung

Ziel der Studie

Ziel der vorliegenden Studie ist die durchflusszytometrische Untersuchung (ADVIA® 120 und LaserCyte®) von anämischen Hunden und Katzen und von Tieren mit morphologischen Veränderungen sowie die Auswertung der morphologischen Erythrozytenveränderungen anhand von Geräteparametern und grafischen Darstellungen.

Material und Methoden

In die Studie eingeschlossen werden Blutproben von 329 Hunden und 77 Katzen mit Anämie oder morphologischen Erythrozytenveränderungen. Diese werden am ADVIA® 120 und an zwei LaserCyte®-Geräten analysiert. Als Vergleich des Hämatokrits dient der Zentrifugenhämatokrit und die gemessene Retikulozytenzahl wird anhand von manuell ausgezählten Retikulozyten auf supravitalgefärbten Blutausstrichen überprüft.

Für alle drei Geräte erfolgt für den Hund eine Präzisionsmessung innerhalb einer Serie. Im Methodenvergleich werden die Korrelation, die Passing&Bablok-Regression sowie die Bland-Altman Analyse zur statistischen Auswertung herangezogen. Dazu wird das Programm „Analyse it“ für Microsoft Excel (2003) verwendet.

Anhand von 60 gesunden Hunden und 44 gesunden Katzen werden eigene Referenzwerte bestimmt.

Die Beurteilung der morphologischen Erythrozytenveränderungen erfolgt durch die Parameter MCV, MCHC und RDW im Vergleich zu den grafischen Darstellungen beider Geräte. Außerdem wird die Krankheitsursache in die Auswertung mit einbezogen.

Ergebnisse

Der ADVIA® 120 weist für die **Präzision** innerhalb der Serie beim Hund für die Parameter RBC, HGB, HKT, MCV, MCH, MCHC und RDW mit Variationskoeffienten von 0,33-1,92% sehr gute Ergebnisse auf. Für die Retikulozytenzählung ergeben sich in Übereinstimmung mit der Literatur gute Präzisionen (CV 4,78-10,31%). Beim

LaserCyte® ist für den MCV und den RDW mit CV-Werten zwischen 0,38 und 2,49% ebenfalls eine exzellente Präzision nachzuweisen. Die anderen Parameter der roten Zellreihe liefern für den LaserCyte® mit guten bis mäßigen Präzisionen schlechtere Ergebnisse als der ADVIA® 120. Mit Variationskoeffizienten von bis zu 28,75% weist die Retikulozytenmessung am LaserCyte® eine starke Impräzision auf.

Im **Methodenvergleich** werden Spearman-Korrelationskoeffizienten r_s zwischen 0,99 und 0,09 erreicht. Für die Parameter RBC, HGB und HKT sind sehr gute Korrelationen (r_s 0,92-0,99) zwischen den Geräten nachzuweisen, während die Werte für den MCV, den RDW und die Retikulozyten als mäßig bis gut zu bezeichnen sind. Die Korrelationen für MCH und MCHC sind als unzureichend anzusehen. Bei der Beurteilung der Steigungswerte fallen unterschiedlich starke proportionale Fehler im Vergleich von allen Parametern auf: Beim RBC beim Vergleich mit dem LCblau, beim HGB, beim HKT für den Hund beim Vergleich mit dem LCblau, für die Katze beim Vergleich mit dem LCrot. Ausgeprägte proportionale Fehler zwischen dem ADVIA® 120 und dem LaserCyte® werden für die Parameter MCV, RDW, MCH und MCHC nachgewiesen. Die Retikulozytenzahlen bei Hund und Katze fallen beim LaserCyte® niedriger aus als beim ADVIA® 120 und der manuellen Methode, sodass die Retikulozyten v.a. bei hohen Werten am LaserCyte® unterschätzt werden.

Die mittels verschiedener Methoden erstellten **Referenzwerte** für Hund und Katze passen gut zu den in der Literatur veröffentlichten Daten.

Beim Hund wird eine Anämie am häufigsten durch Immunhämolysen, Hepatopathien, Blutungsanämien und Infektionen ausgelöst. Bei anämischen Katzen sind lymphoretikuläre Erkrankungen am häufigsten vertreten.

Die Auswertung der **Erythrozytenmorphologie** anhand der Parameter MCV, MCHC und RDW sowie durch die grafischen Darstellungen lässt den Schluss zu, dass die DotPlots bei der Entdeckung morphologischer Erythrozytenveränderungen der Beurteilung von RDW, MCV und MCHC überlegen sind. Die Erkennung von Zellen mit abweichender Morphologie ist auf den DotPlots beider Geräte möglich, wobei erste Veränderungen auf dem TIC TAC TOE des ADVIA® 120 einfacher zu detektieren sind.

Die Retikulozytenanalyse durch den ADVIA® 120 ist für Hund und Katze gut zur **Anämieklassifikation** geeignet. Durch die Anhebung des Cut-off-Wertes auf 80 x 10^9/l Retikulozyten beim Hund können gute Sensitivitäten von 92% (Hund) und 100%

(Katze) und Spezifitäten von 90% (Hund und Katze) zur Anämieklassifikation erreicht werden. Beim LaserCyte® ist durch ein Herabsetzen des Cut-off-Wertes auf 35 x 10^9/l zwar eine Verbesserung von Sensitivität und Spezifität möglich, aber erst durch das Festsetzen eines Graubereiches, in dem keine Anämieklassifikation durchgeführt wird, können zufriedenstellende Sensitivitäten und Spezifitäten von über 90% erreicht werden.

7. Summary

Aim of the study

The aim of the current investigation is the flow cytometrical examination (ADVIA® 120 and LaserCyte®) of blood specimens obtained from anaemic dogs and cats and from animals with morphological changes of erythrocytes as well as the assessment of variables and graphical reports of the analyzers reflecting erythrocyte abnormalities.

Material and methods

Blood specimens of 329 dogs and 77 cats with anemia or morphological changes of erythrocytes are included in the study and assayed with the ADVIA 120® and 2 LaserCyte® analyzers. The spun packed cellular volume and the manual reticulocyte count on blood smears stained with a supravital stain serve as reference method for the hematocrit value and the automatic reticulocyte count.

Intra-assay repeatability is evaluated for all three analyzers. Accuracy is assessed with the coefficient of correlation, a Passing&Bablock regression analysis and a Bland-Altman diagram using commercially available software ("Analyse it" for Microsoft Excel, 2003).

Reference intervals are established with 60 healthy dogs and 44 healthy cats.

Morphological changes of erythrocytes are evaluated based on MCV, MCHC, and RDW in comparison to the graphical reports of both analyzers. Moreover, the etology of disease is included in the evaluation.

Results

Regarding **intra-assay precision** in dogs, excellent results are obtained for the ADVIA® 120 for the variables RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, and RDW with coefficients of variation (CV) ranging between 0.33%-1.92%. In accordance with the literature, good precision can be achieved for reticulocyte counts (CV 4.78%-10.31%). For the LaserCyte® excellent precision is also present for the MCV and RDW with CVs ranging between 0.38 and 2.49.

Precision of the LaserCyte® is good to moderate for the other red blood cell parameters and thus not as good as for the ADVIA® 120. With a CV of 28.75% a high imprecision is evident for the reticulocyte count of the LaserCyte®.

