

Retikulozytenzählung beim Kaninchen -  
ein Vergleich der manuellen Retikulozytenzählung mit dem  
Advia 2120i

von

Annemarie Elisabeth Kaufhold

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

Retikulozytenzählung beim Kaninchen -  
ein Vergleich der manuellen Retikulozytenzählung mit dem  
Advia 2120i

von Annemarie Elisabeth Kaufhold  
aus Heilbronn  
München 2018



Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Angefertigt am Diagnostiklabor Synlab Vet GmbH Augsburg  
Mentor: Dr. Jutta Hein



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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger T. Korbel

Tag der Promotion: 27.07.2018



Meiner Familie





**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Erythropoese</b>	<b>3</b>
1.1.	Ablauf der Erythropoese	3
1.2.	Lebensdauer von Erythrozyten	4
1.2.1.	Lebensdauer von Erythrozyten bei verschiedenen Haussäugetieren	4
1.2.2.	Lebensdauer von Erythrozyten bei Kaninchen	5
<b>2.</b>	<b>Retikulozyten</b>	<b>7</b>
2.1.	Retikulozytenreifung	7
2.1.1.	Retikulozytenreifungstypen	8
2.1.1.1.	Medullärer Reifungstyp	8
2.1.1.2.	Humoraler Reifungstyp	8
2.1.1.3.	Mischform	9
2.1.2.	Retikulozytenreifegradverteilungen	9
2.2.	Retikulozytenzahlen	11
2.2.1.	Retikulozytenzahlen bei Hund und Katze	11
2.2.2.	Retikulozytenzahlen beim Kaninchen	12
<b>3.</b>	<b>Retikulozytenzählung</b>	<b>15</b>
3.1.	Geschichte	15
3.2.	Methodik	15
3.2.1.	Manuelle Retikulozytenzählung	16
3.2.1.1.	Retikulozytenfärbung	16
3.2.1.2.	Durchführung	17
3.2.1.3.	Vor- und Nachteile	17
3.2.2.	Automatische Retikulozytenzählung	18
3.2.2.1.	Durchführung	19
3.2.2.2.	Vor- und Nachteile	19
<b>4.</b>	<b>Advia 2120i</b>	<b>21</b>

INHALTSVERZEICHNIS	X
4.1. Messprinzip	21
4.2. Erythrozyten-Laser-Messkanal	21
4.3. Retikulozytenbestimmung	22
<b>5. Korrelationen verschiedener Messtechniken</b>	<b>23</b>
<b>6. Antikoagulantia</b>	<b>29</b>
6.1. Ethyldiamintetraessigsäure	29
6.2. Lithium-Heparin	29
<b>III. PUBLIKATION</b>	<b>31</b>
1. <i>Letter of acceptance zu dem Artikel „A comparison of manual reticulocyte counting using Advia 2120i analyzer“</i>	31
2. <i>Der Artikel „A comparison of manual counting of rabbit reticulocytes with ADVIA 2120i analyzer counting“</i>	32
<b>IV. DISKUSSION</b>	<b>37</b>
<b>V. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>47</b>
<b>VI. SUMMARY</b>	<b>49</b>
<b>VII. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>51</b>
<b>VIII. DANKSAGUNG</b>	<b>59</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

CHCM <sub>r</sub>	Mittlere Hämoglobinkonzentration der Retikulozyten
CH <sub>r</sub>	retikulozytärer Hämoglobingehalt
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
et al.	et alii = und andere
Faktor II	Prothrombin
Faktor IV	Kalzium-Ionen
Faktor VII	Prokonvertin
Faktor IX	Antihämophiles Globulin B (Christmas-Faktor)
Faktor X	Stuart-Prower-Faktor
G/l	Giga pro Liter
Gruppe 0	Normoblast nach Heilmeyer
Gruppe I	Retikulozyt mit Knäulform nach Heilmeyer
Gruppe II	Retikulozyt mit Netzform nach Heilmeyer
Gruppe III	Retikulozyt mit unvollständiger Netzform nach Heilmeyer
Gruppe IV	Ausreifungsform des Retikulozyten nach Heilmeyer
Li-Heparin	Lithium-Heparin
ICSH	International Council for Standardization in Hematology, früher NCCLS
MCV <sub>r</sub>	mittleres korpuskuläres Volumen der Retikulozyten
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards, heute ICSH
nm	Nanometer
NMB	Neumethylenblau
PLT	platelets = Thrombozyten
r	Korrelationskoeffizient
RBC	red blood cell = Erythrozyten
RBC/PLT-Reagenz	red blood cell-/platelet-Reagenz

---

RDWr	Retikulozytenverteilungsbreite
RNS	Ribonukleinsäure
rs	Korrelationskoeffizient nach Spearman
SDS	Sodiumdodecylsulfat
v. a.	vor allem
vs.	versus
15-LOX	15-Lipoxygenase
%	Prozent
‰	Promille
μl	Mikroliter

## I. EINLEITUNG

Die Hauptfunktion reifer Erythrozyten ist es, den Sauerstoff im Körper zum Gewebe zu transportieren (OLVER et al., 2010). Um diesen Sauerstofftransport ausreichend zu ermöglichen, ist eine adäquate Erythropoese essenziell (OLVER et al., 2010). Die Retikulozytenzählung ist ein wichtiger Bestandteil der Beurteilung der Erythrozytenregeneration (HEILMEYER & WESTHÄUSER, 1932). In den 1940er Jahren wurde die mikroskopische Zählung der angefärbten Retikulozyten als Standardmethode zur Beurteilung der Erythropoese entwickelt (RILEY et al., 2001; PIVA et al., 2010). Mittlerweile werden für die Retikulozytenzählung in der Humanmedizin, und zunehmend mehr in der Veterinärmedizin, vollautomatische Blutanalysegeräte eingesetzt (RILEY et al., 2001).

Auch beim Tier spielt die Retikulozytendiagnostik eine immer wichtigere Rolle bei der Differenzierung von Anämien (FUCHS & EDER, 1991; TVEDTEN, 2010). Die für menschliches Blut entwickelten Blutanalysegeräte wurden zu diesem Zweck für den veterinärmedizinischen Gebrauch angepasst (MORITZ et al., 2004). Ein Methodenvergleich zwischen manueller Retikulozytenzählung und Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) ist beim Kaninchen in der Literatur bisher nicht beschrieben. Mögliche Unterschiede in Bezug auf verschiedene Antikoagulantia wurden beim Kaninchen bisher ebenfalls nicht untersucht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Beurteilung der Verwendbarkeit des Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) für die Retikulozytenzählung beim Kaninchen im Vergleich mit der manuellen Zählung. Zudem wurde der Einfluss verschiedener Antikoagulantia untersucht und die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse und die Korrelationen zwischen den Methoden bestimmt.



## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Erythropoese

Das griechische Wort „Poesis“ bedeutet „hervorbringen“. Erythropoese ist die Bildung der Erythrozyten (PSCHYREMBEL, 2014). Dabei handelt es sich um die proliferative und progressive Differenzierung der hämatologischen Stammzellen in hämoglobinhaltige, rote Blutkörperchen (OLVER, 2010).

#### 1.1. Ablauf der Erythropoese

Die Steuerung der Erythropoese erfolgt über den zellulären Sauerstoffgehalt (GEMINARD et al., 2002; BRUCE, 2010; OLVER, 2010). Im Knochenmark entwickeln sich aus den multipotenten, hämatopoetischen Stammzellen sogenannte Progenitorzellen, die sich anschließend weiter zu Vorläuferzellen differenzieren. Aus diesen entstehen Proerythroblasten mit tief basophilem Zytoplasma und runden, zentral lokalisierten Zellkernen. Diese Zellen sind die früheste Form, die morphologisch der Erythropoese zugeordnet werden können. Die Proerythroblasten entwickeln sich anschließend über vier Mitosen erst zu Makroblasten, dann zu basophilen Normoblasten, aus denen polychromatische Normoblasten hervorgehen, und schließlich zu oxyphilen Normoblasten (GEMINARD et al., 2002; BRUCE, 2010; OLVER, 2010). Während der Differenzierung von Makroblasten zu oxyphilen Normoblasten kommt es zu einer stetigen Zunahme des Hämoglobingehalts und zunehmender Kondensation des Kernchromatins in der Zelle (OLVER, 2010). Durch Ausstoßung des Zellkerns werden aus oxyphilen Normoblasten Retikulozyten. Die ausgestoßenen Zellkerne werden von Knochenmarksmakrophagen phagozytiert (OLVER, 2010). Die juvenilen Retikulozyten enthalten nun nur noch einen Rest Mitochondrien, Golgimembranen, Ribosomen und Mikrotubuli (STEINBERG & OLVER, 2005). Sie verlassen das Knochenmark und gelangen in das periphere Blut (OLVER, 2010). Innerhalb von drei bis vier Tagen reifen die Retikulozyten dort zu Erythrozyten heran (CHRISTIAN, 2010).



## **1.2. Lebensdauer von Erythrozyten**

Je nach Tierart werden unterschiedliche Überlebenszeiten für Erythrozyten angegeben (siehe Tab. 1 und 2).

### **1.2.1. Lebensdauer von Erythrozyten bei verschiedenen Haussäugetieren**

Die medulläre Erythropoese ist ein regulierter Vorgang, bei dem die Produktion der Destruktion der Erythrozyten angepasst wird (PSCHYREMBEL, 2014). Die Erythrozytenüberlebenszeit korreliert positiv mit der Lebensspanne der verschiedenen Tierarten und deren Körpergewicht (CHRISTAN, 2010). Bei großen Tierarten mit langer Lebenserwartung ist auch die Erythrozytenüberlebenszeit größer, während dies bei kleineren Tieren genau umgekehrt ist. Es wird vermutet, dass kleine Tierarten mit kürzeren Lebenserwartungen auf Grund des gesteigerten Sauerstoffmetabolismus häufiger oxidative Schäden an den Zellen entwickeln. Dadurch fällt die Erythrozytenüberlebenszeit geringer aus (CHRISTIAN, 2010).

Tierartlich unterschiedlich ist eine maximale Lebensdauer der Erythrozyten zwischen 50 - 115 Tagen beschrieben (siehe Tab. 1) (VACHA, 1983). Die durchschnittlichen Überlebenszeiten variieren zwischen 43 und 100 Tagen (siehe Tab. 1). Beim Hund kommt es laut VACHA (1983) täglich zu einem physiologischen Abbau von 0,25 % der alten Erythrozyten. Bei der Katze werden physiologisch 0,14 % der Erythrozyten am Tag abgebaut. Bei Maus (0,65 %) und Goldhamster (1,24 %) ist die Zahl der täglich abgebauten Erythrozyten sogar noch höher (VACHA, 1983).

Tab. 1. Durchschnittliche und maximale Erythrozytenüberlebenszeit bei verschiedenen Tierarten in Tagen (d)

<b>Autor, Jahr</b>	<b>Tierart</b>	<b>Durchschnittliche Erythrozytenüberlebenszeit (d)</b>	<b>Maximale Erythrozytenüberlebenszeit (d)</b>
BROWN & EADIE, 1953	Hund	107	-
VACHA, 1983	Hund	100	115
	Katze	68,4	-
	Goldhamster	50	78
	Maus	43	51
CHRISTIAN, 2010	Hund	100 – 115	-
	Katze	73	-
	Pferd	140 – 145	-
	Rind	130	-
	Ziege	115	-
	Maus	43	-

### 1.2.2. Lebensdauer von Erythrozyten bei Kaninchen

Die Erythrozytenüberlebenszeit bei Kaninchen wird, je nach Autor, zwischen acht und 80 Tagen angegeben (siehe Tab. 2). Laut VACHA (1983) werden bei Kaninchen physiologisch täglich ca. 0,5 % der Erythrozyten abgebaut und laut BURWELL und Mitarbeitern (1953) bis zu 2,75 % täglich neu gebildet. Bei Kaninchen werden also entsprechend täglich mehr Erythrozyten abgebaut als bei Hunden und Katzen aber weniger als bei Kleinnagern, wie Mäusen (VACHA, 1983).

Tab. 2. Durchschnittliche und maximale Erythrozytenüberlebenszeit bei Kaninchen in Tagen (d)

<b>Autor, Jahr</b>	<b>Durchschnittliche Erythrozytenüberlebenszeit (d)</b>	<b>Maximale Erythrozytenüberlebenszeit (d)</b>
NEUBERGER & NIVEN, 1951	61	66 – 68
BURWELL et al., 1953	45 – 50	80
WRIGHT et al., 1955	65 – 69	-
MARVIN & LUCY, 1957	68	-
MC LAUGLIN & FISH, 1974	57 – 67	-
VÖMEL & PLATT, 1981	-	75
VACHA, 1983	57	67

## **2. Retikulozyten**

Retikulozyten sind junge Erythrozyten, die in der Entwicklung zwischen Normoblasten und reifen Erythrozyten stehen (PSCHYREMBEL, 2014). Den Name erhielten sie auf Grund ihres netzähnlichen Musters, das sich nach dem Anfärben des Ribonukleinproteins der Ribosomen durch Präzipitation bildet (BRECHER, 1949; EDER & FRITSCHKE, 1989). Basische Farbstoffe, wie Brillantkresylblau oder Neumethylenblau, führen zur Ausfällung der sonst diffus in der Zelle verteilten Ribonukleinsäure (RNS), der sogenannten Substantia granulofilamentosa. Die gebildeten Konglomerate sind als unterschiedlich dichte, netzartige Strukturen erkennbar (BRECHER, 1949; EDER & FRITSCHKE, 1989).

### **2.1. Retikulozytenreifung**

Zur Kernausstößung kommt es, wenn die Konzentration der retikulozytären 15-Lipoxygenase (15-LOX) in der Zelle ausreichend hoch ist (GEMINARD et al., 2002). Bei der Ausstößung des Zellkernes verschwinden sowohl das endoplasmatische Retikulum als auch der Golgi-Apparat durch Organelldegeneration aus den Normoblasten. Die Mitochondrien sind die letzten noch verbleibenden Zellorganellen. Mit Aktivierung der 15-LOX setzt jedoch auch die mitochondriale Degeneration ein. Nach dem die Retikulozyten aus dem Knochenmark im peripheren Blut angekommen sind, werden weitere 20 – 30 % des bereits entstandenen Hämoglobins gebildet. Tierartlich unterschiedlich kommt es innerhalb von drei bis vier Tagen zur Ausreifung der Retikulozyten zu Erythrozyten (CHRISTIAN, 2010). In dieser Zeit nimmt das Zellvolumen immer mehr ab, während die Zelldichte ansteigt (GEMINARD et al., 2002).

Beim Hund dauert die Erythrozytenreifung 24 Stunden (CHRISTIAN, 2010). Bei der Katze reifen die juvenilen aggregierten Retikulozyten innerhalb von zwölf Stunden zu punktierten Retikulozyten aus, die anschließend zwölf bis 21 Tage im peripheren Blut zirkulieren (ALSAKER et al., 1977; WEISER & KOCIBA, 1982). Beim Pferd treten Retikulozyten nur selten und nur bei hochregenerativen Anämien im peripheren Blut auf (WEISS & MORITZ, 2003; CHRISTIAN, 2010).