Assessment of **accuracy** reveals Spearman´s coefficients of correlation (r_s) between 0.99 and 0.09. An excellent correlation between the analyzers is seen for the RBC, HGB and HCT (r_s=0.92-0.99) whereas r_s-values for MCV, RDW and reticulocytes can be classified as good to fair. The agreement between MCH and MCHC can be regarded as inadequate. The evaluation of the slopes of the regression curves reveals proportional errors of varying severity for all variables: for the RBCs in comparison with LCblau, for the HGB, the HCT in comparison with the LCblau in dogs, and for the cat in comparison with the LCrot.

A marked proportional error between results obtained with the ADVIA® 120 and LaserCyte® is evident for the MCV, RDV, MCH, and MCHC.

Canine and feline reticulocytes are lower with the LaserCyte® than with the ADVIA® 120 and the manual method, so that especially high reticulocyte numbers are undererstimated.

Reference intervals for dogs and cats established with several methods are in accordance with results published previously.

Most common etology for anemia in dogs includes immune mediated hemolysis, hepatopathies, blood loss and infections, whereas in anemic cats lymphoreticular diseases are dominating.

Based on the evaluation of the **erythrocyte morphology** using the variables MCV, MCHC and RDW as well as the graphical reports, it can be concluded that the DotPlots are a better diagnostic tool for the recognition of morphological erythrocyte abnormalities than the RDW, MCV and MCHC.

The detection of cells with abnormal morphology is possible with DotPlots of both hematology analyzers, however, the earliest changes are easier to recognize in the TIC TAC TOE scattergram of the ADVIA® 120.

Using the reticulocyte analysis of the ADVIA® 120, a good **classification of anemias** is possible in dogs and cats. By increasing the cut-off value to 80×10^9/l reticulocytes, a good sensitivity of 92% (dog) and 100% (cat) respectively as well as a specificity of 90% (dog and cats) for correctly classifying the anaemia can be achieved. A decrease in the cut-off value to 35×10^9/l reticulocytes improves the sensitivity and specificity of the LaserCyte®, however, satisfying sensitivies and specificies of more than 90% can be only achieved after definition of a grey zone in which no classification of anemia is possible.

8. Abkürzungen

Abb	=	Abbildung
AID	=	anemia of inflammatory disease
AIHA	=	autoimmunhämolytische Anämie
ATP	=	Adenosin-Triphosphat
AUC	=	area under the curve (Fläche unter der Kurve)
BFU-E	=	burst forming unit-erythroid
Bias	=	Mittelwertsunterschied
ca	=	circa
CFU-E	=	colony forming unit-erythroid
CHCM	=	corpuscular hemoglobin concentration mean
CI	=	Confidence interval
CLL	=	chronisch lymphatische Leukämie
CV	=	coefficient of variation (Variationskoeffizient)
DEA	=	dog erythrocyte antigen
DIC	=	disseminierte intravasale Coagulopathie
EKH	=	Europäisch Kurzhaar
EMP	=	erythroblast macrophage protein
EPO	=	Erythropoetin
evtl	=	eventuell
EXT	=	Extinction
FeLV	=	Felines Leukämie-Virus
FGF-β	=	Fibroblast growth factor β
FIP	=	Feline infektiöse Peritonitis
fl	=	Femtoliter
fmol	=	Femtomol
FSH	=	forward scatter high
FSL	=	forward scatter low
ggr	=	geringgradig
GM-CSF	=	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HCDA	=	human congenital dyserythropoietic anemia
HDW	=	Hämoglobinverteilungsbreite (hemoglobin distribution width)
HGB	=	Hämoglobin
hgr	=	hochgradig
HIF-1	=	hypoxia-inducible transcription factor-1
HKT	=	Hämatokrit
IBD	=	inflammatory bowel disease
i.d.R.	=	in der Regel
ICAM-4	=	erythroid intercellular adhesion molecule-4
ICSH	=	Internationales Komitee für Standardisierung in der Hämatologie (International Committee for Standardization in Haematology)
IL	=	Interleukin
intercept	=	y-Achsenabschnitt
INT-γ	=	Interferon-γ

JAK	=	Janus-Kinase
K_3-EDTA	=	Kalium-Ethylendiamintetraessigsäure
KGW	=	Körpergewicht
LMWH	=	low molecular weight heparin
m	=	männlich
MAC	=	membrane attack complex
MCH	=	Mittlerer zellulärer Hämogobingehalt (mean corpuscular hemoglobin)
MCHC	=	Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (mean corpuscular hemoglobin concentration)
MCV	=	Mittleres Erythrozytenvolumen (mean corpuscular volume)
MDS	=	myelodysplastisches Syndrom
mgr	=	mittelgradig
MIP-1α	=	Macrophage inflammatory protein-1α
mk	=	männlich-kastriert
MPS	=	mononukleäres Phagozytosesystem
MPV	=	mean platelet volume
m-RNA	=	messenger-Ribonukleinsäure
n	=	Probenzahl
NSAID	=	nicht-steroidales Antiphlogistikum
PCV	=	Mikrohämatokritwert (packed cell volume)
PDA	=	persistierender Ductus arteriosus
PCRA	=	pure red cell aplasia
r	=	Korrelationskoeffizienz
RAS	=	right angle scatter
RAS	=	*Ra*t *s*arcoma (Proto-Onkogen)
RBC	=	Erythrozytenzahl (red blood cells)
RDW	=	Erythrozytenverteilungsbreite (red cell distribution width)
#RETIS	=	absolute Retikulozytenzahl
%RETIS	=	prozentuale Retikulozytenzahl
RI	=	Retikulozytenindex
ROC-curve	=	Receiver Operating Characteristic-curve (Grenzwertoptimierungskurve)
RPI	=	Retikulozytenproduktionsindex
r_s	=	Spearman-Korrelationskoeffizienz
s	=	Standardabweichung
slope	=	Steigung
sog.	=	sogenannt
STAT	=	signal transducers and activators of transcription
T3	=	Trijodthyronin
T4	=	Thyroxin
TGF-β	=	transforming growth factor-β
TNF-α	=	tumor necrosis factor-α
TOF	=	time of flight

VCAM-1	=	vascular adhesion molecule-1
vWF	=	von Willebrand-Faktor
w	=	weiblich
wk	=	weiblich-kastriert
$\bar{x}$	=	arithmetischer Mittelwert
z.B.	=	zum Beispiel
2,3-DPG	=	2,3-Diphosphoglycerat

9. Anhang

Auf der beiliegenden CD befinden sich alle grafischen Darstellungen des Methodenvergleichs sowie jeweils eine PowerPoint-Präsentation mit den DotPlots von ADVIA® 120 und LaserCyte® für die gesunden und kranken Hunde und Katzen.

10. Literaturverzeichnis

Abbott DL, McGrath JP (1991), Evaluation of flow cytometric counting procedure for canine reticulocytes by use of thiazole orange, *Am.J.Vet.Res.* 52: 723-727

Abkowitz JL, Holly RD, Grant CK (1987), Retrovirus-induced feline pure red cell aplasia. Hematopoietic progenitors are infected with feline leukemia virus and erythroid burst-forming cells are uniquely sensitive to heterologous complement, *J.Clin.Invest.* 80: 1056-1063

Agarwal N, Prchal JT (2009), Anemia of chronic disease (anemia of inflammation), *Acta Haematol.* 122: 103-108

Al Ghazlat S (2009), Immunosuppressive therapy for canine immune-mediated hemolytic anemia, *Compend.Contin.Educ.Vet.* 31: 33-41

Al Safi S, Tashtoush B, Abdul-Razzakl K (2002), Azathioprine-induced fatal macrocytic anemia in rabbits, *Pol.J. Pharmacol.* 54: 513-516

Aldavood SJ, Keyhani P, Karegar AR, Moghadami A, Bahrami Gorgi H (2006), Comparative study on iron deficiency anemia in puppies fed maternal and non-maternal milk (abstract), *Vet.Clin.Pathol.* 35: 480-481

Andrews GA, Smith JE (2000), Iron metabolism, in *Schalm's veterinary hematology*, ed. Feldman BF, Zinkl JG, and Jain NC, Lippincott Williams & Wilkins: 129-134

Arikan S, Duru SY, Gurkan M, Agaoglu ZT, Giger U (2003), Blood type A and B frequencies in Turkish Van and Angora cats in Turkey, *J.Vet.Med.A.Physiol.Pathol.Clin.Med.* 50: 303-306

Arikan S, Gurkan M, Ozaytekin E, Dodurka T, Giger U (2006), Frequencies of blood type A, B and AB in non-pedigree domestic cats in Turkey, *J.Small Anim.Pract.* 47: 10-13

Aslan K, Bozdemir H, Unsal C, Guvenc B (2008), The effect of antiepileptic drugs on vitamin B12 metabolism, *Int.J.Lab.Hematol.* 30: 26-35

Balch A, Mackin A (2007a), Canine immune-mediated hemolytic anemia: pathophysiology, clinical signs, and diagnosis, *Compend.Contin.Educ.Vet.* 29: 217-225

Balch A, Mackin A (2007b), Canine immune-mediated hemolytic anemia: treatment and prognosis, *Compend.Contin.Educ.Vet.* 29: 230-238

Barrs VR, Giger U, Wilson B, Chan CT, Lingard AE, Tran L, Seng A, Canfield PJ, Beatty JA (2009), Erythrocytic pyruvate kinase deficiency and AB blood types in Australian Abyssinian and Somali cats, *Aust.Vet.J.* 87: 39-44

Bauer N, Balzer HJ, Thure S, Moritz A (2008), Prevalence of feline haemotropic mycoplasmas in convenience samples of cats in Germany, *J.Feline.Med.Surg.* 10: 252-258

Becker M. A comparative study of seven in-house and two laboratory hematology instruments. 2007. Universität Gießen.
Ref Type: Thesis/Dissertation

Bessman JD, Johnson RK (1975), Erythrocyte volume distribution in normal and abnormal subjects, *Blood* 46: 369-379

Bienzle D, Stanton JB, Embry JM, Bush SE, Mahaffey EA (2000), Evaluation of an in-house centrifugal hematology analyzer for use in veterinary practice, *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 217: 1195-1200

Bland JM, Altman DG (1999), Measuring agreement in method comparison studies, *Stat.Methods Med.Res.* 8: 135-160

Bobade PA, Nash AS, Rogerson P (1988), Feline haemobartonellosis: clinical, haematological and pathological studies in natural infections and the relationship to infection with feline leukaemia virus, *Vet.Rec.* 122: 32-36

Bonfanti U, Comazzi S, Paltrinieri S, Bertazzolo W (2004), Stomatocytosis in 7 related Standard Schnauzers, *Vet.Clin.Pathol.* 33: 234-239

Bovy C, Gothot A, Krzesinski JM, Beguin Y (2005), Mature erythrocyte indices: new markers of iron availability, *Haematologica* 90: 549-551

Brady CA, Otto CM, Van Winkle TJ, King LG (2000), Severe sepsis in cats: 29 cases (1986-1998), *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 217: 531-535

Bunch SE, Easley JR, Cullen JM (1990), Hematologic values and plasma and tissue folate concentrations in dogs given phenytoin on a long-term basis, *Am.J.Vet.Res.* 51: 1865-1868

Bunch SE, Jordan HL, Sellon RK, Cullen JM, Smith JE (1995), Characterization of iron status in young dogs with portosystemic shunt, *Am.J.Vet.Res.* 56: 853-858

Bunch Seal (1992), Iron status in 12 dogs with congenital portosystemic shunts, *J.Vet.Intern.Med.* 6: 126 (abstract)

Burgess K, Moore A, Rand W, Cotter SM (2000), Treatment of immune-mediated hemolytic anemia in dogs with cyclophosphamide, *J.Vet.Intern.Med.* 14: 456-462

Buttarello M, Bulian P, Farina G, Temporin V, Toffolo L, Trabuio E, Rizzotti P (2001), Flow cytometric reticulocyte counting. Parallel evaluation of five fully automated analyzers: an NCCLS-ICSH approach, *Am.J.Clin.Pathol.* 115: 100-111

Caccio SM, Antunovic B, Moretti A, Mangili V, Marinculic A, Baric RR, Slemenda SB, Pieniazek NJ (2002), Molecular characterisation of Babesia canis canis and Babesia canis vogeli from naturally infected European dogs, *Vet.Parasitol.* 106: 285-292

Caldin M, Carli E, Furlanello T, Solano-Gallego L, Tasca S, Patron C, Lubas G (2005), A retrospective study of 60 cases of eccentrocytosis in the dog, *Vet.Clin.Pathol.* 34: 224-231

Canfield PJ, Watson AD (1989), Investigations of bone marrow dyscrasia in a poodle with macrocytosis, *J.Comp.Pathol.* 101: 269-278

Car BD (2000), Erythropoiesis and erythrokinetics, in *Schalm's veterinary hematology*, ed. Feldman BF, Zinkl JG, and Jain NC, Lippincott Williams & Wilkins: 105-109

Carmichael KP, Bienzle D, McDonnell JJ (2002), Feline leukemia virus-associated myelopathy in cats, *Vet.Pathol.* 39: 536-545

Carr AP, Panciera DL, Kidd L (2002), Prognostic factors for mortality and thromboembolism in canine immune-mediated hemolytic anemia: a retrospective study of 72 dogs, *J.Vet.Intern.Med.* 16: 504-509

Carrade DD, Foley JE, Borjesson DL, Sykes JE (2009), Canine Granulocytic Anaplasmosis: A Review, *J.Vet.Intern.Med.*

Chasis JA, Mohandas N (2008), Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis, *Blood* 112: 470-478

Christopher MM (2000), *Disorders of feline red blood cells. In Bonagura JD, editor: Kirk's current veterinary therapy XIII, WB Saunders.*: 421-424

Cowgill ES, Neel JA, Grindem CB (2003), Clinical application of reticulocyte counts in dogs and cats, *Vet.Clin.North Am.Small Anim.Pract.* 33: 1223-44

d'Onofrio G, Kim YR, Schulze S, Lorentz T, Dorner K, Goossens W, Zini G, Tommasi M, Kendall R, Scott CS (1997), Evaluation of the Abbott Cell Dyn 4000 automated fluorescent reticulocyte measurements: comparison with manual, FACScan and Sysmex R1000 methods, *Clin.Lab.Haematol.* 19: 253-260

Da Costa L, Mohandas N, Sorette M, Grange MJ, Tchernia G, Cynober T (2001), Temporal differences in membrane loss lead to distinct reticulocyte features in hereditary spherocytosis and in immune hemolytic anemia, *Blood* 98: 2894-2899

Dean GA, Groshek PM, Mullins JI, Hoover EA (1992), Hematopoietic target cells of anemogenic subgroup C versus nonanemogenic subgroup A feline leukemia virus, *J.Virol.* 66: 5561-5568

Degen M (1987), Pseudohyperkalemia in Akitas, *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 190: 541-543