### **2.1.1. Retikulozytenreifungstypen**

Die Gesamtmenge an Retikulozyten in der peripheren Blutbahn ist tierartsspezifisch unterschiedlich und zusätzlich vom Gesundheitszustand abhängig (CHRISTIAN, 2010). Tierarten, die auch im gesunden Zustand Retikulozyten im Blut aufweisen, sind unter anderem Hunde, Katzen, Nagetiere und Kaninchen (OLVER, 2010). Anhand der tierartlich unterschiedlichen Retikulozytenreifungsstadien kann man drei verschiedene Reifungstypen unterteilen. Es gibt den medullären und den humoralen Reifungstyp sowie eine Mischform (WIEMER, 1986).

#### **2.1.1.1. Medullärer Reifungstyp**

Das Wort „medullär“ stammt vom lateinischen Wort „*medullaris*“ ab und bedeutet „im Mark befindlich“ (DUDEN, 2017). Bei diesem Typ erfolgt die Ausreifung der Retikulozyten also bereits im Knochenmark. Pferde und Wiederkäuer (Rind, Schaf und Ziege) sind diesem Ausreifungstyp zugehörig (WIEMER, 1986; FUCHS & EDER, 1991). Bei diesen Tierarten treten Retikulozyten, wenn überhaupt, nur in Phasen der Regeneration im Blut auf (OLVER, 2010). Bei all diesen Tierarten ist die Konzentration der Substantia granulofilamentosa in den Retikulozyten im peripheren Blut nur sehr gering (WIEMER, 1986). WIEMER (1986) stellte in seiner Studie fest, dass die Retikulozytenzahl im peripheren Blut mit der Reifegradverteilung korreliert. Dies bedeutet, dass bei Tierarten mit physiologisch geringer Retikulozytenzahl im peripheren Blut v. a. ältere Reifungsstadien, also Retikulozyten mit geringer Menge an Substantia granulofilamentosa, zu finden sind (WIEMER, 1986).

#### **2.1.1.2. Humoraler Reifungstyp**

Das Wort „humoral“ stammt vom lateinischen Wort „*humores*“ ab und bedeutet „eine Körperflüssigkeit betreffend“ (DUDEN, 2017). Bei diesem Typ erfolgt die Ausreifung der Retikulozyten zum größten Teil im peripheren Blut. Tierarten, die diesem Ausreifungstyp angehören, weisen die meisten juvenilen Retikulozyten und, in Korrelation hierzu, auch insgesamt physiologisch die meisten Retikulozyten im Blut auf (WIEMER, 1986; FUCHS & EDER, 1991). WIEMER (1986) ordnete in seiner Studie Kaninchen und Nagetiere dieser Gruppe zu.

Zusätzlich nimmt er in dieser Gruppe nochmals tierartige Abstufungen vor. So haben Kaninchen die meisten juvenilen Retikulozyten im Blut, gefolgt von der Ratte und der Maus. Das Meerschweinchen weist in dieser Gruppe die wenigsten juvenilen Retikulozyten im peripheren Blut auf (WIEMER, 1986).

### 2.1.1.3. Mischform

Zum gemischten Ausreifungstyp werden Hunde, Schweine und Menschen gezählt (WIEMER, 1986; FUCHS & EDER, 1991). Bei ihnen verbringen die Retikulozyten zwei Drittel ihrer Reifungsdauer im Knochenmark und ein Drittel im peripheren Blut (WIEMER, 1986).

### 2.1.2. Retikulozytenreifegradverteilungen

Der Grad der Ausreifung der Retikulozyten ist durch die Menge und die morphologischen Erscheinung der Substantia granulofilamentosa gekennzeichnet (HEILMEYER, 1931; WIEMER, 1986). HEILMEYER (1931) teilte die Retikulozyten beim Menschen in verschiedene Reifungsstadien ein. Er zählte 1000 Erythrozyten im peripheren Blut und differenzierte die dabei auftretenden Retikulozyten in die Gruppen 0 – IV (siehe Tab. 3).

Tab. 3. Einteilung der Retikulozyten nach Reifungsstadien in Gruppe 0 – IV nach HEILMEYER (1931), modifiziert nach GILMER und KOEPKE (1976)

Gruppe	Form	Morphologie
0	Normoblast	kernhaltiger Erythrozyt im Knochenmark
I	Knäulform	junge Retikulozyten, Retikulum als dichtes Netzwerk mit eingelagerten Granula in der Mitte der Erythrozyten
II	Netzform	Auflockerung des Retikulums, netzartige Ausbreitung über die Zelle
III	unvollständige Netzform	beginnende Auflösung der vitalfärbbaren Substanz, nur noch einzelne Bruchstücke vom ursprünglichen Netz vorhanden
IV	Ausreifungsform	nur noch wenige verstreute Granula (mind. 2)

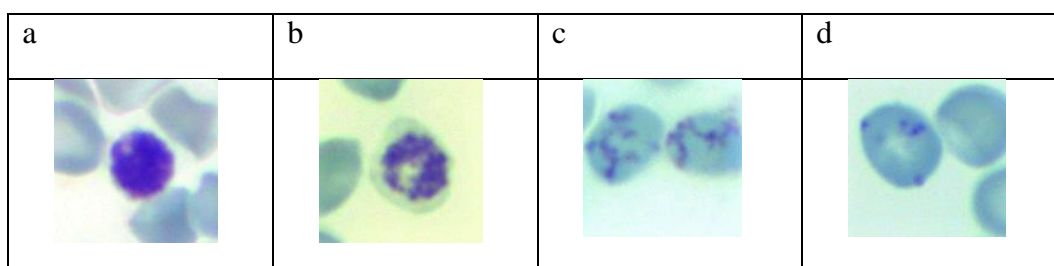


Abb. 1 a - d. Kaninchenretikulozyten nach Reifungsstadien der Gruppe I – IV nach HEILMEYER (1931), modifiziert nach GILMER und KOEPKE (1976) (a. Gruppe I, b. Gruppe II, c. Gruppe III, d. Gruppe IV) (Brillantkresylblaufärbung, 1000-fache Vergrößerung mit Öl)

Bei Tieren machen Retikulozyten der Gruppe IV (Ausreifungsform) tierartspezifisch bis zu 60 Prozent der Retikulozyten im peripheren Blut aus, während weitere 30 Prozent auf die Gruppe III (unvollständig Netzform) entfallen (GILMER & KOEPKE, 1976). Retikulozyten der Gruppe I (Knäulform) und II (Netzform) sind nur in geringen Mengen vorhanden (HEILMEYER, 1931; GILMER & KOEPKE, 1976). Laut WIEMER (1986) sind die Reifegradverteilungen bei allen Tierarten unimodal, was bedeutet, dass die Kurve der Reifungsgruppen nur einen Gipfel hat. Diese Reifegradverteilung ist für jede Tierart charakteristisch und weist je nach Ausreifungstyp (medullär, humoral, Mischform) den Gipfel an einer anderen Stelle auf (WIEMER 1986).

Kommt es auf Grund einer Anämie zu einer erhöhten Erythrozytenregeneration im Knochenmark, kann innerhalb der Gruppen I – IV eine deutliche Verschiebung von Retikulozyten der Gruppe IV (Ausreifungsform) in Richtung Gruppe I (Knäulform) registriert werden (HEILMEYER, 1931). Da es schneller zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten juveniler Retikulozyten kommt als zu einem Gesamtanstieg der Retikulozytenzahl, kann diese Verschiebung zur Beurteilung der erythropoetischen Aktivität herangezogen werden (FUCHS & EDER, 1991). HEILMEYER und WESTHÄUSER (1932) konnten anhand der Reifungsstadien außerdem nachweisen, dass Retikulozyten auch *in vitro* weiter reifen. Der RNS-Gehalt in den Retikulozyten nimmt entsprechend über 48 Stunden weiter ab, bis nur noch Ausreifungsformen (Gruppe IV) vorhanden sind. Die Anzahl der Erythrozyten bleibt dabei konstant (HEILMEYER & WESTHÄUSER, 1932).

## 2.2. Retikulozytenzahlen

Nicht nur die Retikulozytenzahlen variieren je nach Tierart (siehe Abschnitt 2.2.1. und 2.2.2.), auch die Reifegradverteilungen unterscheiden sich (FUCHS & EDER; 1991; CHRISTIAN, 2010).

### 2.2.1. Retikulozytenzahlen bei Hunden und Katzen

Im Allgemeinen kommen bei diesen Tierarten mehr ausgereifte, punktierte als nicht ausgereifte, aggregierte Retikulozytenformen vor (WIEMER, 1986; EDER & FUCHS, 1991). Bei Hunden sind im gesunden, nicht anämischen Zustand weniger als ein Prozent der aus dem Knochenmark austretenden Retikulozyten aggregiert (CHRISTIAN, 2010). Sie machen in ihrer Gesamtzahl weniger als 80.000 Zellen pro Mikroliter aus (CHRISTIAN, 2010). Die maximale Gesamtretikulozytenzahl bei der gesunden Katze wird mit 60.000 Zellen pro Mikroliter angegeben (CHRISTIAN, 2010). Auch Katzen weisen physiologisch nur wenige, aggregierte Retikulozyten ( $\leq 0,4\%$ ) im peripheren Blut auf, während punktierte Retikulozyten bis zu zehn Prozent der Erythrozyten ausmachen (WEISER & KOCIBA, 1982).

Tab. 4. Angabe verschiedener Autoren zu Referenzbereichen der absoluten und relativen Retikulozytenzahlen bei Hunden und Katzen (<sup>1</sup> = Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, <sup>2</sup> = 95 % Perzentil, <sup>3</sup> = Robuste Methode; <sup>4</sup> = Hersteller Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland; <sup>5</sup> = Hersteller Abbott, Abbott Park, Illinois, U.S.A.)

Autor, Jahr	Verfahren	Tierart	absolute Retikulozytenzahl (G/L)	relative Retikulozytenzahl (%)
EVANS & FAGG, 1994	manuell	Hund	147 $\pm$ 53 <sup>1</sup>	2,1 $\pm$ 0,9 <sup>1</sup>
MORITZ et al., 2004	ADVIA 120 <sup>4</sup>	Hund	10,9 – 110,9 <sup>2</sup>	0,1 – 1,5 <sup>2</sup>
	ADVIA 120 <sup>4</sup>	Katze	3,7 – 94, 1 <sup>2</sup>	0,1 – 1,2 <sup>2</sup>
MEYER, 2005	ADVIA 120 <sup>4</sup>	Katze	29,5 $\pm$ 1,23 <sup>1</sup>	0,4 $\pm$ 1,23 <sup>1</sup>
WEISSERT, 2011	manuell	Hund	0,0 – 103,8 <sup>3</sup>	0,0 – 1,4 <sup>3</sup>
	ADVIA 120 <sup>4</sup>	Hund	0,0 – 85,2 <sup>3</sup>	0,0 – 1,2 <sup>3</sup>
	manuell	Katze	0,0 – 58,2 <sup>3</sup>	0,0 – 0,7 <sup>3</sup>



Autor, Jahr	Verfahren	Tierart	absolute Retikulozytenzahl (G/L)	relative Retikulozytenzahl (%)
WEISSERT, 2011	ADVIA 120 <sup>4</sup>	Katze	0,0 – 45,4 <sup>3</sup>	0,0 – 0,5 <sup>3</sup>
SCHÄFERS, 2013	Cell-Dyn 3500 <sup>5</sup>	Hund	0,0 – 113 <sup>2</sup>	0,0 – 0,01 <sup>2</sup>

### 2.2.2. Retikulozytenzahlen bei Kaninchen

Kaninchen werden, als gängige Labortiere, häufig in Studien verwendet, so auch bei dem Vergleich von Retikulozytenzahlen bei verschiedenen Tierarten (WIEMER, 1986; FUCHS & EDER, 1991). Die Bestimmung der Retikulozytenzahlen erfolgte dabei meist manuell mikroskopisch oder mit Analysegeräten (siehe Tab 5). Als Gerinnungshemmer wurde vor allem Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) verwendet (WIEMER, 1986, KABATA et al., 1991; WELLS et al., 1999). Sowohl WIEMER (1986) als auch FUCHS und EDER (1991) ordnen Kaninchen dem humoralen Reifungstypen zu. Laut FUCHS und EDER (1991) treten bei Kaninchen physiologischer Weise deutlich höhere Retikulozytenzahlen (Mittelwert: 179 G/l) auf als bei Hunden (Mittelwert: 45 G/l) und Schweinen (Mittelwert: 121 G/l). Die hohen Gesamtretikulozytenzahlen spiegeln sich auch in den Referenzbereichen anderer Studien wider (DETTWEILER, 2015; KAUFHOLD et al., 2016) (siehe Tab. 5).

Tab. 5. Angabe verschiedener Autoren zu Referenzbereichen der absoluten und relativen Retikulozytenzahlen beim Kaninchen (<sup>1</sup> = Mittelwert ± Standardabweichung, <sup>2</sup> = 95 % Perzentil, <sup>3</sup> = Methode unbekannt; <sup>4</sup> = Hersteller Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland; <sup>5</sup> = Hersteller Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland)

Autor, Jahr	Verfahren	absolute Retikulozytenzahl (G/L)	relative Retikulozytenzahl (%)	Tierzahl (n)
CARD & VALBERG, 1967	manuell	-	1,0 – 2,7 <sup>3</sup>	6
ENGEL-BRECHT & REMMELE, 1969	manuell	-	2,6 – 4,7 <sup>3</sup>	5
MC LAUGLIN & FISH, 1974	manuell	-	2,0 – 4,0 <sup>3</sup>	-
FUCHS & EDER, 1991	Sysmex R-1000 <sup>5</sup>	169,5 ± 58,5 <sup>1</sup>	2,6 ± 1,0 <sup>1</sup>	20
KABATA et al., 1991	Sysmex R-1000 <sup>5</sup>	141,0 ± 23 <sup>1</sup>	2,4 ± 0,4 <sup>1</sup>	10
	manuell	-	2,8 ± 0,5 <sup>1</sup>	10
WELLS et al., 1999	Sysmex R-2000 <sup>5</sup>	156,6 ± 40 <sup>1</sup>	-	87
DETTWEILER, 2015	Sysmex XT2000iV <sup>5</sup>	67,0 – 358,5	1,2 – 5,9	60
	manuell	57,6 – 407,4	0,9 – 7,8	60
KAUFHOLD et al., 2016	ADVIA 2120i <sup>4</sup>	59,1 – 302,2 <sup>2</sup>	1,0 – 4,7 <sup>2</sup>	130
	manuell	77,8 – 467,8 <sup>2</sup>	1,3 – 7,6 <sup>2</sup>	130

WIEMER (1986) untersuchte die Reifegradverteilung der Retikulozyten beim Kaninchen mittels Vitalfluorochromierung. Dabei wurde mittels Mikroskop-Photometer die relative Fluoreszenzintensität des gesamten vitalfluorochromierten Retikulozyten bestimmt. Unreife Retikulozyten mit dichtem Retikulum (Gruppe I) besaßen die höchste Fluoreszenzintensität. Von allen ausgewerteten Tierarten (Kaninchen, Nager, Hund, Schwein, Wiederkäuer) war die mittlere Fluoreszenzintensität der Retikulozyten bei Kaninchen am höchsten und somit auch deren Zahl der unreifen Retikulozyten (WIEMER, 1986). Die Studie von KAUFHOLD und Mitarbeitern (2016) ergab bei Kaninchen ebenfalls ein verstärktes Auftreten von Retikulozyten der Gruppe I (22 %) und II (31 %) im

Vergleich mit Retikulozyten der Gruppe IV (13 %). ENGELBRECHT und REMMELE (1969) werteten die Retikulozytenzahlen von sechs Kaninchen aus und konnten ebenfalls hohe Retikulozytenzahlen für die Gruppe I (5 %) und die Gruppe II (31 %) bestätigen. Die ermittelte Halbwertszeit für die Retikulozytenreifung gaben sie in ihrer Studie mit 26 Stunden an. ENGELBRECHT und REMMELE (1969) schätzten die Gesamtreifungszeit vom Retikulozyt der Gruppe I (Knäulform) bis zum Erythrozyt auf 50 – 100 Stunden.

Die Retikulozytenzahlen bei Kaninchen werden als nicht geschlechtsabhängig beschrieben (KABATA et al., 1991; DETTWEILER, 2015). WELLS und Mitarbeiter (1999) wiesen in ihrer Untersuchung an trächtigen und nichtträchtigen Kaninchen, bei trächtigen Kaninchen an Tag 16 allerdings eine fast doppelt so hohe Retikulozytenzahl wie bei nicht trächtigen Tieren nach.

### **3. Retikulozytenzählung**

Die Geschichte der Retikulozytenzählung reicht bis in 19. Jahrhundert zurück (siehe Abschnitt 3.1.) und erfolgt, nach anfänglicher, manueller mikroskopischer Zählung, heute zumeist vollautomatisch mit Hilfe von Analysegeräten (siehe Abschnitt 3.2.).

#### **3.1. Geschichte**

In den 1860er Jahren wurden von ERB (1965) zum ersten Mal Granula in den Erythrozyten von Mensch und Tier entdeckt. Dreißig Jahre später gelang es EHRLICH (1881) mit Hilfe von Methylenblau das Retikulum in den Zellen anzufärben. Diese angefärbten Zellen beschrieb er erstmals als Retikulozyten. EHRLICH (1881) hielt die Retikulozyten zunächst für eine progressive Koagulationsnekrose des Zellstromas. Ein Zusammenhang zwischen Anämien und dem Auftreten von Retikulozyten wurde erst von SMITH (1891) hergestellt. Vierzig Jahre später folgte dann die erste Beschreibung der unterschiedlichen Retikulozytenreifungsstadien im Blut (HEILMEYER, 1931). GILMER und KOEPKE definierten 1976, welche Retikulozytenreifungsstadien bei der manuellen Zählung berücksichtigt werden sollten (GILMER & KOEPKE, 1976). Seit 1993 gibt das International Council for Standardisation in Haematology (ICSH), früher National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Richtlinien, unter anderem zur Retikulozytenzählung, heraus. Diese Richtlinien enthalten Vorgaben zu Probenentnahme und Lagerung und zu Färbemethoden für die manuelle Retikulozytenzählung und die Durchflusszytometrie sowie Angaben zur Sensitivität und Spezifität für automatische Analysegeräte und Qualitätsmanagement (NCCLS, 2004).

#### **3.2. Methodik**

Die Retikulozytenzählung kann in unterschiedlicher Weise durchgeführt werden. Unterschieden wird zwischen der manuellen Zählmethode (siehe Abschnitt 3.2.1.), die mittels Mikroskop durchgeführt wird, sowie der automatische Zählmethode (siehe Abschnitt 3.2.2.), für die ein Analysegerät benötigt wird. Beide Methoden haben ihre Vor- und Nachteile, die in den folgenden Abschnitten erläutert werden.

### **3.2.1. Manuelle Retikulozytenzählung**

Das ICSH sieht die mikroskopische Zählung von Retikulozyten nach Supravitalfärbung als Standardzählmethode vor (NCCLS, 2004).

#### **3.2.1.1. Retikulozytenfärbung**

Das Sichtbarmachen der RNS-Reste in den Retikulozyten erfolgt mittels „Supravitalfärbung“ (BRECHER, 1949). Bei dieser Art von Färbung werden lebende, unfixierte Zellen angefärbt, da sich die zu färbenden Bestandteile im fixierten Zustand nicht mehr anfärben lassen (NCCLS, 2004). Die Färbung wird mit Neumethylenblau (NMB) oder Brillantkresylblau (BKB) durchgeführt (NCCLS, 2004; CHRISTIAN, 2010). Dabei sorgt der basische Farbstoff für Präzipitationen der vorher diffus verteilten RNS-Reste. Dies führt zur Entstehung der typischen Netzform, die den Retikulozyten ihren Namen gibt (BRECHER, 1949; CHRISTIAN, 2010; NEBE et al., 2010). Dem Reifegrad entsprechend werden so, je nach RNS-Konzentration, größere, zusammenhängende Verklumpungen (aggregierte Retikulozyten) oder zwei oder mehr punktierte Strukturen sichtbar (punktierte Retikulozyten) (CHRISTIAN, 2010).

Das ICSH empfiehlt als Antikoagulantium der Wahl EDTA (NCCLS, 2004). Zu Li-Heparin und Citrat als Gerinnungshemmer liegen derzeit noch keine ausreichenden Studien für die Retikulozytenzählung vor (NCCLS, 2004; LIPPI et al., 2005).

Nach den Richtlinien des ICSH sollte die EDTA-Blutprobe vor Beginn der Färbung zehn Mal schonend geschwenkt und dadurch gemischt werden (NCCLS, 2004). Anschließend wird zu gleichen Teilen Probe und Färbelösung (NMB oder BKB) in ein Eppendorfgesäß geben, vermischt und 3 – 10 Minuten dort inkubiert. Enthält das Blut auf Grund einer Anämie weniger Erythrozyten, wird empfohlen, entsprechend des Hämatokrits, weniger Farbstoff zur Färbung zu verwenden. Nach der Inkubation wird der Inhalt erneut gut durchgemischt und ein Tropfen (10 µl) davon auf einem Objektträger ausgestrichen. Der Ausstrich soll zwei Drittel des Objektträgers bedecken und aus Korpus, Monolayer und Fahne bestehen. Das Trocknen erfolgt an der Luft (NCCLS, 2004).

### 3.2.1.2. Durchführung

Nach den Richtlinien des ICSH soll die Auszählung der Retikulozyten auf dem Objektträger unter dem Mikroskop in 1000-facher Vergrößerung mit Ölimmersionslösung erfolgen (NCCLS, 2004). Ausgezählt wird im Monolayer, dem Abschnitt des Ausstriches, in dem die Erythrozyten gleichmäßig verteilt sind und sich weder überlappen noch berühren. Das Präparat wird meanderförmig durchgesehen und der Anteil der Retikulozyten bei einer bestimmten Anzahl Erythrozyten gezählt. Die Anzahl gezählter Erythrozyten ist abhängig von der erwünschten Genauigkeit. Je geringer die Anzahl an Retikulozyten oder je höher die Präzision, desto mehr Erythrozyten sollten ausgezählt werden. Laut ICSH sollen jedoch mindestens 2000 Erythrozyten gezählt werden (NCCLS, 2004). Andere Autoren geben 1000 Erythrozyten als ausreichend an (GILMER & KOEPKE, 1976; BUTTARELLO et al., 2001; PIVA et al., 2010; BAUER et al., 2012). Wird die manuelle Zählung zur initialen Kalibrierung von Blutanalysegeräten verwendet, müssen immer mindestens 2000 Zellen ausgewertet werden (NCCLS, 2004).

Die relativen und absoluten Retikulozytenzahlen errechnen sich wie folgt (NCCLS, 2004):

$$\text{Retikulozyten (\%)} = \frac{\text{Retikulozytenzahl}}{\text{Erythrozytenzahl} + \text{Retikulozytenzahl}} \times 100$$

$$\text{Retikulozyten (x 10}^9\text{/L)} = \text{RBC (x 10}^{12}\text{/L)} \times \text{Retikulozytenzahl (\%)}$$

### 3.2.1.3. Vor- und Nachteile

Die manuelle Zählung der Retikulozyten gilt nicht nur als Goldstandard (COWGILL et al., 2003; NCCLS, 2004), sondern ist laut ICSH außerdem zur Kalibrierung neuer Analysegeräte geeignet, für den Fall, dass kein bereits kalibriertes und validiertes, zweites Analysegeräte zur Verfügung steht. Zudem ist die Zählmethode relativ preiswert und ortsunabhängig, da lediglich ein geeignetes Mikroskop mit 100er Objektiv, sowie Färbereagenzien und geschultes Personal zur Zählung erforderlich sind (NEBE et al., 2010).

Die Nachteile der manuellen Zählung liegen in der Ungenauigkeit, der mäßigen Wiederholbarkeit und der geringen Sensitivität (SCHIMENTI et al., 1992;

BUTTARELLO et al., 1996; NCCLS, 2004; NEBE et al., 2010). Laut NEBE und Mitarbeitern (2010) ist die Probenqualität ausschlaggebend für ein gutes Ergebnis. Deshalb sollte die Blutprobe frisch und frei von Gerinnseln sein (NEBE et al., 2010). Da es auch *in vitro* zu zeit- und temperaturabhängiger Reifung kommt, sollten die Proben sofort nach der Blutentnahme bearbeitet und die Retikulozyten ausgezählt werden (HEILMEYER & WESTHÄUSER, 1932; NCCLS, 2004). Bei ungekühlten Proben sollten die Retikulozytenzahlen innerhalb sechs Stunden nach Entnahme bestimmt werden. Bei gekühlten Proben (Lagerung bei 4 °C) ist eine Retikulozytenzählung auch noch bis 72 Stunden nach Blutentnahme möglich (NCCLS, 2004). Der Faktor Mensch führt, laut NEBE und Mitarbeitern (2010), zu den meisten Ungenauigkeiten bei der Auswertung. Laut PEEBLES & HOCHBERG (1981) sind individuelle Zählkriterien für die Unterschiede zwischen verschiedenen Untersuchern verantwortlich. Je nach Studie wurde für die manuellen Retikulozytenzählung entsprechend Variationskoeffizienten von 8 – 50 % zwischen verschiedenen Untersuchern ermittelt (GILMER & KOEPKE, 1976; SAVAGE et al., 1985; FERGUSON et al., 1990). Zählfehler durch den Untersucher selbst und andere Ursachen, wie zum Beispiel Müdigkeit, beeinflussen das Ergebnis ebenfalls (NCCLS, 2004; NEBE et al., 2010). Schlechte Ausstrichqualität und Färbeartefakte können auf Grund ungleichmäßiger Zellverteilung und Verunreinigungen von vorn herein zu schlechten Ausgangsbedingungen bei der Zählung führen (NCCLS, 2004; NEBE et al., 2010).

### **3.2.2. Automatische Retikulozytenzählung**

Die automatische Retikulozytenzählung mit Hilfe moderner Blutanalysegeräte ist mittlerweile in den meisten Laboren Standard. Wie die manuelle Zählung bringt auch die automatische Retikulozytenzählung Vor- und Nachteile mit sich (siehe Abschnitte 3.2.2.2. und 3.2.2.3.).

### 3.2.2.1. Durchführung

Mittlerweile ist eine Vielzahl an unterschiedlichen Blutanalysegeräten auf dem Markt. Hierzu zählen unter anderem der Advia (Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland) und der Sysmex (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland). Während beim Advia (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) die Retikulozytenbestimmung über Laserstreulicht, Absorption und Supravitalfärbung stattfindet, wird beim Sysmex (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) eine Impedanz- und Fluoreszenzmessung durchgeführt (SYSMEX DEUTSCHLAND GMBH, 2007; SIEMENS HEALTH CARE DIAGNOSTICS, 2010). Im Abschnitt 4 wird auf den ADVIA 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) genauer eingegangen.

### 3.2.2.2. Vor- und Nachteile

Da die Blutanalysegeräte während einer Messung bis zu 50.000 Zellen auswerten können, ist die relative Retikulozytenzahl viel genauer als bei der manuellen Auswertung und somit auch die Präzision deutlich höher (HEIMPEL et al., 2010; SIEMENS HEALTH CARE DIAGNOSTICS, 2010). Auch der Probendurchsatz ist mit bis zu 120 Proben in der Stunde höher, als er bei mikroskopischer Zählung möglich wäre, da zeitaufwändige Einzelarbeitsschritte wie Färben, Inkubieren, Ausstreichen und Zählen entfallen (SIEMENS HEALTH CARE DIAGNOSTICS, 2010). Es können also mehr Proben mit einer höheren Genauigkeit und mit weniger Personal in weniger Zeit analysiert werden, was am Ende auch zu einer Kostenreduktion führt (SIEMENS HEALTH CARE DIAGNOSTICS, 2010).

Jedoch ist auch die automatische Retikulozytenzählung von der Probenqualität abhängig (NCCLS, 2004). Auch hier sollte die Blutprobe frei von Gerinnseln und nicht älter als 72 Stunden sein. Beeinträchtigungen in der Retikulozytenmessung können durch Thrombozytenaggregate, Makrothrombozyten, basophile Tüpfelung der Erythrozyten, Heinz-Körperchen, Blutparasiten, Howell-Jolly-Körperchen, Normoblasten und Leukozytenfragmente entstehen (NCCLS, 2004). NEBE und Mitarbeiter (2010) diskutierten auch eine unterschiedliche Sensitivität bei der RNS-Erkennung bei verschiedenen Analysegeräten als Fehlerquelle. Durch unterschiedliche RNS-Affinitäten der Farbstoffe kann es vorkommen, dass sich auch andere RNS-haltige Zellen anfärben und nicht von Retikulozyten



unterscheiden lassen. Auch Kälteaggregate oder Hämolyse können die automatische Zählung stören (NEBE et al., 2010). Laut einer Studie von BUTTARELLO und Mitarbeitern (2001) können vorliegende Retikulozytosen oder -penien ebenfalls zu Problemen bei der Retikulozytenzählung führen. Bei einem Vergleich verschiedener Analysegeräte (Cell Dyn (Abbott, Santa Clara, Kalifornien); 4000 Vega Retic (ABX, Montpellier, Frankreich); Advia 120 (Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland), Gen-S (Coulter-Beckman, Hialeah, Florida); SE 9500 Ret (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) stellten sie fest, dass bei niedrigen Retikulozytenzahlen falsch hohe Ergebnisse auftreten können und bei hohen Retikulozytenzahlen falsch niedrige Ergebnisse (BUTTARELLO et al., 2001).

#### **4. Advia 2120i**

Bei dem Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) handelt es sich um ein hochmodernes vollautomatisches Blutanalysegerät. Nachfolgend wird genauer auf das Messprinzip des Analysegerätes (siehe Abschnitt 4.1.) sowie auf die Messmethoden (siehe Abschnitte 4.3. und 4.4.) zur Bestimmung der Erythrozyten- und Retikulozytenzahl eingegangen.

##### **4.1. Messprinzip**

SIEMENS HEALTH CARE DIAGNOSTICS (2010) verwendet bei dem Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) für die Ermittlung der Blutanalyseergebnisse unterschiedliche Messmethoden, die auf Laser-Optik und Absorption basieren. Hierbei kommt eine Laserdioden-Lichtquelle zum Einsatz. Mit deren Hilfe können über verschiedene Leuchtsignale und Winkelmessungen die Zellen kategorisiert werden. Die einzelnen Parameter, wie zum Beispiel die Erythrozytenzahl (siehe Abschnitt 4.2.) oder die Retikulozytenzahl (siehe Abschnitt 4.3.), werden wie nachfolgend eingehend beschrieben, in unterschiedlichen spezifischen Messkanälen analysiert. Pro Stunde können bis zu 120 Blutproben gemessen und dabei komplette Blutbilder mit Differentialblutbildern erstellt werden. Auch die Zählung der Retikulozytenzahlen erfolgt automatisch. Der Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) besitzt für 21 Tierarten eine hochspezifische Multispeziessoftware (SIEMENS HEALTH CARE DIAGNOSTICS, 2010).