DeNicola DB, Matthews JA, Fernandes PJ, Frye MB (2006), Comparison of reticulocyte counts to mean corpuscular volume and mean corpuscular hemoglobin concentration in anemic dogs, *Proceedings 12th Congress of the International Society of Animal clinical Biochemistry;May 22-26, 2006;Istanbul, Turkey (abstract)*

Desnoyers M, Hebert P (1995), Heinz body anemia in a dog following possible naphthalene ingestion, *Vet.Clin.Pathol.* 24: 124-125

Dunn M, Charland V, Thorneloe, C (2004), The use of low molecular weight heparin in 6 dogs, *J.Vet.Intern.Med.* 18(3): 389 (abstract)

Duval D, Giger U (1996), Vaccine-associated immune-mediated hemolytic anemia in the dog, *J.Vet.Intern.Med.* 10: 290-295

Erslev AJ (1997), Clinical erythrokinetics: a critical review, *Blood Rev.* 11: 160-167

Evans GO, Fagg R (1994), Reticulocyte counts in canine and rat blood made by flow cytometry, *J.Comp.Pathol.* 111: 107-111

Fandrey J (2008), Erythropoiesis--once more HIF!, *Blood* 112: 931-932

Feldman BF (2005), Nonregenerative anemia, in *Textbook of veterinary internal medicine*, ed. Ettinger SJ and Feldman BF, Elsevier Saunders:1908-1917

Ferrell EA, Graham JP, Hanel R, Randell S, Farese JP, Castleman WL (2003), Simultaneous congenital and acquired extrahepatic portosystemic shunts in two dogs, *Vet.Radiol.Ultrasound* 44: 38-42

Fisher JW (2003), Erythropoietin: physiology and pharmacology update, *Exp.Biol.Med.(Maywood)* 228: 1-14

Forrester SD, Moreland KJ (1989), Hypophosphatemia. Causes and clinical consequences, *J.Vet.Intern.Med.* 3: 149-159

Fry MM, Kirk CA (2006), Reticulocyte indices in a canine model of nutritional iron deficiency, *Vet.Clin.Pathol.* 35: 172-181

Fulton R, Weiser MG, Freshman JL, Gasper PW, Fettman MJ (1988), Electronic and morphologic characterization of erythrocytes of an adult cat with iron deficiency anemia, *Vet.Pathol.* 25: 521-523

Furlanello T, Fiorio F, Caldin M, Lubas G, Solano-Gallego L (2005), Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form Babesia from dogs of northeastern Italy, *Vet.Parasitol.* 134: 77-85

Furlanello T, Tasca S, Caldin M, Carli E, Patron C, Tranquillo M, Lubas G, Solano-Gallego L (2006), Artifactual changes in canine blood following storage, detected using the ADVIA 120 hematology analyzer, *Vet.Clin.Pathol.* 35: 42-46

Fyfe J, Giger U, Hall C, Jezyk P, Klumpp S, Levine J, Patterson D (1991), Inherited selective intestinal cobalamin malabsorption and cobalamin deficiency in dogs., *Pediatric Res.* 29(1): 24-31

Fyfe Jeal (1989), Inherited selective malabsorption of vitamin B12 in giant schnauzers, *J.Am.Anim.Hosp.Assoc.* 25: 533-539

Geffre A, Braun JP, Trumel C, Concordet D (2009a), Estimation of reference intervals from small samples: an example using canine plasma creatinine, *Vet.Clin.Pathol.:*1-8

Geffre A, Friedrichs K, Harr K, Concordet D, Trumel C, Braun JP (2009b), Reference values: a review, *Vet.Clin.Pathol.* 38: 288-298

Geminard C, de Gassart A, Vidal M (2002), Reticulocyte maturation: mitoptosis and exosome release, *Biocell* 26: 205-215

George JW, Rideout BA, Griffey SM, Pedersen NC (2002), Effect of preexisting FeLV infection or FeLV and feline immunodeficiency virus coinfection on pathogenicity of the small variant of Haemobartonella felis in cats, *Am.J.Vet.Res.* 63: 1172-1178

Gerber K, Harvey JW, D'Agorne S, Wood J, Giger U (2009), Hemolysis, myopathy, and cardiac disease associated with hereditary phosphofructokinase deficiency in two Whippets, *Vet.Clin.Pathol.* 38: 46-51

Giger U (2005), Regenerative anemias caused by blood loss or hemolysis, in *Textbook of veterinary internal medicine*, ed. Ettinger SJ and Feldman EC, Elsevier Saunders: 1886-1907

Giger U, Bucheler J, Patterson DF (1991), Frequency and inheritance of A and B blood types in feline breeds of the United States, *J.Hered.* 82: 15-20

Giger U, Harvey JW, Yamaguchi RA, McNulty PK, Chiapella A, Beutler E (1985), Inherited phosphofructokinase deficiency in dogs with hyperventilation-induced hemolysis: increased in vitro and in vivo alkaline fragility of erythrocytes, *Blood* 65: 345-351

Giger U, Reilly MP, Asakura T, Baldwin CJ, Harvey JW (1986), Autosomal recessive inherited phosphofructokinase deficiency in English springer spaniel dogs, *Anim.Genet.* 17: 15-23

Giger U, Smith BF, Woods CB, Patterson DF, Stedman H (1992), Inherited phosphofructokinase deficiency in an American cocker spaniel, *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 201: 1569-1571

Gleich S, Hartmann K (2009), Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virus-infected cats, *J.Vet.Intern.Med.* 23: 552-558

Goodfellow M, Papasouliotis K, Cue S, Crawford E, Hall E (2008), Effect of storage on microcytosis observed in dogs with portosystemic vascular anomalies, *Res.Vet.Sci.* 84: 490-493

Gookin JL, Bunch SE, Rush LJ, Grindem CB (1998), Evaluation of microcytosis in 18 Shibas, *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 212: 1258-1259

Granick JL, Armstrong PJ, Bender JB (2009), Anaplasma phagocytophilum infection in dogs: 34 cases (2000-2007), *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 234: 1559-1565

Grondin TM, Wilkerson MJ, Lurye JC, Stockham SL (2006), Blood smear from a cat: features to "dys"cover, *Vet.Clin.Pathol.* 35: 463-466

Grundy SA, Barton C (2001), Influence of drug treatment on survival of dogs with immune-mediated hemolytic anemia: 88 cases (1989-1999), *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 218: 543-546

Gurnee CM, Drobatz KJ (2007), Zinc intoxication in dogs: 19 cases (1991-2003), *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 230: 1174-1179

Han AP, Yu C, Lu L, Fujiwara Y, Browne C, Chin G, Fleming M, Leboulch P, Orkin SH, Chen JJ (2001), Heme-regulated eIF2alpha kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency, *EMBO J.* 20: 6909-6918

Harris N, Jou JM, Devoto G, Lotz J, Pappas J, Wranovics D, Wilkinson M, Fletcher SR, Kratz A (2005a), Performance evaluation of the ADVIA 2120 hematology analyzer: an international multicenter clinical trial, *Lab.Hematol.* 11: 62-70

Harris N, Kunicka J, Kratz A (2005b), The ADVIA 2120 hematology system: flow cytometry-based analysis of blood and body fluids in the routine hematology laboratory, *Lab.Hematol.* 11: 47-61

Harrus S, Klement E, Aroch I, Stein T, Bark H, Lavy E, Mazaki-Tovi M, Baneth G (2002), Retrospective study of 46 cases of feline haemobartonellosis in Israel and their relationships with FeLV and FIV infections, *Vet.Rec.* 151: 82-85