##### **4.2. Erythrozyten-Laser-Messkanal**

Zur Analyse der Erythrozytenzahlen verwendet SIEMENS HEALTH CARE DIAGNOSTICS (2010) eine Zweiwinkelstreulichtmessung. Dabei handelt es sich um ein optisches Verfahren der Zellzählung, bei dem ein hinzugegebenes Reagenz zur isovolumetrischen Aufkuglung der Erythrozyten und Thrombozyten führt (SIEMENS HEALTH CARE DIAGNOSTICS, 2010). Das ADVIA 2120/2120i red blood cell-/platelet-Reagenz (RBC/PLT-Reagenz) enthält unter anderem Sodiumdodecylsulfat (SDS) sowie Glutaraldehyd, was zur Veränderung der Oberflächenspannung der Zellen führt. Mit Hilfe der hydrodynamischen Fokussierung in der Durchflussküvette können die Zellen jeweils einzeln bei einer

Wellenlänge von 670 nm optisch gemessen werden. Die Vorwärtsleuchtsignale einer jeden Zelle werden in zwei verschiedenen Winkelbereichen, bestehend aus einem Niedrigwinkel von  $2 - 3^\circ$  und einem Hochwinkel von  $5 - 15^\circ$ , von lichtempfindlichen Detektoren aufgefangen. Die Lasermessungen sind proportional zur Zellgröße und zum Hämoglobingehalt (SIEMENS HEALTH CARE DIAGNOSTICS, 2010). Mit Hilfe der Mie-Theorie (HERGERT & WRIED, 2012) kann jeder Erythrozyt einzeln nach seinem Hämoglobingehalt und seinem Volumen typisiert und visuell in einem Diagramm, der sogenannten „MIE-Mappe“, dargestellt werden (siehe Abb. 2). Durch die „MIE-Mappe“ werden so morphologische Veränderungen der Erythrozyten sichtbar gemacht und können quantifiziert werden (HERGERT & WRIED, 2012).

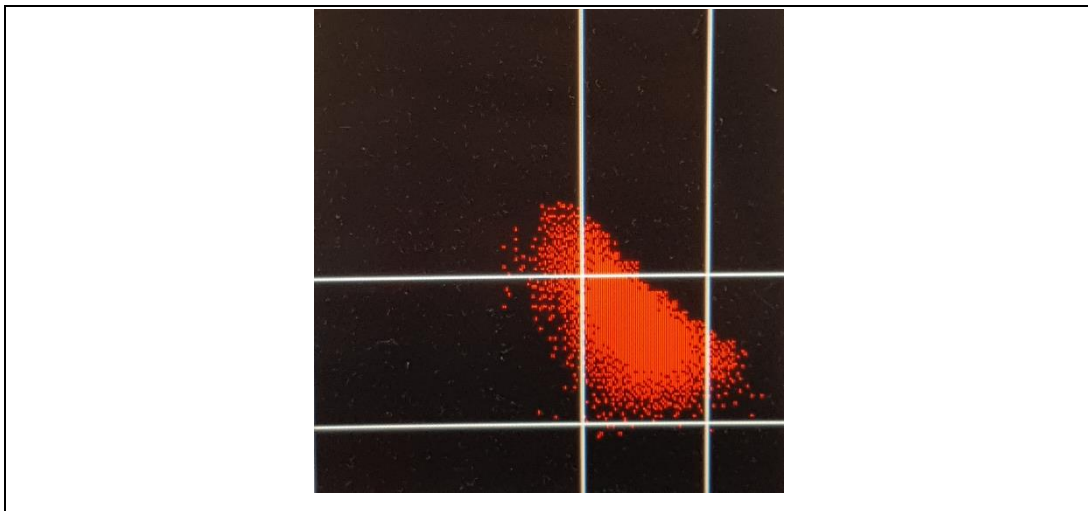


Abb. 2. Darstellung von Kaninchenerythrozyten in der MIE-Mappe des Advia 2120i (SIEMENS HEALTH CARE DIAGNOSTICS, 2010) (x-Achse: Hämoglobinkonzentration, y-Achsen: Volumen der Erythrozyten)

### 4.3. Retikulozytenbestimmung

Die Retikulozytenbestimmung erfolgt laut SIEMENS HEALTH CARE DIAGNOSTICS (2010) in zwei Schritten. Die Retikulozytenanalyse findet in der gleichen Flusszelle wie die Erythrozytenzählung statt. Die Zellen werden mittels Zweiwinkelstreulichtmessung bei einer Wellenlänge von 670 nm, nach isovolumetrischer Aufkuglung durch Reti-Reagenz, optisch gemessen. Bei dem sogenannten „Reti-Reagenz“ handelt es sich unter anderem um den Farbstoff Oxazin 750, der die Rest-RNS der Retikulozyten anfärbt. Das

Vorwärtsstreulicht aus dem Niedrigwinkel ( $2 - 3^\circ$ ) und dem Hochwinkel ( $5 - 15^\circ$ ) wird von jeder Zelle von lichtempfindlichen Detektoren aufgefangen. Zusätzlich wird die Absorption, die proportional zum RNS-Gehalt der Zellen ist, ermittelt. Alle Messergebnisse werden anschließend in ein sogenanntes „Retigramm“ (Scattergramm) projiziert (siehe Abb. 3). Mit Hilfe der MIE-Mappe kann jeder Retikulozyt einzeln nach seinem Hämoglobingehalt und seinem Volumen typisiert werden. Mittels der Kombination aus Streulicht, Hochwinkel und Absorption können Erythrozyten von Retikulozyten unterschieden werden. Eine Subklassifikation der Reifungsstadien, der Reifungsindex und spezifische Retikulozytenparameter, wie zum Beispiel der retikulozytäre Hämoglobingehalt (CHr), das mittlere korpuskuläre Retikulozytenvolumen (MCVr), die Retikulozytenverteilungsbreite (RDWr) und die mittlere Hämoglobinkonzentration der Retikulozyten (CHCMr) können so ebenfalls ermittelt werden. Der Reifungsindex gibt die Fraktion der unreifen, RNS-reichen Retikulozyten an. Mittels der gemessenen Absorption kann der Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) die Retikulozyten in drei verschiedene Reifungsstadien einteilen: geringgradig, mittelgradig und hochgradig absorbierende Retikulozyten (siehe Abb. 3) (SIEMENS HEALTH CARE DIAGNOSTICS, 2010).

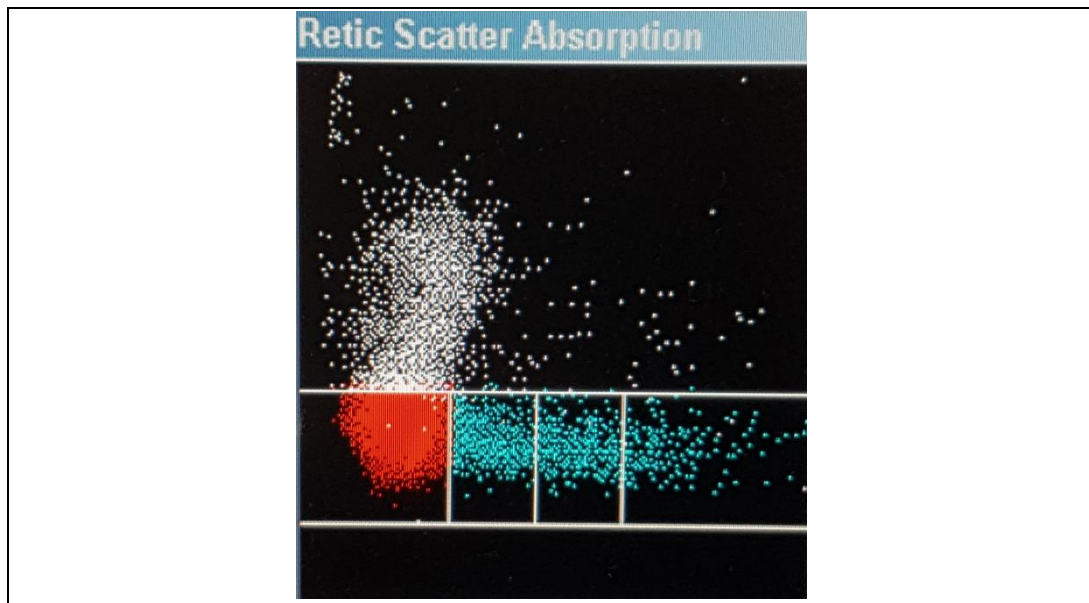


Abb. 3. Darstellung von Kaninchenretikulozyten im Scattergramm des Advia 2120i (SIEMENS HEALTH CARE DIAGNOSTICS, 2010) (x-Achse: gemessene Absorption (= Reifegrade der Retikulozyten), y-Achse: Hochwinkel Streulicht (= Zellgröße))

Im Retikulozytenscattergramm befindet sich ganz links die Population reifer Erythrozyten. In den folgenden Abschnitten finden sich von links nach rechts erst Retikulozyten mit einer geringen und einer mittleren Absorption und zuletzt die juvenilsten Zellen mit der höchsten Absorption (siehe Abb. 3) (SIEMENS HEALTH CARE DIAGNOSTICS, 2010).

## 5. Korrelationen verschiedener Messtechniken

Eine Vergleichsmessung von Retikulozytenzahlen bei Kaninchen wurde bisher nur zwischen der Handzählung und dem Sysmex XT 2000iV (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) durchgeführt, aber keine Korrelationen berechnet (siehe Tab. 6) (DETTWEILER, 2015). Vergleichsmessungen mit dem Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) fehlen für Kaninchenblut bisher komplett.

Untersuchungen zu Hunde- und Katzenblut liegen für beide Analysegeräte vor (DUNKER, 2010; SIEMENS HEALTH CARE DIAGNOSTICS, 2010; WEISSERT, 2011; BAUER et al., 2012). Sowohl der Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) als auch der Sysmex XT 2000iV (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) sind für die Retikulozytenzählung bei Hund und Katze validiert und geeignet (DUNKER, 2010; SIEMENS HEALTH CARE DIAGNOSTICS, 2010; WEISSERT, 2011; BAUER et al., 2012).

Die Messergebnisse der Retikulozytenzählung des Advia 120 (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) korrelieren gut ( $r_s = 0,90$ ) mit den Ergebnissen der manuellen Retikulozytenzählung bei Hundeblut und mäßig ( $r_s = 0,71$ ) mit denen bei Katzenblut (WEISSERT, 2011). Die Korrelationen verschiedener Retikulozytenmesstechniken bei Hundeblut sind insgesamt gut (siehe Tab. 6) (BAUER & MORITZ, 2008; MATHERS et al., 2008; DUNKER, 2010; WEISSERT, 2011; BAUER et al., 2012). Für Blut von Kaninchen, Pferden und Rindern wurden zwar Vergleichsmessungen zwischen dem Advia120 (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) bzw. dem Sysmex XT 2000iV (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) und der manuellen Zählung durchgeführt, jedoch wurde in den Studien kein Korrelationskoeffizient berechnet (HOLSTEG, 2002; DURA, 2005; DETTWEILER, 2015). Korrelationskoeffizienten aus verschiedenen Studien sind, soweit vorhanden, in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt (siehe Tab. 6).

Tab. 6. Vergleich verschiedener Retikulozytenmesstechniken bei verschiedenen Tierarten (mit Korrelationskoeffizienten soweit verfügbar) (<sup>1</sup> = Hersteller Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland; <sup>2</sup> = Hersteller Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland)

<b>Autor, Jahr</b>	<b>Verfahren</b>	<b>Tierart</b>	<b>Korrelationskoeffizient (r)</b>
HOLSTEG, 2002	Advia 120 <sup>1</sup> vs. manuell	Rind	nicht berechnet
PÜSCH, 2002	Advia 120 <sup>1</sup> vs. manuell	Ziege	0,92
DURA, 2005	Advia 120 <sup>1</sup> vs. manuell	Schwein	0,49
	Advia 120 <sup>1</sup> vs. manuell	Pferd	nicht berechnet
BAUER & MORITZ, 2008	Advia 2120i <sup>1</sup> vs. Advia 120 <sup>1</sup>	Hund	0,98
	Advia 2120i <sup>1</sup> vs. Advia 120 <sup>1</sup>	Katze	0,96
MATHERS et al., 2008	Sysmex XT 2000iV <sup>2</sup> vs. Advia 120 <sup>1</sup>	Hund	0,95
	Sysmex XT 2000iV <sup>2</sup> vs. Advia 120 <sup>1</sup>	Ratte	0,78
	Sysmex XT 2000iV <sup>2</sup> vs. Advia 120 <sup>1</sup>	Maus	0,76
DUNKER, 2010	Sysmex XT 2000iV <sup>2</sup> vs. manuell	Hund	0,86
WEISSERT, 2011	Advia 120 <sup>1</sup> vs. manuell	Hund	0,90
	Advia 120 <sup>1</sup> vs. manuell	Katze	0,71
BAUER et al., 2012	Sysmex XT 2000iV <sup>2</sup> vs. Advia 2120i <sup>1</sup>	Hund	0,93
	Sysmex XT 2000iV <sup>2</sup> vs. Advia 2120i <sup>1</sup>	Katze	0,70
	Advia 2120i <sup>1</sup> vs. manuell	Hund	0,53
	Advia 2120i <sup>1</sup> vs. manuell	Katze	0,53
	Sysmex XT 2000iV <sup>2</sup> vs. manuell	Hund	0,63
	Sysmex XT 2000iV <sup>2</sup> vs. manuell	Katze	0,56

<b>Autor, Jahr</b>	<b>Verfahren</b>	<b>Tierart</b>	<b>Korrelations- koeffizient (r)</b>
DETTWEILER, 2015	Sysmex XT 2000iV <sup>2</sup> vs. manuell	Kaninchen	nicht berechnet





## 6. Antikoagulantia

Für die Analyse der hämatologischen Parameter, wie z. B. den Retikulozytenzahlen, muss mit Hilfe von Antikoagulantia verhindert werden, dass das verwendete Vollblut gerinnt (NCCLS, 2004). Nachfolgend wird die Wirkungsweise von EDTA (siehe Abschnitt 6.1.) und Li-Heparin (siehe Abschnitt 6.2.) beschrieben.