Harvey JW (2001), *Atlas of veterinary hematology: Blood and bone marrow of domestic animals*, W.B. Saunders Company

Harvey JW (2006), Pathogenesis, laboratory diagnosis, and clinical implications of erythrocyte enzyme deficiencies in dogs, cats, and horses, *Vet.Clin.Pathol.* 35: 144-156

Harvey JW (2008a), Iron metabolism and its disorders, in *Clinical biochemistry of domestic animals*, ed. Kaneko JJ, Harvey JW, and Bruss ML, Elsevier LTD, Oxford: 259-285

Harvey JW (2008b), The erythrocyte: physiology, metabolism and biochemical disorders, in *Clinical biochemistry of domestic animals*, ed. Kaneko JJ, Harvey JW, and Bruss ML, Elsevier LTD, Oxford: 173-240

Hisasue M, Nishigaki K, Katae H, Yuri K, Mizuno T, Fujino Y, Setoguchi A, Hasegawa A, Watari T, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H (2000), Clonality analysis of various hematopoietic disorders in cats naturally infected with feline leukemia virus, *J.Vet.Med.Sci.* 62: 1059-1065

Hisasue M, Okayama H, Okayama T, Suzuki T, Mizuno T, Fujino Y, Naganobu K, Hasegawa A, Watari T, Matsuki N, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H (2001), Hematologic abnormalities and outcome of 16 cats with myelodysplastic syndromes, *J.Vet.Intern.Med.* 15: 471-477

Holland CT, Canfield PJ, Watson AD, Allan GS (1991), Dyserythropoiesis, polymyopathy, and cardiac disease in three related English springer spaniels, *J.Vet.Intern.Med.* 5: 151-159

Idexx Laboratories. LaserCyte - Background / System Overview. 2004

Idexx Laboratories (2008), *IDEXX LaserCyte hematology analyzer: Case study book and technical guide*

Jain NC (1993), *Essentials of veterinary hematology*, Lea und Febiger, Philadelphia

Jensen AL, Kjelgaard-Hansen M (2006), Method comparison in the clinical laboratory, *Vet.Clin.Pathol.* 35: 276-286

Jones D, Gruffydd-Jones T (1991), The haematological consequences of immune-mediated anaemia in the dog., *Comparative Haematology International* 1: 83-90

Jordan HL, Cohn LA, Armstrong PJ (1994), Disseminated Mycobacterium avium complex infection in three Siamese cats, *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 204: 90-93

Kaferle J, Strzoda CE (2009), Evaluation of macrocytosis, *Am.Fam.Physician* 79: 203-208

Kim CJ, Park KI, Inoue H, Yoshida T, Yoshiki T, Tomoyoshi T, Abe H, Kodama M, Sako H, Nakane Y (1998), Azathioprine-induced megaloblastic anemia with pancytopenia 22 years after living-related renal transplantation, *Int.J.Urol.* 5: 100-102

Köck SR. Eine retrospektive Anämie-Kasuistik beim Hund (1991-1996),1998, Universität München. Ref Type: Thesis/Dissertation

Kohn B, Fumi C (2008), Clinical course of pyruvate kinase deficiency in Abyssinian and Somali cats, *J.Feline.Med.Surg.* 10: 145-153

Kohn B, Galke D, Beelitz P, Pfister K (2008), Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs, *J.Vet.Intern.Med.* 22: 1289-1295

Kohn B, Goldschmidt MH, Hohenhaus AE, Giger U (2000), Anemia, splenomegaly, and increased osmotic fragility of erythrocytes in Abyssinian and Somali cats, *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 217: 1483-1491

Kohn B, Weingart C, Eckmann V, Ottenjann M, Leibold W (2006), Primary immune-mediated hemolytic anemia in 19 cats: diagnosis, therapy, and outcome (1998-2004), *J.Vet.Intern.Med.* 20: 159-166

Kutter D, Mijanovic-Lasic D, Thoma J, Kutter P (2003), Erythrocyte hyperchromia measured by flow cytometry: a marker for body iron overload?, *J.Lab.Med.* 27(1/2): 72

Kutter D (2005), Hereditary spherocytosis is more frequent than expected: what to tell the patient?, *Bull.Soc.Sci.Med.Grand.Duche.Luxemb.* 7-22

Laflamme DP, Mahaffey EA, Allen SW, Twedt DC, Prasse KW, Huber TL (1994), Microcytosis and iron status in dogs with surgically induced portosystemic shunts, *J.Vet.Intern.Med.* 8: 212-216

Lee G, Lo A, Short SA, Mankelow TJ, Spring F, Parsons SF, Yazdanbakhsh K, Mohandas N, Anstee DJ, Chasis JA (2006), Targeted gene deletion demonstrates that the cell adhesion molecule ICAM-4 is critical for erythroblastic island formation, *Blood* 108: 2064-2071

Lee SH, Kim KA, Park YG, Seong IW, Kim MJ, Lee YJ (2000), Identification and partial characterization of a novel hemolysin from Leptospira interrogans serovar lai, *Gene* 254: 19-28

Levy J, Bunch S (1992), Congenital portosystemic vascular shunts in cats, *J.Vet.Intern.Med.* 6: 126 (abstract)

Linenberger ML, Abkowitz JL (1995), Haematological disorders associated with feline retrovirus infections, *Baillieres Clin.Haematol.* 8: 73-112

Lippi G, Salvagno GL, Solero GP, Guidi GC (2005), The influence of the tournique time on hematological testing for antidoping purposes, *Int.J.Sports Med.* 26: 1-4

Lunsford K, Mackin A, Langston C, Brooks M (2005), Pharmacokinetics of the biological effects of subcutaneous enoxaparin in dogs, *J.Vet.Intern.Med.* 19(3): 400 (abstract)

Madewell BR, Feldman BF (1980), Characterization of anemias associated with neoplasia in small animals, *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 176: 419-425

Maede Y, Amano Y, Nishida A, Murase T, Sasaki A, Inaba M (1991), Hereditary high-potassium erythrocytes with high Na, K-ATPase activity in Japanese shiba dogs, *Res.Vet.Sci.* 50: 123-125

Mansfield CS, Clark P (2005), Pyruvate kinase deficiency in a Somali cat in Australia, *Aust.Vet.J.* 83: 483-485

Marchetti V, Benetti C, Citi S, Taccini V (2005), Paraneoplastic hypereosinophilia in a dog with intestinal T-cell lymphoma, *Vet.Clin.Pathol.* 34: 259-263

Mason N, Duval D, Shofer FS, Giger U (2003), Cyclophosphamide exerts no beneficial effect over prednisone alone in the initial treatment of acute immune-mediated hemolytic anemia in dogs: a randomized controlled clinical trial, *J.Vet.Intern.Med.* 17: 206-212

McManus PM, Craig LE (2001), Correlation between leukocytosis and necropsy findings in dogs with immune-mediated hemolytic anemia: 34 cases (1994-1999), *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 218: 1308-1313

Means RT, Jr. (2004), Hepcidin and anaemia, *Blood Rev.* 18: 219-225

Medaille C, Briend-Marchal A, Braun JP (2006), Stability of selected hematology variables in canine blood kept at room temperature in EDTA for 24 and 48 hours, *Vet.Clin.Pathol.* 35: 18-23

Metzger F, Rebar A (2004), Symposium on a three-minute peripheral blood film evaluation, *Veterinary Medicine* December: 1-16

Meyer DJ, Harvey JW (1994), Hematologic changes associated with serum and hepatic iron alterations in dogs with congenital portosystemic vascular anomalies, *J.Vet.Intern.Med.* 8: 55-56

Meyer K. Softwareadaptation und Evaluation des ADVIA 120 bei der Tierart Katze, 2005. Universität Gießen.
Ref Type: Thesis/Dissertation

Miller AG, Morley PS, Rao S, Avery AC, Lana SE, Olver CS (2009), Anemia is associated with decreased survival time in dogs with lymphoma, *J.Vet.Intern.Med.* 23: 116-122

Miller SA, Hohenhaus AE, Hale AS (2004), Case-control study of blood type, breed, sex, and bacteremia in dogs with immune-mediated hemolytic anemia, *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 224: 232-235

Moritz A. Der Einsatz lasergestützter Multiparameter-Hämatologiesysteme in der Veterinärmedizin. Habilitationsschrift Gießen. 2000.