### 6.1. Ethyldiamintetraessigsäure

Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) ist per Definition eine organische Säure, die mit Metallionen Chelate bildet (PSCHYREMBEL, 2014). EDTA wirkt auf die Blutgerinnungskaskade ein, indem es Kalzium-Ionen (Faktor IV) bindet, die dann nicht mehr für die Aktivierung der Faktoren II, VII, IX und X zur Verfügung stehen (HORN et al., 2005; KASPERS & GÖBEL, 2010). Die Säure wird regelmäßig als Antikoagulantium *in vitro* verwendet (PSCHYREMBEL, 2014). Laut Empfehlung des ICSH soll zur Bestimmung der Retikulozytenzahlen EDTA als Antikoagulantium verwendet werden, da die Eignung anderer Antikoagulantia, wie Heparin und Citrat, für die Retikulozytenzählung noch nicht ausreichend untersucht ist (NCCLS, 2004). Aus diesem Grund empfiehlt auch SIEMENS HEALTH CARE DIAGNOSTICS (2010) die Verwendung von EDTA als Gerinnungshemmer für die automatische Retikulozytenzählung mittels Advia (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland). EDTA wurde bereits in verschiedenen Studien auch bei Kaninchenblut verwendet (FUCHS & EDER, 1991; WIEMER, 1986; DETTWEILER, 2015).

### 6.2. Lithium-Heparin

PSCHYREMBEL (2014) definiert Lithium-(Li)-Heparin als gerinnungshemmendes Polymer aus D-Glukuronsäure und D-Glukosamin, das pro Struktureinheit mehrere Moleküle Schwefelsäure enthält. Die gerinnungshemmende Wirkung entfaltet es durch die Hemmung der Wirkung von Thrombin auf das Fibrinogen, indem es an das Antithrombin III bindet (HORN et al., 2005). Zusätzlich führt es zur Inaktivierung des Faktors X (HORN et al., 2005; KASPERS & GÖBEL, 2010). Laut dem ICSH gibt es derzeit keine ausreichend aussagekräftigen Studien zur Eignung von Li-Heparin-Blutproben bei

der Retikulozytenzählung (NCCLS, 2004). Werden trotzdem mit Li-Heparin antikoagulierte Proben verwendet, muss vermehrt darauf geachtet werden, dass bei der Messung des roten Blutbildes keine Fehlermeldung oder Hinweise auf Aggregate vorliegen und die Retikulozytenzahl plausibel ist (NCCLS, 2004). HOLSTEG (2002) kommt in seiner Studie zu dem Entschluss, dass Li-Heparin bei Rinderblutproben auf Grund starker Aggregatbildung für den Einsatz am Advia (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) abzulehnen ist. Vermehrte Aggregatbildung bei Verwendung von Li-Heparin als Antikoagulantium stellten auch BAUER und Mitarbeiter (2012) bei Blutproben von Hunden und Katzen, DURA (2005) bei Blutproben von Schweinen und MEYER (2005) bei Blutproben von Katzen fest. Für Kaninchenblutproben liegen hierzu bisher keine Studien vor.

### III. PUBLIKATION

#### 1. *Letter of acceptance zu dem Artikel „A comparison of manual reticulocyte counting using Advia 2120i analyzer “*

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation - Decision on Manuscript JVDI ms 16-0550.R2

From: Journal of Veterinary Diagnostic Investigation

To: annika87@outlook.de

Date: 29.09.2017 18:36

29 – Sep – 2016

Dear Ms. Kaufhold:

I am pleased to inform you that your revised manuscript 16-0550.R2 entitled "A comparison of manual reticulocyte counting using Advia 2120i analyzer" has been accepted for publication in the Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. Accordingly, you may now cite the article as "in press" in J Vet Diagn Invest.

Sincerely, on behalf of Grant Maxie, Editor-in-Chief,

Holly M. Farrell

Managing Editor

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation

<http://vdi.sagepub.com/>

## 2. Der Artikel „A comparison of manual counting of rabbit reticulocytes with ADVIA 2120i analyzer counting “

Full Scientific Report



Journal of Veterinary Diagnostic Investigation  
1–5  
© 2018 The Author(s)  
Reprints and permissions:  
sagepub.com/journalsPermissions.nav  
DOI: 10.1177/1040638717750428  
jvdi.sagepub.com

### A comparison of manual counting of rabbit reticulocytes with ADVIA 2120i analyzer counting

Annemarie E. Kaufhold,<sup>1</sup> Johannes Hirschberger, Sven Reese, Gesine Foerster, Jutta Hein

**Abstract.** We compared manual counting of reticulocytes in rabbits with automatic counting using an ADVIA 2120i analyzer. Reproducibility and the influence of different anticoagulants (EDTA and Li-heparin) were also examined. Blood samples of 331 rabbits (method comparison,  $n = 289$ ; reproducibility,  $n = 33$ ; comparison of anticoagulants,  $n = 9$ ) were tested. The reticulocyte numbers of each specimen were manually determined twice for method comparison. Passing–Bablok regressions, Bland–Altman plots, and the coefficient of variation (CV) were used to evaluate statistical significance. Good correlation ( $r_s = 0.81$ ) was observed between manual reticulocyte counting (groups 1–4) and the ADVIA 2120i. Quantification with the ADVIA 2120i was reproducible for relative reticulocyte numbers (EDTA, CV = 4.24%; Li-heparin, CV = 3.63%) and absolute reticulocyte numbers (EDTA, CV = 5.64%; Li-heparin, CV = 3.81%). The absolute and relative reticulocyte numbers were significantly higher in Li-heparin samples than in EDTA samples (absolute,  $p = 0.009$ ; relative,  $p = 0.016$ ). The ADVIA 2120i is suitable for counting reticulocytes in rabbit blood samples, but reticulocyte numbers are higher by manual counting than by ADVIA 2120i counting. Therefore, microscopic confirmation of quantifications is recommended when high numbers of reticulocytes are observed. The anticoagulant of choice is EDTA.

**Key words:** EDTA; hematology; Li-heparin; method comparison; rabbit; reticulocyte maturation.

#### Introduction

Reticulocyte quantification is important for the evaluation of erythrocyte regeneration.<sup>10</sup> Microscopic counts of stained reticulocytes became the standard quantification method in the 1940s.<sup>22</sup> Since then, automated hematology analyzers, which can quantify reticulocytes more accurately, faster, and at a reduced cost, have been developed.<sup>22</sup> These were initially developed to analyze human blood samples and have been adapted for veterinary use,<sup>17</sup> but have not been reported for use with rabbit blood, to our knowledge.

We compared manual counting of rabbit reticulocytes with quantification using the ADVIA 2120i analyzer (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). We determined the reproducibility of the results and the influence of different anticoagulants on the 2 methods.

#### Materials and methods

For our prospective study, 331 rabbit blood samples were collected from June 2013 to December 2014 (method comparison,  $n = 289$ ; reproducibility,  $n = 33$ ; comparison of anticoagulants,  $n = 9$ ). The rabbits' state of health was unknown for most samples. Specimens were sent from various veterinary practices in Germany to the laboratory (Synlab Veterinary Diagnostic Laboratory, Augsburg, Germany). Inclusion

criteria were a blood sample volume of at least 0.5 mL, known sample age, and analysis within 36 h of venipuncture. The ADVIA 2120i has multispecies software (v.5.9.0 MS, Siemens Healthcare) that can analyze blood from 21 animal species. Measurements were performed using the pre-setting for rabbit blood and for absolute and relative reticulocytes.

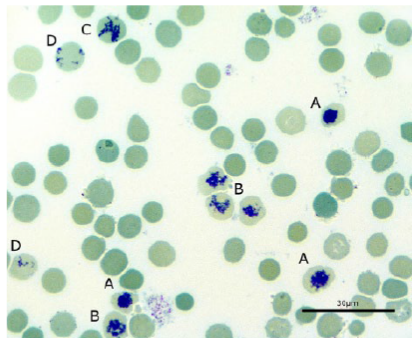
For manual counting, reticulocytes were supravivally stained<sup>3,22</sup>; 50  $\mu$ L of EDTA or lithium [Li]-heparin blood and 50  $\mu$ L of brilliant cresyl blue (Merck, Germersheim, Germany) were pipetted into an Eppendorf cup, mixed, and then incubated at room temperature for 30 min, before the blood smear was made. One thousand erythrocytes were counted twice per smear using a microscope (1,000 $\times$  magnification, immersion oil).<sup>4</sup> To guarantee the most accurate standard, mean values of the manual counted results were

Clinic of Small Animal Medicine (Kaufhold, Hirschberger), Department of Anatomy, Histology and Embryology (Reese), Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany; Synlab Vet Laboratory, Augsburg, Germany (Kaufhold, Hein, Foerster).

<sup>1</sup>Corresponding author: Annemarie E. Kaufhold, Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany 80539. annika87@outlook.de

**Table 1.** Classification scheme used for rabbit reticulocyte groups.<sup>7,9</sup>

Reticulocyte group 1	Reticulocyte group 2	Reticulocyte group 3	Reticulocyte group 4
Ball-shape Reticulum is a dense network with embedded granules in these youngest reticulocytes.	Net-shape Loosening and expansion of the reticulum.	Incomplete net-shape Only single fragments of the reticulum remain.	Mature-shape A few widespread granules remain (at least 2).



**Figure 1.** Maturation stages of rabbit reticulocytes demonstrated with brilliant cresyl blue staining. 1,000 $\times$  magnification. A = ball-shaped reticulum (group 1), B = net-shaped reticulum (group 2), C = incomplete net-shaped reticulum (group 3), D = mature-shaped reticulocytes (group 4).

used in comparisons. All manual counting was performed and evaluated by the same person to avoid differences between the investigators. The counted reticulocytes were also classified into maturation stages (groups 1–4; Table 1, Fig. 1).<sup>7,9</sup> Manual counting was the reference method for comparison to ADVIA 2120i counts. Reticulocyte maturation was assessed by classification into different stages (Fig. 1), and the stage was considered when comparing the 2 methods.

Results were analyzed using various programs (SPSS Statistics for Windows v.22.0, IBM, Ehningen, Germany; MedCalc v.15.6, MedCalc Software, Ostend, Belgium; Excel 2013, Microsoft, Redmond, WA).

To compare manual counting with ADVIA 2120i counts, 289 rabbit blood samples (248 EDTA and 41 Li-heparin samples) were collected. Of the evaluated blood samples, 51.9% were from male rabbits ( $n = 150$ ; 118 neutered) and 41.2% were from female rabbits ( $n = 119$ ; 23 neutered). The sex was not known for 20 (7.0%) of the rabbits. The average age was 5.0 y; the youngest animal was 6 mo old, and the oldest was 9 y old.

The Spearman correlation coefficient ( $r_s$ ) was calculated to measure the association between the 2 methods.<sup>11</sup> The association was defined as follows:  $r_s = 0.93$ – $0.99$  (excellent),  $r_s = 0.80$ – $0.92$  (good),  $r_s = 0.59$ – $0.79$  (fair),

and  $r_s = <0.59$  (poor).<sup>1</sup> After  $r_s$  was calculated, a Bland–Altman plot was constructed, and a Passing–Bablok regression was performed.<sup>2,12,20</sup>

To determine the reproducibility of quantification results using the ADVIA 2120i, another 33 rabbit blood samples (19 EDTA and 14 Li-heparin samples) were analyzed 5 times in a row. The coefficients of variation (CVs) for EDTA- and Li-heparin samples were then calculated from the average values of each measurement.<sup>14</sup> Reproducibility for manual counting results was calculated from the manual duplicate counting of the 289 rabbit blood samples from the method comparison.

Samples from 9 animals were collected in sufficient blood volume (both Li-heparin and EDTA) for comparison of the anticoagulants. Every sample was analyzed 5 times in a row with the ADVIA 2120i, with 1-min intervals between each quantification ( $n = 9$ ). A Wilcoxon test was performed to compare the anticoagulants.<sup>15,19</sup> The significance level was set at  $p \leq 0.05$  (significant),  $p \leq 0.005$ , and  $p \leq 0.001$  (highly significant).<sup>16</sup>

## Results

A fair-to-good correlation ( $r_s = 0.7$ – $0.8$ ) was determined between manual counting and the ADVIA 2120i for all comparative measurements ( $n = 289$ ; Table 2). The numbers of reticulocytes quantified by the ADVIA 2120i were significantly ( $p = 0.001$ ) lower than those quantified by manual reticulocyte counting. Compared with the absolute reticulocyte numbers quantified by the ADVIA 2120i, those in the manually counted groups were higher, with the following divergences (bias Bland–Altman plot): 27.9% (groups 1–4), 13.1% (groups 2 and 3), 34.0% (groups 1 and 2), and 2.6% (groups 2–4; Table 3). Passing–Bablok regression showed a negative proportional error (slope  $B = 0.7$ ) when ADVIA 2120i quantification and manual counting of groups 1–4 were compared (Table 2).<sup>13</sup> A negative proportional error (slope  $B = 0.8$ ) was observed when ADVIA 2120i counts were compared with relative manual reticulocyte counts of groups 1–3. The correlations between ADVIA 2120i and relative manual counting were good ( $r_s = 0.8$ ) for groups 1–4 and 1–3. A negative proportional error was observed when comparing the results of absolute reticulocyte counting by the ADVIA 2120i with manual counts of groups 1–4 and 1–3 (groups 1–4, slope  $B = 0.7$ ; groups 1–3, slope  $B = 0.8$ ; Table 2). The lowest proportional error appeared when

## Quantification of rabbit reticulocytes

3

**Table 2.** Agreement between manual counting and ADVIA 2120i counting of rabbit reticulocytes ( $n = 289$ ).

Manual groups	rs	Proportional differences		Systemic differences	
		Slope B	95% CI	Intercept A	95% CI
Absolute ( $\times 10^9/L$ )					
1-4	0.8	0.7	0.7-0.8*	-0.5	-10.7-7.5
1-3	0.8	0.8	0.8-0.9*	3.6	-5.1-11.4
1+2	0.8	1.2	1.1-1.3*	21.4	12.1-30.9†
2-4	0.7	1.0	0.9-1.1	-10.2	-27.0-2.0
Relative (%)					
1-4	0.8	0.7	0.7-0.8*	0.0	-1.5-1.5
1-3	0.8	0.8	0.8-0.9*	1.0	-0.4-2.3
1+2	0.8	1.2	1.1-1.3*	4.0	2.2-5.6†
2-4	0.7	1.0	0.9-1.1	-1.8	-4.5-0.5

1-4 = classification of reticulocytes<sup>7,9</sup>; 95% CI = 95% confidence interval; absolute = absolute number of manually counted reticulocytes (relative number of reticulocytes  $\times$  number of erythrocytes); intercept A = y-intercept; relative = relative manually counted reticulocytes per 100 erythrocytes; rs = Spearman coefficient of correlation; slope B = slope.

\* Proportional error.

† Systemic error.

**Table 3.** Means and absolute bias of manual counting and ADVIA 2120i counting of rabbit reticulocytes ( $n = 289$ ).

Manual groups	Manual reticulocytes (mean)	ADVIA 2120i reticulocytes (mean)	Absolute bias (%)
Absolute ( $\times 10^9/L$ )			
1-4	211	159	51.5
1-3	181	159	22.3
1+2	113	159	-46.3
2-4	163	159	4.1
Relative (%)			
1-4	4.0	3.0	10.0
1-3	34.0	3.0	4.7
1+2	2.2	3.0	-8.2
2-4	3.1	3.0	1.0

1-4 = classification of reticulocytes<sup>7,9</sup>; absolute = absolute number of manually counted reticulocytes (relative number of reticulocytes  $\times$  number of erythrocytes); absolute bias = difference of the mean of manual and ADVIA reticulocyte counting; relative = relative manually counted reticulocytes per 100 erythrocytes.

relative reticulocyte numbers quantified by the ADVIA 2120i were compared with the manual counts of groups 2 and 3 (slope B = 1.0). The correlation was fair ( $rs = 0.7$ ), which was also observed between absolute reticulocyte numbers of groups 2-4 (slope B = 1.0,  $rs = 0.7$ ; Table 2).