Moritz A, Fickenscher Y, Meyer K, Failing K, Weiss DJ (2004), Canine and feline hematology reference values for the ADVIA 120 hematology system, *Vet.Clin.Pathol.* 33: 32-38

Moritz A, Schimke E, Teske E, Rutteman G, Nagel M-L (2006), *Erkrankungen des hämatopoetischen Systems. In: Klink der Hundekrankheiten (Grünbaum/Schimke)*, Enke: 1035-1080

Myers S, Giger U (1995), Macrocytic anemia caused by naturally-occuring folate deficiency in the cat, *Vet.Pathol.* 32: 547

Neiger R, Hadley J, Pfeiffer DU (2002), Differentiation of dogs with regenerative and non-regenerative anaemia on the basis of their red cell distribution width and mean corpuscular volume, *Vet.Rec.* 150: 431-434

Nemeth E, Ganz T (2009), The role of hepcidin in iron metabolism, *Acta Haematol.* 122: 78-86

Neuerer FF. Evaluation des vollautomatischen Hämatologiegerätes CELL-DYN 3500 im klinischen Einsatz bei Hund und Katze, 2005. Universität München.
Ref Type: Thesis/Dissertation

Novinger MS, Sullivan PS, McDonald TP (1996), Determination of the lifespan of erythrocytes from greyhounds, using an in vitro biotinylation technique, *Am.J.Vet.Res.* 57: 739-742

Onions D, Jarrett O, Testa N, Frassoni F, Toth S (1982), Selective effect of feline leukaemia virus on early erythroid precursors, *Nature* 296: 156-158

Ottenjann M, Weingart C, Arndt G, Kohn B (2006), Characterization of the anemia of inflammatory disease in cats with abscesses, pyothorax, or fat necrosis, *J.Vet.Intern.Med.* 20: 1143-1150

Passing H, Bablok (1983), A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I, *J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* 21: 709-720

Perkins PC, Grindem CB (1995), Evaluation of six cytometric methods for reticulocyte enumeration and differentiation in the cat, *Vet.Clin.Pathol.* 24: 37-43

Perkins PC, Grindem CB, Cullins LD (1995), Flow cytometric analysis of punctate and aggregate reticulocyte responses in phlebotomized cats, *Am.J.Vet.Res.* 56: 1564-1569

Petrie A, Watson P (2006), *Statistics for veterinary and animals science. Second edition*, Blackwell Publishing

Piek CJ, Junius G, Dekker A, Schrauwen E, Slappendel RJ, Teske E (2008), Idiopathic immune-mediated hemolytic anemia: treatment outcome and prognostic factors in 149 dogs, *J.Vet.Intern.Med.* 22: 366-373

Pinkerton PH, Fletch SM, Brueckner PJ, Miller DR (1974), Hereditary stomatocytosis with hemolytic anemia in the dog, *Blood* 44: 557-567

Pschyrembel W (2007), *Klinisches Wörterbuch, 261. Auflage*, de Gruyter

Quigley JG, Burns CC, Anderson MM, Lynch ED, Sabo KM, Overbaugh J, Abkowitz JL (2000), Cloning of the cellular receptor for feline leukemia virus subgroup C (FeLV-C), a retrovirus that induces red cell aplasia, *Blood* 95: 1093-1099

Quigley JG, Yang Z, Worthington MT, Phillips JD, Sabo KM, Sabath DE, Berg CL, Sassa S, Wood BL, Abkowitz JL (2004), Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis, *Cell* 118: 757-766

Rance KS, Pullman WA (2005), The MCV in health and disease., *Proceedings 23rd ACVIM Forum, Baltimore, MD*

Raskin RE, Krehbiel JD (1985), Myelodysplastic changes in a cat with myelomonocytic leukemia, *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 187: 171-174

Reagan WJ, Vap LM, Weiser MG (1992), Flow cytometric analysis of feline reticulocytes, *Vet.Pathol.* 29: 503-508

Riedel N, Hoover EA, Gasper PW, Nicolson MO, Mullins JI (1986), Molecular analysis and pathogenesis of the feline aplastic anemia retrovirus, feline leukemia virus C-Sarma, *J.Virol.* 60: 242-250

Riley RS, Ben Ezra JM, Goel R, Tidwell A (2001), Reticulocytes and reticulocyte enumeration, *J.Clin.Lab.Anal.* 15: 267-294

Ristic JM, Stidworthy MF (2002), Two cases of severe iron-deficiency anaemia due to inflammatory bowel disease in the dog, *J.Small.Anim.Pract.* 43: 80-83

Romanelli F, Empey K, Pomeroy C (2002), Macrocytosis as an indicator of medication (zidovudine) adherence in patients with HIV infection, *AIDS Patient.Care STDS.* 16: 405-411

Rutgers HC, Haywood S, Kelly DF (1993), Idiopathic hepatic fibrosis in 15 dogs, *Vet.Rec.* 133: 115-118

Sassnau R (2007), Veränderungen des Blutbildes bei Siberian Huskys in Abhängigkeit vom Trainingszustand, *Tierärztliche Praxis* 35(K): 375-380

Schallier D, Trullemans F, Fontaine C, Decoster L, De Greve J (2009), Tyrosine kinase inhibitor-induced macrocytosis, *Anticancer Res.* 29: 5225-5228

Scott-Moncrieff JC, Treadwell NG, McCullough SM, Brooks MB (2001), Hemostatic abnormalities in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia, *J.Am.Anim.Hosp.Assoc.* 37: 220-227

Seguin MA, Bunch SE (2001), Iatrogenic copper deficiency associated with long-term copper chelation for treatment of copper storage disease in a Bedlington Terrier, *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 218: 1593-7, 1580

Sellon RK, Menard MM, Meuten DJ, Lengerich EJ, Steurer FJ, Breitschwerdt EB (1993), Endemic visceral leishmaniasis in a dog from Texas, *J.Vet.Intern.Med.* 7: 16-19

Sellon RK, Pullman WA (2005), The MCV in health and disease., *Proceedings 23rd ACVIM Forum, Baltimore, MD*

Seno S, Miyahara M, Asakura H, Ochi O, Matsuoka K, Toyama T, Abbott DL (1964), Macrocytosis resulting from early denucleation of erythroid precursors, *Blood* 24: 582-593

Shelton GH, Linenberger ML, Grant CK, Abkowitz JL (1990), Hematologic manifestations of feline immunodeficiency virus infection, *Blood* 76: 1104-1109

Shiel RE, Brennan SF, O'Rourke LG, McCullough M, Mooney CT (2007), Hematologic values in young pretraining healthy Greyhounds, *Vet.Clin.Pathol.* 36: 274-277

Shimoda T, Shiranaga N, Mashita T, Hasegawa A (2000), A hematological study on thirteen cats with myelodysplastic syndrome, *J.Vet.Med.Sci.* 62: 59-64

Siekmeier R, Bierlich A, Jaross W (2000), Determination of reticulocytes: three methods compared, *Clin.Chem.Lab.Med.* 38: 245-249

Simpson KW, Fyfe J, Cornetta A, Sachs A, Strauss-Ayali D, Lamb SV, Reimers TJ (2001), Subnormal concentrations of serum cobalamin (vitamin B12) in cats with gastrointestinal disease, *J.Vet.Intern.Med.* 15: 26-32

Simpson KW, Meyer DJ, Boswood A, White RN, Maskell IE (1997), Iron status and erythrocyte volume in dogs with congenital portosystemic vascular anomalies, *J.Vet.Intern.Med.* 11: 14-19

Skelly BJ, Wallace M, Rajpurohit YR, Wang P, Giger U (1999), Identification of a 6 base pair insertion in West Highland White Terriers with erythrocyte pyruvate kinase deficiency, *Am.J.Vet.Res.* 60: 1169-1172

Smith et al (1991), The molecular basis of canine muscle phosphofructokinase deficiency ist a point mutation., *Am.J.Hum.Genet.* 49: 518

Solano-Gallego L, Trotta M, Carli E, Carcy B, Caldin M, Furlanello T (2008), Babesia canis canis and Babesia canis vogeli clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease, *Vet.Parasitol.* 157: 211-221

Sontas HB, Dokuzeylu B, Turna O, Ekici H (2009), Estrogen-induced myelotoxicity in dogs: A review, *Can.Vet.J.* 50: 1054-1058

Squires R (1993), Differential diagnosis of anemia in dogs., *In Practise* January: 29-36

Steinberg JD, Olver CS (2005), Hematologic and biochemical abnormalities indicating iron deficiency are associated with decreased reticulocyte hemoglobin content (CHr) and reticulocyte volume (rMCV) in dogs, *Vet.Clin.Pathol.* 34: 23-27

Stockham SL, Scott MA (2008), *Fundamentals of veterinary clinical pathology*, Blackwell Publishing

Stokol T, Blue JT (1999), Pure red cell aplasia in cats: 9 cases (1989-1997), *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 214: 75-79

Stokol T, Blue JT, French TW (2000), Idiopathic pure red cell aplasia and nonregenerative immune-mediated anemia in dogs: 43 cases (1988-1999), *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 216: 1429-1436

Tasker S (2006), Current concepts in feline haemobartonellosis, *In Practice* 28: 136-141

Toll J, Aronsohn M (2003), Prospective evaluation of medical therapy with or without splenectomy for the treatment of severe immune mediated hemolytiv anemia, *J.Vet.Intern.Med.* 17(3): 383 (abstract)

Tsivkin R, Saito E, Kafantaris V (2005), Macrocytosis associated with divalproex treatment, *J.Child Adolesc.Psychopharmacol.* 15: 1011-1014

Tvedten H, Scott M, Boon G (2000), *Interpretation of cytograms and histograms of erythrocytes, leukocytes and platelets. In Bonagura JD, editor: Kirk's current veterinary therapy XIII, WB Saunders*: 381-390

Tvedten H, Weiss DJ (2000), Classification and laboratory evaluation of anemia, in *Schalm's veterinary hematology*, ed. Feldman BF, Zinkl JG, and Jain NC, Lippincott Williams & Wilkins: 143-150

Tvedten H, Holan K (1996), What is your diagnosis?, *Vet.Clin.Pathol.* 25 (4): 148-149

Tvedten HW (1999), Morphologic classification of anemia, *Vet.Clin.Pathol.* 28: 80-82

Villiers E (2007), *Disorders of erythrocytes. In: BSAVA Manual of canine and feline clinical pathology (Villiers/Blackwood)*: 33-38

Villiers EJ, Dunn JK (1999), Clinicopathological features of seven cases of canine myelofibrosis and the possible relationship between the histological findings and prognosis, *Vet.Rec.* 145: 222-228

Wallner SF, Kurnick JE, Ward HP, Vautrin R, Alfrey AC (1976), The anemia of chronic renal failure and chronic diseases: in vitro studies of erythropoiesis, *Blood* 47: 561-569

Watson AD, Canfield PJ (2000), Nutritional deficiency anemias, in *Schalm's veterinary hematology*, ed. Feldman BF, Zinkl JG, and Jain NC, Lippincott Williams & Wilkins: 190-195

Weinkle T, Center S, Randolph J, Warner K, Barr S, Erb H (2005), Evaluation of prognostic factors, survival rates and treatment protocols for immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 151 cases (1993-2002), *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 226(11): 1869-1880

Weiser MG, Kociba GJ (1982), Persistent macrocytosis assessed by erythrocyte subpopulation analysis following erythrocyte regeneration in cats, *Blood* 60: 295-303

Weiser MG, Kociba GJ (1983a), Erythrocyte macrocytosis in feline leukemia virus associated anemia, *Vet.Pathol.* 20: 687-697

Weiser MG, Kociba GJ (1983b), Sequential changes in erythrocyte volume distribution and microcytosis associated with iron deficiency in kittens, *Vet.Pathol.* 20: 1-12

Weiss DJ (2002a), Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology, *Vet.Clin.Pathol.* 31: 72-82

Weiss DJ (2002b), Primary pure red cell aplasia in dogs: 13 cases (1996-2000), *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 221: 93-95

Weiss DJ (2005a), Bone marrow necrosis in dogs: 34 cases (1996-2004), *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 227: 263-267

Weiss DJ (2005b), Differentiating benign and malignant causes of lymphocytosis in feline bone marrow, *J.Vet.Intern.Med.* 19: 855-859

Weiss DJ (2005c), Recognition and classification of dysmyelopoiesis in the dog: a review, *J.Vet.Intern.Med.* 19: 147-154

Weiss DJ (2005d), Sideroblastic anemia in 7 dogs (1996-2002), *J.Vet.Intern.Med.* 19: 325-328

Weiss DJ (2006a), A retrospective study of the incidence and the classification of bone marrow disorders in the dog at a veterinary teaching hospital (1996-2004), *J.Vet.Intern.Med.* 20: 955-961

Weiss DJ (2006b), Evaluation of dysmyelopoiesis in cats: 34 cases (1996-2005), *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 228: 893-897

Weiss DJ (2008), Bone marrow pathology in dogs and cats with non-regenerative immune-mediated haemolytic anaemia and pure red cell aplasia, *J.Comp.Pathol.* 138: 46-53

Weiss DJ (2009), *Nonregenerative Anemias. In Bonagura JD: Kirk's current veterinary therapy XIV, WB Saunders*: 272-276

Weiss DJ (2010), Myelodysplastic syndromes, in *Schalm's veterinary Haematology*, ed. Weiss DJ and Wardrop J: 467-474

Weiss DJ, Aird B (2001), Cytologic evaluation of primary and secondary myelodysplastic syndromes in the dog, *Vet.Clin.Pathol.* 30: 67-75

Weiss DJ, Brazzell JL (2006), Detection of activated platelets in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia, *J.Vet.Intern.Med.* 20: 682-686

Weiss DJ, Smith SA (2000), Primary myelodysplastic syndromes of dogs: a report of 12 cases, *J.Vet.Intern.Med.* 14: 491-494

Weiss DJ, Smith SA (2002), A retrospective study of 19 cases of canine myelofibrosis, *J.Vet.Intern.Med.* 16: 174-178

Weiss DJ, Tvedten H (2006), *Veränderungen des roten Blutbilds. In: Labordiagnostik in der Kleintierpraxis (Willard/Tvedten)*, Elsevier Urban & Fischer: 43-72

Welles EG, Hall AS, Carpenter DM (2009), Canine complete blood counts: a comparison of four in-office instruments with the ADVIA 120 and manual differential counts, *Vet.Clin.Pathol.* 38: 20-29

Wenger-Riggenbach B. Evaluation of the LaserCyte: an in-house haematology analyzer for dogs and cats. Dissertation Zürich. 2006.