An excellent reproducibility score was obtained for the relative and absolute reticulocyte numbers quantified by the ADVIA 2120i. The CVs were 4.2% and 5.6% for EDTA samples and 3.6% and 3.8% for Li-heparin samples. The CV for absolute reticulocyte numbers was 17.1% for EDTA samples and 16.7% for Li-heparin samples by manual counting. Other CV values are summarized in Table 4. The Wilcoxon test showed that Li-heparin samples had significantly higher relative reticulocyte numbers (3.8%;  $p = 0.044$ ) and significantly higher absolute reticulocyte numbers (4.5%;  $p = 0.018$ ) compared with EDTA blood samples.

## Discussion

There was good-to-fair correlation between manual reticulocyte counting and quantification by the ADVIA 2120i. Similarly, a previous study with the blood of cats and dogs reported good correlation between ADVIA 120 and manual quantification of reticulocytes (dog:  $rs = 0.89$ ; cat:  $rs = 0.75$ ). In cat blood, only aggregated reticulocytes were manually counted under the microscope and were compared to quantifications made by the ADVIA 120 (Weissert D. Lasergestützte Erythrozytenanalyse (ADVIA 120 und LaserCyte) bei Hund und Katze mit Auswertung der Erythrozytenmorphologie [dissertation]. Gießen, Germany: Justus Liebig-Universität, 2011). Another study compared the number of reticulocytes quantified by the Sysmex XT-2000iV (Sysmex, Norderstedt, Germany) and the ADVIA 120 in dog, rat, and mouse blood<sup>15</sup>; excellent to fair correlations were observed

**Table 4.** Coefficient of variation (CV) of rabbit reticulocytes analyzed by ADVIA and manual reticulocyte counting.

Parameter	CV (%)			
	Manual		ADVIA	
	EDTA (n = 248)	Li-heparin (n = 41)	EDTA (n = 19)	Li-heparin (n = 14)
Absolute reticulocyte numbers group				
1–4 ( $\times 10^9/L$ )	17.1	16.7	5.6	3.8
1–3 ( $\times 10^9/L$ )	22.5	19.5		
Relative reticulocyte numbers group				
1–4 (%)	17.2	18.2	4.2	3.6
1–3 (%)	19.8	21.9		

Classification of the manual counting in maturation stadia.<sup>7,9</sup> Absolute reticulocyte number = absolute reticulocyte number (relative reticulocyte number  $\times$  erythrocyte number), analyzed by ADVIA or manual counting); n = number of rabbits; relative reticulocyte number = relative reticulocyte numbers in %, analyzed by ADVIA or manual counting.

(dog:  $r = 0.95$ ; rat:  $r = 0.78$ ; mouse:  $r = 0.76$ ).<sup>15</sup> In our study, we found a correlation of  $<0.90$ , which indicates that one or both measuring methods had higher statistical variance. The statistical variance was larger in manual counting than in ADVIA counting (Table 2).

In our study, the results of both methods were inversely proportional. Similar findings were shown in a previous comparison of manual reticulocyte counting with the ADVIA 120 in dog blood (relative reticulocyte number: slope B = 0.91, absolute reticulocyte number: slope B = 0.94; Weissert, 2011).

In a previous study, a higher number of reticulocytes were counted by the Sysmex than by the ADVIA 120.<sup>15</sup> It was suggested that immature, RNA-rich, and juvenile reticulocytes may have contributed to higher reticulocyte numbers as counted by the Sysmex.<sup>15</sup> The Sysmex analyzer classifies reticulocytes from all animal species into 4 groups, whereas the ADVIA 120 classifies reticulocytes into 3 groups.<sup>15</sup> Therefore, in our study, we compared maturation stage groups 1–4 and 2–4 with the ADVIA 2120i results. The comparison of manual reticulocyte counting of groups 2–4 with ADVIA 2120i counting gave the best result (Table 2). There was a significant difference in the total number of reticulocytes in groups 1–4 and groups 2–4. In our study, group 1 reticulocytes comprised 22.3% of the total reticulocytes, group 2 comprised 31.4%, and group 3 comprised 32.3%. Group 4 reticulocytes were the least represented and comprised 13.2% of total reticulocytes. We believe that the ADVIA 2120i does not count the young group 1 reticulocytes, as suggested by the previous study. This is clinically relevant for reticulocyte counting because a divergence of only  $\pm 10\%$  from the initial value can be tolerated.<sup>8,15</sup>

We observed good reproducibility of reticulocyte quantifications using the ADVIA 2120i analyzer. The reproducibility of reticulocyte quantifications in EDTA blood by the ADVIA 2120i analyzer has been examined previously (Dura A. Blutzellzählung und -differenzierung bei Pferd und Schwein mit dem Hämatologiesystem ADVIA 120: Gerätevalidierung und Softwareadaptation [dissertation]. Gießen,

Germany: Justus Liebig-University, 2006; Holsteg M. Softwareadaptation und begleitende Evaluation des Hämatologiesystems ADVIA 120 für die Tierart Rind: Erstellung von hämatologischen Referenzbereichen für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und deutsches Fleckvieh [dissertation]. Gießen, Germany: Justus Liebig-University, 2002; Weissert, 2011). Fair reproducibility of absolute reticulocyte number (CV = 10.3%) and good reproducibility of the relative reticulocyte number (CV = 4.8%) was reported in canine blood (Weissert, 2011). In pig blood (Dura, 2006), fair reproducibility (CV = 9.8%) was reported, and poor reproducibility of reticulocyte numbers was observed in cattle blood (CV = 33.0%; Holsteg, 2002). In contrast to our study using rabbit blood, these investigations were performed using the earlier ADVIA 120 model. The reproducibility of manual reticulocyte counting was clearly poor compared with ADVIA 2120i counting. This is supported by a previous investigation that showed CV values of 15–40% from manual counting, depending on the investigator.<sup>7</sup> Fair-to-poor reproducibility of manual reticulocyte counting (CV = 20%–50%; CV = 8.3%–44.2%) was reported in previous studies.<sup>6,23</sup> In our study, the investigators' CV was 17% for both EDTA and Li-heparin blood (reticulocyte groups 1–4). In comparison with the mentioned studies, this was a good result (Table 4).

Although manual reticulocyte counting is not a very reliable and challenging method, it is still considered the gold standard when an automated reticulocyte analyzer is not available.<sup>4,5,18,23</sup> Because we did not have a second hematology analyzer available in our study, manual counting was used as a standard method for comparisons, as suggested by the International Council for Standardization in Hematology.<sup>4</sup> The accuracy of manual counting depends on the investigator, and variations between investigators can be high.<sup>13,21</sup> For this reason, all manual counting was performed by the same person in our study. The classification of reticulocytes is important and is one of the main sources of error.<sup>23</sup> Major differences between individual investigators because of solitary granules could be observed.<sup>21</sup> The error rate was 30% when reticulocyte morphology was not



classified, and the principal source of variation was group 4 reticulocytes.<sup>21</sup> This was confirmed in other studies.<sup>7,10</sup> To address this, the group 4 classification was modified.<sup>7,9</sup> Only reticulocytes with at least 2 granules should be counted, which were visible with minimal ocular adjustment.<sup>7</sup> In our study, rabbit reticulocytes were classified into groups strictly according to these guidelines.<sup>7,9</sup> Despite classification and double counting, only 1,000 erythrocytes were manually counted twice, whereas the ADVIA 2120i evaluated 50,000 erythrocytes per sample, making it potentially more accurate (Table 4). Blood samples were measured 5 times with the ADVIA 2120i and counted twice manually to test the methods for reproducibility. This improved the reproducibility of results obtained with the ADVIA 2120i analyzer. The less the reticulocyte maturation groups were combined, the higher the CV in our study (Table 4). Different compositions of reticulocyte groups 1–4 on the same blood smear in repeated counts were reported.<sup>16</sup> It was suggested that this was to the result of random distribution of reticulocytes among erythrocytes.<sup>16</sup> Thus, reproduction is better when groups 1–4 are summarized rather than compared individually (Table 4).

The number of reticulocytes was significantly higher in Li-heparin blood than in EDTA blood. This supports the findings of a previous study,<sup>18</sup> in which it was shown that erythrocytes and platelets aggregated in Li-heparin blood samples, leading to falsely high reticulocyte numbers.<sup>18</sup> Aggregation was also described in pig (Dura, 2006), cattle (Holsteg, 2002), dog, and cat blood.<sup>1</sup> This might be consistent with the observed increased clotting in blood samples anticoagulated with Li-heparin. Another reason for increased appearance of clotting might be improper filling of Li-heparin tubes and thus inadequate anticoagulation.

#### Declaration of Conflicting Interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

#### Funding

The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

#### References

- Bauer N, et al. Evaluation of the automated hematology analyzer Sysmex XT-2000iV compared to the ADVIA (R) 2120 for its use in dogs, cats, and horses. Part II: Accuracy of leukocyte differential and reticulocyte count, impact of anticoagulant and sample aging. *J Vet Diagn Invest* 2012;24:74–89.
- Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1:307–310.
- Brecher G. New methylene blue as a reticulocyte stain. *Am J Clin Pathol* 1949;19:895.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for reticulocyte counting (automated blood cell counters, flow cytometry, and supravital dyes); approved guideline—second edition, 2004. CLSI document H44-A2.
- Cowgill ES, et al. Clinical application of reticulocyte counts in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003;33:1223–1244.
- Ferguson DJ, et al. Evaluation of reticulocyte counts by flow cytometry in a routine laboratory. *Am J Hematol* 1990;33:13–17.
- Gilmer PR, Koepke JA. The reticulocyte. An approach to definition. *Am J Clin Pathol* 1976;66:262–267.
- Hedberg P, Lehto T. Aging stability of complete blood count and white blood cell differential parameters analyzed by Abbott CELL-DYN Sapphire hematology analyzer. *Int J Lab Hematol* 2009;31:87–96.
- Heilmeyer L. Blutfarbstoffwechselstudien: Probleme, Methoden, und Kritik der Whippleschen Theorie [Changes in hemoglobin: problems, methods, and criticism of the Whipple theory]. *Dtsch Arch Klein Med* 1931;171:123–153. German.
- Heilmeyer L, Westhäuser R. Reifungsstadien an überlebenden Reticulozyten in vitro und ihre Bedeutung für die Schätzung der täglichen Hämoglobinproduktion in vivo [Maturation status of surviving reticulocytes in vitro and their importance for the daily rating of hemoglobin production in vivo]. *Z Klin Med* 1932;121:361–655. German.
- Hauke J, Kossowski. Comparison of values of Pearson's and Spearman's correlation coefficients on the same sets of data. *Quaestiones Geographicae* 2011;30:87–93.
- Jensen AL, Kjelgaard-Hansen M. Method comparison in the clinical laboratory. *Vet Clin Pathol* 2006;35:276–286.
- Koepke JF, Koepke JA. Reticulocytes. *Clin Lab Haematol* 1986;8:169–179.
- Lovie S. Measurement theory and practice: the world through quantification. *Br J Math Stat Psychol* 2005;58:377–378.
- Mathers R, et al. Evaluation of the Sysmex XT-2000iV haematology analyser for rat, dog and mouse whole blood samples. *Comp Clin Pathol* 2008;17:137–144.
- Miale JB. Laboratory medicine, hematology. 5th ed. St. Louis, MO: Mosby, 1977.
- Moritz A, et al. Canine and feline hematology reference values for the ADVIA 120 hematology system. *Vet Clin Pathol* 2004;33:32–38.
- Nebe C, et al. Aktuelle Aspekte zur Bestimmung der Retikulozytenzahl [Current aspects of reticulocyte analysis]. *J Lab Med* 2010;34:295–304. German.
- Sibbertsen P, Lehne SH. Intervallschätzung [Interval estimation]. In: Statistik- Einführung für Wirtschafts- und Sozialwissenschaftler [Statistics—An Introduction for Economists and Social Scientists]. 2nd ed. Vol. 1. Berlin-Heidelberg, PA: Springer, 2015: 252. German
- Passing H, Bablok. 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* 1983;21:709–720.
- Peebles DA, et al. Analysis of manual reticulocyte counting. *Am J Clin Pathol* 1981;76:713–717.
- Riley RS, et al., Reticulocytes and reticulocyte enumeration. *J Clin Lab Anim* 2001;15:267–294.
- Savage R. Analytical bias and imprecision in reticulocyte counting. A preliminary report from the College of American Pathology Reticulocyte Project. *Blood Cells* 1985;11.

## IV. DISKUSSION

Der **Methodenvergleich** zwischen der manuellen Retikulozytenzählung und der automatischen Retikulozytenzählung mit dem Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) zeigt in dieser Studie eine gute bis mäßige Korrelation ( $r_s = 0,72 - 0,81$ ) für Kaninchenblut. Bisher gibt es keine weitere Studie, in der die Ergebnisse der manuellen Retikulozytenzählung mit den Ergebnissen des Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) bei Kaninchenblut verglichen wurden. DETTWEILER (2015) hat in ihrer Studie zwar ebenfalls Kaninchenretikulozyten manuell sowie automatisch ausgewertet, dabei jedoch den Sysmex XT 2000iV (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) verwendet und keine Korrelation zwischen mikroskopischer Zählung und dem Sysmex XT 2000iV (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) berechnet. Die Referenzbereiche für die manuell gezählten, relativen Retikulozytenzahlen für Kaninchen sind bei DETTWEILER (2015) und bei KAUFHOLD und Mitarbeitern (2016) fast identisch. Die gute bis mäßige Korrelation zwischen der manuellen Retikulozytenzählung und mittels Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) ist daher plausibel. Auch WEISSERTs (2011) Studie mit Hunde- und Katzenblut ergab ähnliche gute Korrelationen zwischen den Retikulozytenzählungen mittels Advia 120 (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) und den manuellen Retikulozytenzählungen (Hundeblut:  $r_s = 0,89$ , Katzenblut:  $r_s = 0,75$ ) (WEISSERT, 2011). BAUER und Mitarbeiter (2012) haben in ihrer Studie zur Retikulozytenzählung sowohl Korrelationen zwischen Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) und Sysmex XT 2000iV (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) errechnet, als auch jeweils zwischen Analysegerät und manueller Zählung. Zwischen den Analysegeräten zeigt sich dabei für Hundeblut eine sehr gute ( $r = 0,93$ ) und für Katzenblut eine mäßige ( $r = 0,70$ ) Korrelation bei der Retikulozytenzählung. Die Korrelationen zwischen den Retikulozytenzählungen der jeweiligen automatischen Analysegeräten und den manuellen Zählungen waren jedoch für beide Tierarten schlecht (siehe Tab.6). Die bereits zuvor beschriebenen guten Studienergebnisse von WEISSERT (2011) ließen anderes vermuten. Ursachen für die schlechten Korrelationen sind am wahrscheinlichsten in der mikroskopischen Zählung zu suchen (BAUER et al., 2012). Unzureichende Ausstrichqualität,

Färbeartefakte, Zelleinschlüsse, sowie eine nicht standardisierte Ausstrichbeurteilung können zu großen Unterschieden zwischen verschiedenen Untersuchern und zwischen manueller und automatischer Retikulozytenzählung führen (PEEBLES & HOCHBERG, 1981; KOEPKE & KOEPKE, 1986; SCHIMENTI et al., 1992; NEBE et al., 2010).