Westfall DS, Jensen WA, Reagan WJ, Radecki SV, Lappin MR (2001), Inoculation of two genotypes of Hemobartonella felis (California and Ohio variants) to induce infection in cats and the response to treatment with azithromycin, *Am.J.Vet.Res.* 62: 687-691

Westgard JO (2003), *Basic method validation. Second edition*

Whelan M, Rozanski E, O'Toole T, Crawford S, Holms J, Cotter S (2006), Use of the canine hemolytic anemia objective score (CHAOS) to predict survival in dogs with immune-mediated hemoytic anemia, *J.Vet.Intern.Med.* 20(3): 714 (abstract)

Willms A, Böckel K, Linke J, Müller J, Werner H (2009), Zinkinduzierte Anämie nach Fremdkörperaufnahme beim Hund. Ein Fallbericht, *Tierärztliche Praxis Kleintiere* 37: 347-350

Yates RW, Weller RE, Feldman BF (1984), Myeloproliferative disease in a cat, *Mod.Vet.Pract.* 65: 753-757

Zazgornik J (1997), Azathioprine induced macrocytosis and red cell aplasia in renal transplant patients, *Nephrol.Dial.Transplant.* 12: 628

Zygner W, Gojska O, Rapacka G, Jaros D, Wedrychowicz H (2007), Hematological changes during the course of canine babesiosis caused by large Babesia in domestic dogs in Warsaw (Poland), *Vet.Parasitol.* 145: 146-151

11. Danksagung

Diese Studie wurde durch IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, finanziell unterstützt.

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Andreas Moritz für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Begleitung und die persönliche Begeisterung für das Fachgebiet.

Bei Dr. Natali Bauer möchte ich mich für die „fremdsprachliche“ Hilfe und bei Dr. Klaus Failing von der Arbeitsgruppe Biomathematik für die Beantwortung so mancher statistischer Frage bedanken.

Ein großes Dankeschön an Dr. Martina Stirn für die Planung, die tatkräftige Unterstützung und Motivation v.a. in der Anfangsphase der Arbeit.

Für die unersetzliche Hilfe bei allen Fragen rund um Technik und Computer bedanke ich mich bei Hartmut Kovács.

Ich möchte allen Kolleginnen und Kollegen an der Klinik für Kleintiere, Innere Medizin der JLU Gießen, danken, die beim Sammeln der Blutproben geholfen haben und mich mit Rat und Tat unterstützt haben. Besonderen Dank haben alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter im Zentrallabor für die praktische Hilfe und das Ertragen der „LaserCyte-Musik“ verdient.

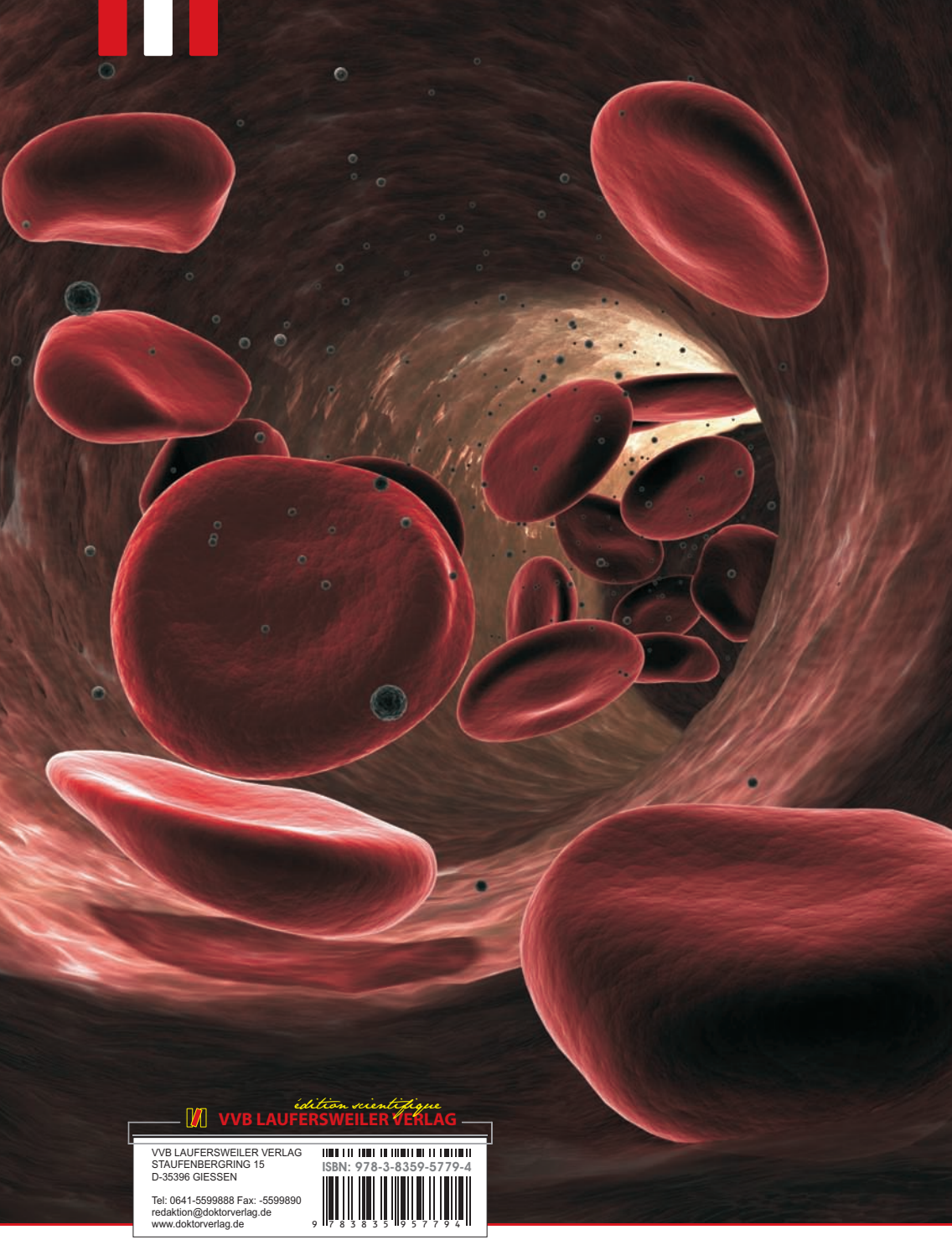
Für das gemeinsame Sammeln der Blutproben bei Katzenzüchtern und auf Hundeplätzen, das anschließende Messen der Proben sowie die gute Zusammenarbeit während der gesamten Arbeit gilt mein Dank Cathrin Dunker und besonders Julia Nakagawa.

Vor allem aber bedanke ich mich bei Zacharias Funk und meiner Familie, ohne deren Hilfe und Unterstützung das Studium und diese Dissertation nicht möglich gewesen wären.

Erklärung:

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

Deborah Weissert, 2011



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-5779-4