MATHERS und Mitarbeiter (2008) verglichen in ihrer Studie die Ergebnisse der Retikulozytenzählung des Sysmex XT 2000iV (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) mit denen des Advia 120 (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) nicht nur für Hundeblut, sondern auch für Ratten- und Mäuseblut. Ratten und Mäuse zählen, wie das Kaninchen, zum humoralen Reifungstyp und haben damit in der Regel vergleichbar hohe Retikulozytenzahlen im Blut (WIEMER, 1986). Während die Korrelation für die Retikulozytenzählung zwischen ADVIA 120 (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) und Sysmex XT 2000iV (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) für Hundeblut ( $r = 0,95$ ) sehr gut ausfielen, war die Korrelation bei Ratten- ( $r = 0,78$ ) und Mäuseblut ( $r = 0,76$ ) nur mäßig (MATHERS et al., 2008). Bei dem Vergleich der Retikulozytenzählungen der beiden Geräte stellten sie zudem fest, dass der Sysmex XT 2000iV (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) bei allen drei Tierarten höhere Retikulozytenzahlen misst, als der Advia 120 (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland). Als mögliche Ursache für die höhere Retikulozytenzahl nannten sie den Nachweis und die Einberechnung unreifer, RNS-reicher, juveniler Retikulozyten durch den Sysmex XT 2000iV (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland). Diese wurden vermutlich erkannt, weil der Sysmex (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) bei der Retikulozytenmessung die Zellen für alle Tierarten in vier, statt wie der Advia (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) nur in drei Gruppen einteilt (MATHERS et al., 2008). In der vorliegenden Studie finden sich ebenfalls Hinweise, die diese Vermutung bestärken. Neben den Retikulozytenzahlen der manuellen Zählung der Reifungsstadien I – IV wurden auch die Zahlen der Reifungsstadien II – IV zusammengefasst und mit den Advia-Ergebnissen verglichen. Dabei ergab der Methodenvergleich für die Retikulozytenzählung des Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) und der manuell gezählte Retikulozytenzahlen der Gruppen II – IV (Slope B = 0,99) das beste Ergebnis. Bei dem Vergleich der Gesamtzahlen der Reifungsstadien I – IV und II – IV zeigte sich ein höchst signifikanter Unterschied

( $p = 0,001$ ) zwischen den beiden Gesamtgruppen. Dieser Unterschied lässt sich auf Grund der hohen Retikulozytenzahlen in Gruppe I (22,3 %) erklären. Es ist daher wahrscheinlich, dass der Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) die jungen Retikulozyten der Gruppe I, wie von MATHERS und Mitarbeitern (2008) vermutet, tatsächlich nicht miterfasst. Für die Retikulozytenzählung ist dies jedoch klinisch relevant, da für Laborwerte nur Abweichungen bis  $\pm 10\%$  vom Ausgangswert toleriert werden dürfen (HEDBERG & LETHO, 2009). Da in der vorliegenden Studie schon über zehn Prozent der Retikulozyten beim Kaninchen im physiologischen, gesunden Zustand der Gruppe I angehören, muss angenommen werden, dass im Rahmen von erhöhter Regeneration und damit vermehrtem Auftreten von Retikulozyten der Gruppe I, auch der Messfehler zunimmt.

Die Messergebnisse der beiden Methoden weisen in dieser Studie einen negativ proportionalen Fehler auf, was den oben geäußerten Verdacht bestätigt. Die manuell ermittelten Retikulozytenzahlen liegen, wie zuvor bereits beschrieben, oberhalb der des Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland). Diese Diskrepanz nahm mit steigenden Retikulozytenzahlen weiter zu. Ähnliche Ergebnisse zeigt eine frühere Studie mit dem Advia 120 (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) mit Hunde- und Katzenblut (WEISSERT, 2011). Dabei trat bei der Auswertung der relativen und absoluten Retikulozytenzahlen bei Katzenblut ebenfalls ein geringer negativ proportionaler Fehler zwischen den Ergebnissen des Advia 120 (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) und denen des Lasercytes (Idexx, Ludwigsburg, Deutschland) auf. Bei Hunde- und Katzenblut werden die Retikulozytenzahlen bei hohen Zellzahlen auch vom Lasercyte (Idexx, Ludwigsburg, Deutschland) unterschätzt (WEISSERT, 2011).

Die größere Abweichung der Messergebnisse zwischen dem Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) und der manuellen Zählung bei steigenden Retikulozytenzahlen lässt sich in dieser Studie damit begründen, dass sich im Rahmen von Retikulozytosen das Retikulozytenreifegradverhältnis von Gruppe IV in Richtung Gruppe I und II verschiebt (GILMER & KOEPKE, 1976). Retikulozytosen können laut GÜSSOW (2017) physiologische und pathologische Ursachen haben. Jedoch kommt es bei vermehrter Erythropoese immer zu einer Verschiebung der Retikulozytenstufen in Richtung juveniler

Retikulozyten und damit zu der Umverteilung der Reifungsgrade (HEILMEYER, 1931).

Um zufällige Ergebnisse ausschließen zu können und die **Reproduzierbarkeit** der Ergebnisse zu überprüfen, wurde in dieser Studie für beide Methoden zusätzlich der Variationskoeffizient (CV) der Messergebnisse bestimmt (JENSEN & KJELGAARD-HANSEN, 2006). Wie vorgegeben wurden manuell mindestens 2000 Erythrozyten pro Blutprobe zur Retikulozytenbestimmung ausgezählt (NCCLS, 2004). Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der relativen und absoluten Retikulozytenzählungen mittels Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) ist in dieser Studie gut (EDTA: relative Retikulozytenzahl CV = 4,2 %, absolute Retikulozytenzahl CV = 5,6 %; Li-Heparin: relative Retikulozytenzahl CV = 3,6 %, absolute Retikulozytenzahl CV = 3,8 %).

Verschiedene Dissertationen der Justus-Liebig-Universität Gießen haben sich ebenfalls mit diesem Thema befasst. Dabei wurde die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des Advia 120 (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) und des Sysmex XT 2000iV (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) für die Retikulozytenzählung bei Blutproben von Hunden, Katzen, Rindern, Schweinen und Schafen bewertet (HOLSTEG, 2002; DURA, 2005; MEYER, 2005; DUNKER, 2010; WEISSERT, 2011). Diese Studien arbeiteten jedoch, im Gegensatz zu der vorliegenden Kaninchenstudie, mit dem Vorgängermodell Advia 120 (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland).

WEISSERT (2011) ermittelte für den Advia 120 (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) eine mäßige Reproduzierbarkeit für die relativen (CV = 10,3 %) und absoluten (CV = 9,9 %) Retikulozytenzahlen in Hundeblood. Eine ebenfalls mäßige Reproduzierbarkeit (CV = 9,4 – 12,1 %) stellte MEYER (2005) für die Retikulozytenzählung mittels Advia 120 (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) in Katzenblut und DURA (2005) in Schweineblut (CV = 9,8 %) fest. HOLSTEG (2002) ermittelte für Rinderblutproben eine schlechte Reproduzierbarkeit der Retikulozytenzählung (CV = 37,9 – 61,2 %). Ursache für die starke Streuung der Messergebnisse könnten in diesem Fall, wie von WIEMER (1986) und HOLSTEG (2002) beschrieben, die allgemein sehr niedrigen Retikulozytenzahlen bei Rindern sein. DUNKER (2010) erzielte mit dem Sysmex XT 2000iV (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland)

bei Hundeblut eine gute Reproduzierbarkeit ( $CV = 7,7 - 7,8 \%$ ). Damit ergeben sich, im Gegensatz zu dieser Studie mit guter Reproduzierbarkeit, für die Retikulozytenzählungen bei den meisten Tierarten, mit Ausnahme von Rindern, und abhängig vom Analysegerät insgesamt ähnlich mäßige Reproduzierbarkeiten. Der Gerätehersteller SIEMENS HEALTH CARE DIAGNOSTICS (2010) gibt für den Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) für die relativen und absoluten Retikulozytenzahlen einen CV von 13,3 % an. Damit weisen sowohl diese Studie, als auch die anderen genannten Studien sogar eine geringere Streuung, als vom Hersteller angegeben, auf. Die neueren Geräte Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) und Sysmex XT 2000iV (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) weisen, wie weiter vorne beschrieben, zudem Werte mit geringerer Streuung auf, als das ältere Model Advia 120 (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland).

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der manuellen Retikulozytenzählung fiel in dieser Studie deutlich schlechter aus, als die des Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) (EDTA: relative Retikulozytenzahl  $CV = 17,1 \%$ , absolute Retikulozytenzahl  $CV = 17,2 \%$ ; Li-Heparin: relative Retikulozytenzahl  $CV = 16,7 \%$ , absolute Retikulozytenzahl  $CV = 18,2 \%$ ). Diese Ergebnisse decken sich mit einer früheren Studie von GILMER und KOEPKE (1976), die bei der manuellen Retikulozytenzählung je nach Untersucher Variationskoeffizienten von 15 bis 40 Prozent ermittelten. Auch SAVAGE und Mitarbeiter (1985) errechneten in ihrer Studie eine schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der manuellen Retikulozytenzählung ( $CV = 20 - 50 \%$ ) bei Menschenblut. Eine ähnliche hohe Streuung der Ergebnisse bei Menschenblut ( $CV = 8,3 - 44,2 \%$ ) erhielten auch FERGUSON und Mitarbeiter (1990).

Da in der vorliegenden Studie kein zweites Analysegerät zur Verfügung stand, wurde die manuelle Zählung hier, wie in den Richtlinien des ICSH vorgeschlagen, als Standardmethode für den Vergleich mit dem Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) verwendet (NCCLS, 2004). Um den Richtlinien des ICSH zu entsprechen und einen möglichst genauen Standard zu gewährleisten, wurden die Proben doppelt ausgezählt (2000 Erythrozyten) und der Durchschnitt beider Zählungen als Vergleichswert verwendet.

PEEBLES und Mitarbeiter (1981) sowie NEBE und Mitarbeiter (2010) geben in ihrer Studie den Mensch als größte Fehlerquelle der manuellen

Zelldifferenzierung an. Schon bei der manuellen Probenverarbeitung können Fehler auftreten. Ungenügendes Mischen der Probe, Färbefehler und schlechte Ausstrichqualität können die anschließende Zählung bereits von vornherein negativ beeinflussen (NCCLS, 2004; NEBE et al., 2010). Die Genauigkeit der manuellen Zählung selbst hängt ebenfalls vor allem vom Zählpersonal ab (KOEPEKE & KOEPKE, 1986; NEBE et al., 2010). PEEBLES und Mitarbeiter (1981) stellten in ihrer Studie große Unterschiede zwischen den Untersuchern fest. Dazu ließen sie sieben Personen über fünf Wochen jeweils die gleichen Blutausrichungen bewerten. Als Hauptfehlerquelle erkannten sie die individuellen Zählkriterien der einzelnen Untersucher. Vor allem Retikulozyten mit nur einzelnen Granula wurden unterschiedlich bewertet (PEEBLES et al., 1981). Auch SAVAGE und Mitarbeiter (1985) geben an, dass die Einteilung der Retikulozyten eine wesentliche Rolle bei der Zählung spielt und eine der Hauptfehlerquellen bei der korrekten Zuordnung der Retikulozyten ist. Die Fehlerquote kann bei nicht konsequent angewandter Einteilung der Retikulozytenmorphologie bis zu 30 % erreichen (SAVAGE et al., 1985). Laut PEEBLES und Mitarbeitern (1981) ist die größte Variation der Ergebnisse dabei auf Retikulozyten der Gruppe IV zurückzuführen. Häufig war bei diesen Zellen unklar, bis wann sie noch zu den Retikulozyten gehören oder schon zu Erythrozyten gezählt werden (PEEBLES et al., 1981). Zu diesem Ergebnis kamen auch HEILMEYER und WESTHÄUSER (1932) und GILMER und KOEPKE (1976). Aus diesem Grund modifizieren und spezifizierten GILMER und KOEPKE (1976) die Gruppe IV. Zu den Retikulozyten sollten bei der mikroskopischen Zählung nur noch Zellen mit mindestens zwei Granula gezählt werden, die ohne große Justierung des Okulars zu sehen waren. Alle anderen Zellen sollten als Erythrozyten gezählt werden (GILMER & KOEPKE, 1976).

In der vorliegenden Studie wurden die Kaninchenretikulozyten von Beginn an von nur einer Person konsequent in Gruppen nach HEILMEYER (1931), modifiziert nach GILMER und KOEPKE (1976), eingeteilt und nach diesem Schema gezählt (Tab. 3, Abb. 1). Der große Unterschied zwischen den Ergebnissen der Retikulozytenzählungen der manuellen Zählung und der des Advia kann u. a. damit begründet werden, dass trotz der korrekten Retikulozyteneinteilung und Doppelzählung nur 2000 Erythrozyten ausgezählt wurden, während der Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) bei jeder

Probenanalyse circa 50.000 Erythrozyten ausgewertet und so wesentlich genauer sein kann. Zudem wurden die Blutproben für die Auswertung der Reproduzierbarkeit fünfmal am Advia gemessen aber manuell nur zweimal ausgezählt, was wiederum die Reproduzierbarkeit der Retikulozytenzahlen am Advia (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) verbessert. Auffällig war außerdem, dass der CV in der vorliegenden Studie zunahm, je weniger Retikulozytengruppen (Gruppe I, II, III, IV) bei der manuellen Zählung zusammengefasst wurden. Auch die jeweiligen einzelnen Gruppen wiesen einen hohen CV auf. Dies kann mit der von MIALE (1977) beschriebenen unterschiedlichen zahlenmäßigen Zusammensetzung der verschiedenen Retikulozytengruppen I bis IV im Blutausschlag erklärt werden. Er stellte in seiner Studie beim Mensch eine zufällige Verteilung der Retikulozyten zwischen den Erythrozyten im Ausschlag fest. Das bedeutet, dass die Gesamtzahl bei jeder Auswertung nur gering variiert, die Zusammensetzung der einzelnen Gruppen jedoch jedes Mal unterschiedlich ausfallen kann (MIALE, 1977). Aus diesem Grund ist die Reproduzierbarkeit aller Retikulozytengruppen (I – IV) zusammengefasst in der vorliegenden Studie besser, als die für jede Gruppe allein.

Laut ICSH können sowohl EDTA als auch Li-Heparin als **Antikoagulantia** für Blutproben verwendet werden (NCCLS, 2004). Ihre hemmende Wirkung auf die Blutgerinnung ist jedoch unterschiedlich. EDTA bindet Kalzium-Ionen, die zur Aktivierung der Faktoren II, VII, IX und X notwendig sind (HORN et al., 2005, KASPERS & GÖBEL, 2010). Das Li-Heparin hingegen verhindert die Aktivierung von Fibrinogen zu Fibrin, in dem es an das Antithrombin III bindet (HORN et al., 2005). Das ICSH empfiehlt zur Messung der Retikulozytenzahlen mit EDTA antikoaguliertes Blut zu verwenden, da für Li-Heparin hierzu noch keine ausreichenden Studien vorliegen (NCCLS, 2004). In einigen Studien mit Rinder-, Katzen-, Hunde- und Schweineblut wurde bereits EDTA mit Li-Heparin verglichen und dabei eine vermehrte Bildung von Aggregaten bei mit Li-Heparin antikoaguliertem Blut festgestellt (HOLSTEG, 2002; DURA, 2005; MEYER, 2005; BAUER et al., 2012). HOLSTEG (2002) kam zu dem Fazit, dass Li-Heparin bei Verwendung des Advia 120 (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) deshalb als Antikoagulantium für Rinderblut nicht geeignet ist. Bei direktem Vergleich der relativen und absoluten Retikulozytenzahlen konnte jedoch in keiner der oben genannten Studien ein signifikanter Unterschied



zwischen den beiden Antikoagulantia aufgezeigt werden (HOLSTEG, 2002; DURA, 2005; MEYER, 2005; BAUER et al., 2012). Nur bei der Messung von humanen Retikulozyten stellten NEBE und Mitarbeiter (2010) einen signifikanten Unterschied zwischen EDTA- und Li-Heparinblut fest. Unter Einfluss von Li-Heparin waren die Retikulozytenzahlen signifikant höher als in EDTA-Blutproben (NEBE et al., 2010). Sie kamen zu der Erkenntnis, dass mit Li-Heparin antikoaguliertes Blut durch Aggregationen der Erythrozyten und Thrombozyten zu falsch hohen Retikulozytenzahlen führen kann (NEBE et al., 2010). Gleiches bestätigten auch SAKOGUCHI und Mitarbeiter (2014). Sie untersuchten den Einfluss von Li-Heparin auf die Thrombozytenmessung bei Menschenblut und stellten fest, dass sich mehr Thrombozytenaggregate bildeten, wenn Li-Heparin verwendet wurde, als bei der Verwendung von EDTA (SAKOGUCHI et al., 2014). Zusätzlich konnten sie beweisen, dass die Menge an Aggregaten zunahm, wenn die Li-Heparin-Blutprobe längere Zeit der Luft ausgesetzt war. Wurde die Li-Heparin-Blutprobe vor der Analyse aber in der Spritze ohne Luftzufuhr belassen, traten weniger Aggregate auf. Bei mit EDTA antikoaguliertem Blut beschrieben sie dies nicht (SAKOGUCHI et al., 2014).

In der vorliegenden Studie war die Retikulozytenzahl in den Kaninchenblutproben bei Verwendung von Li-Heparin als Antikoagulantium ebenfalls signifikant höher als bei Verwendung von EDTA. Eine vermehrte Aggregation von Erythrozyten und Thrombozyten ist auch hier eine mögliche Ursache für die höheren Retikulozytenzahlen. Da die Blutröhrchen meist mit frei hineintropfenden Blut befüllt wurden, könnten sich die Aggregate, wie von SAKOGUCHI und Mitarbeitern (2014) beschrieben, auch vermehrt auf Grund des langen Luftkontakts gebildet haben. Der Unterschied zwischen den Retikulozytenzahlen aus den EDTA- und den Li-Heparinblutproben ist in dieser Studie zwar signifikant, jedoch weichen die Zahlen beim Vergleich der absoluten Retikulozytenzahlen weniger als zehn Prozent voneinander ab. Laut HEDBERG und LETHO (2009) hat nur eine Abweichung von mehr als zehn Prozent auch tatsächlich klinische Relevanz. Abgesehen davon, dass die Retikulozytenzahlen bei mit Li-Heparin stabilisierten Blutproben also leicht höher ausfallen können, ist Li-Heparin also ebenfalls als Antikoagulantium für die Retikulozytenmessung von Kaninchenblutproben geeignet. Zur Blutentnahme sollten bei Verwendung von Li-Heparin-Röhrchen, wenn möglich, Vacutainer verwendet werden, um den

Kontakt mit Luft zu minimieren. Steht EDTA-Blut zur Verfügung, sollte dieses vorrangig zur Retikulozytenanalyse verwendet werden.

Der Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) eignet sich somit für die Retikulozytenzählung auch bei Kaninchenblut. Allerdings sollte, im Hinblick auf die steigende Diskrepanz der Ergebnisse zwischen Advia (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) und Handzählung, bei hohen Retikulozytenzahlen eine manuelle Kontrolle und eine Beurteilung der Reifungsstadien in Erwägung gezogen werden.

Als **Limitation dieser Studie** müssen verschiedene Punkte berücksichtigt werden. So wäre z. B. ein Vergleich mit einem zusätzlichen Analysegerät wünschenswert gewesen. In dieser Studie wurden die Ergebnisse der manuellen Retikulozytenzählung nur mit denen des Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) verglichen. Laut ICSH ist die manuelle Zählung zwar als Goldstandard geeignet, sie kann jedoch durch viele Faktoren, wie Proben-, Ausstrich- und Färbequalität sowie den Untersucher selbst, beeinflusst werden (NCCLS, 2004).

Des Weiteren wäre eine Berücksichtigung von Normoblasten in dieser Studie gut gewesen. Die Ergebnisse der manuellen Zählungen (I – IV) wichen vor allem auf Grund der Einbeziehung der juvenilen Retikulozyten der Gruppe I von den Ergebnissen des Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) ab. Möglicherweise wurden die Gruppe-I-Retikulozyten auf Grund der hohen RNS-Konzentration und –dichte vom Gerät zu den Normoblasten und nicht zu den Retikulozyten gezählt. Eine zusätzliche Zählung der Normoblasten wäre also hilfreich für die Interpretation gewesen.

Bei dem Vergleich der Antikoagulantia wäre eine größere Probenzahl wünschenswert gewesen. In dieser Studie konnten nur neun Blutproben verglichen werden, da nach den anderen Analysen für den Vergleich nur noch diese Probenpaare (sowohl EDTA- und Li-Heparinblut pro Tier) mit ausreichend Probenvolumen zur Verfügung standen. Bei dem Vergleich der Antikoagulantia könnte bei mehr Probenvolumen zudem ein zusätzlicher Vergleich von manueller und automatischer Thrombozytenzählung stattfinden, um das Auftreten von Aggregaten in den jeweiligen Antikoagulantia zu dokumentieren. Weiterhin

wünschenswert wäre ein Vergleich von Blutproben mit unterschiedlichen Antikoagulantien, gewonnen durch verschiedene Entnahmetechniken (Tropfen, Vacutainer, Aspiration mit aufgesetzter Spritze), um zu sehen, ob sich unter möglichst wenig Luftkontakt tatsächlich weniger Thrombozytenaggregate bilden und sich dadurch die Ergebnisse der automatischen Retikulozytenmessung ändern.

Da nicht alle Proben vom Studienleiter selbst entnommen und verarbeitet wurden und somit hier das präanalytische Handling unbekannt war, wäre es bei einer erneuten Studie zudem sinnvoll, nur Proben zu verwenden, die unter standardisierten Bedingungen entnommen und verarbeitet werden, um präanalytische Fehler im Vorfeld ausschließen zu können.

Der Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) ist für die Retikulozytenzählung bei Kaninchen geeignet. Im Vergleich mit der manuellen Zählung sind die Messergebnisse des Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) allerdings im Mittel zumeist niedriger. Dies ist vor allem bei sehr hohen Retikulozytenzahlen in Gruppe I zu beobachten. Soll die Regeneration bei einer Anämie beurteilt werden, ist deshalb, gerade bei hohen Retikulozytenzahlen, eine mikroskopische Kontrolle der Messergebnisse zu empfehlen. Li-Heparin kann zwar als Antikoagulantium auch für Kaninchenblut verwendet werden, besser geeignet ist aber das auch vom ICSH empfohlene EDTA zur Stabilisierung der Proben.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Retikulozytenzählung dient der Beurteilung der erythropoetischen Leistung des Knochenmarkes und der Einteilung von Anämien. Während dieses Verfahren in der Humanmedizin regelmäßig genutzt wird, steht es in der Tiermedizin als Standardverfahren bisher nur für Hunde und Katzen zur Verfügung. Für Kaninchen gibt es bisher nur wenige Studien darüber, ob auch bei dieser Tierart zur Retikulozytenzählung auf vollautomatische Blutanalysegeräte zurückgegriffen werden kann. Der Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) wurde bisher in keiner dieser Studien verwendet. Von Juni 2013 bis Dezember 2014 wurden deshalb Blutproben von 331 Kaninchen gesammelt (Methodenvergleich  $n = 298$ , Reproduzierbarkeit  $n = 33$ , Antikoagulantavergleich  $n = 9$ ) und die Retikulozytenzahlen sowohl mikroskopisch manuell als auch mit dem Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) bestimmt. Der Methodenvergleich wurde nach Bland-Altman und Passing-Bablok durchgeführt.

Die manuell gezählten Retikulozyten wurden in Gruppe I – IV nach HEILMEYER (1931), modifiziert nach GILMER und KOEPKE (1976) eingeteilt. Hierbei zeigt der Methodenvergleich eine gute Korrelation ( $r_s = 0,81$ ) zwischen manueller Retikulozytenzählung (Gruppe I – IV) und den Analyseergebnissen des Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland). Die Reproduzierbarkeit der Advia-Ergebnisse waren für die relativen (EDTA: CV = 4,24 %; Li-Heparin: CV = 3,63 %) und absoluten Retikulozytenzahlen (EDTA: CV = 5,64 %; Li-Heparin: CV = 3,81 %) sehr gut. Beim Antikoagulantavergleich waren die absoluten ( $p = 0,009$ ) und relativen Retikulozytenzahlen ( $p = 0,016$ ) in Li-Heparin-stabilisierten Blutproben signifikant höher als in Proben vom gleichen Tier, die mit EDTA stabilisiert wurden. Die Abweichung war jedoch unter 10 % und ist somit nicht klinisch relevant.

Der Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) ist für die Retikulozytenzählung beim Kaninchen geeignet. Im Vergleich mit der manuellen Zählung sind die Messergebnisse des Advia 2120i (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) im Mittel aber zumeist niedriger. Dies ist vor allem dann zu beobachten, wenn in der Probe sehr viele junge Retikulozyten der Gruppe I zu finden waren. Eine mikroskopische Kontrolle der Advia-Messergebnisse ist deshalb gerade bei hohen Retikulozytenzahlen zu empfehlen, um Anämien besser

beurteilen zu können. Li-Heparin kann auch bei Kaninchen als Antikoagulantium verwendet werden, vorzuziehen ist aber das von dem ICSH empfohlene EDTA, da es zu weniger Agglutinationen und Mikrogerinnseln führt.

## VI. SUMMARY

Reticulocyte numbers are important to estimate the erythropoietic activity of the bone marrow and thus for classification of anemia. While this method is commonly used in human medicine, it is just used regularly for cats and dogs in veterinary medicine. Yet, there are only few studies considering the applicability of rabbit blood in fully automated blood analyzers. The Advia 2010i was not part of any of these studies yet. Therefore, blood samples of 331 rabbits (method comparison  $n = 298$ , reproducibility  $n = 33$ , comparison of anticoagulants  $n = 9$ ) were collected between June 2013 and December 2014 and reticulocyte numbers were counted manually and with the Advia 2120i. Method comparison was evaluated statistically with Bland-Altman and Passing-Bablok. Manually counted reticulocytes were classified in group I – IV by HEILMEYER (1931), modified by GILMER and KOEPKE (1976). Correlation was good ( $r_s = 0.81$ ) between Advia 2120i measurements and manually counted reticulocytes (group I – IV). Reproducibility of the Advia results were excellent for the relative (EDTA: CV = 4.24 %; Li-heparin: CV = 3.63 %) and the absolute reticulocyte numbers (EDTA: CV = 5.64 %; Li-heparin: CV = 3.81 %). When anticoagulants were compared, absolute ( $p = 0.009$ ) and relative ( $p = 0.016$ ) reticulocyte numbers were significant higher in Li-heparin stabilized blood than in EDTA stabilized blood samples. However, the deviation was less than 10 % and therefore not clinically relevant.

The Advia 2120i is suitable for the measurement of rabbit reticulocytes. In comparison with the manual reticulocyte counting, the results of the Advia 2120i were most of the time lower than the results of the manual reticulocyte count. These findings especially occurred, when high numbers of juvenile reticulocytes (group I) were present in the blood sample. Thus, a microscopic control of the measured Advia 2120i results is recommended for anemia classification, when marked numbers of reticulocytes occur. Li-heparin stabilized blood can be used for reticulocyte counting in rabbits, but preferably EDTA should be used, which is also recommended by the ICSH due to less clotting and aggregation.



## VII. LITERATURVERZEICHNIS

Alsaker RD, Laber J, Stevens J, Perman V. A comparison of polychromasia and reticulocyte counts in assessing erythrocytic regenerative response in the cat. *J Am Vet Med Assoc.* 1977; 170: 39 – 41.

Bauer N, Moritz A. Evaluation of three methods for measurement of hemoglobin and calculated hemoglobin parameters with the ADVIA 2120 and ADVIA 120 in dogs, cats, and horses. *Vet Clin Path.* 2008; 37: 173 – 9.

Bauer N, Nakagawa J, Dunker C, Failing K, Moritz A. Evaluation of the automated hematology analyzer Sysmex XT-2000iV compared to the ADVIA 2120 for its use in dogs, cats, and horses. Part II: Accuracy of leukocyte differential and reticulocyte count, impact of anticoagulant and sample aging. *J Vet Diagn Invest.* 2012; 24: 74 – 89.

Brecher G. New methylene blue as a reticulocyte stain. *Am J Clin Pathol.* 1949; 19: 895.

Brown IW, JR, Eadie GS. An analytical study of in vivo survival of limited populations of animal red blood cells tagged with radio-iron. *J Gen Physiol.* 1953; 36: 327 – 43.

Bruce DC. The Hematopoetic System. In: Weiss DJ, Wardrop KJ editors. *Schalm's Veterinary Hematology.* 6. ed, Iowa, USA: Wiley Blackwell; 2010. p. 27 – 35.

Burwell EL, Brickley BA, Finch CA. Erythrocyte life span in small animals; comparison of two methods employing radioiron. *Am J Physiol* 1953, 172: 718 – 24.

Buttarelo M, Bulian P, Farina G, Temporin V, Toffolo , Trabuio E, Rizzotti P. Flow cytometric reticulocyte counting. Parallel evaluation of five fully automated analyzers: an NCCLS-ICSH approach. *Am J Clin Pathol.* 2001; 115: 100 – 11.



Buttarello M, Bulian P, Pra MD, Barbera P, Rizzotti P. Reticulocyte quantification by Coulter MAXM VCS (volume, conductivity, light scatter) technology. *Clin Chem.* 1996; 42: 1930 – 7.

Card RT, Valberg LS. Characteristics of shortened survival of stress erythrocytes in the rabbit. *Am J Physiol.* 1967; 213: 566 – 72.

Christian J. Erythrokinetics and Erythrocyte Destruction. In: Weiss DJ, Wardrop KJ editors. *Schalm's Veterinary Hematology.* 6. ed, Iowa, USA: Wiley Blackwell; 2010. p. 136 – 43.

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

Dettweiler A. Ursachen und Schweregrad von Anämien bei Heimtierkaninchen. Eine retro- und prospektive Studie [Dissertation]. Berlin: Freie Universität Berlin; 2015.

Duden. Band.1. In: Dudenredaktion Hrsg. *Die deutsche Rechtschreibung.* 27. ed, Berlin, Deutschland: Dudenverlag Berlin; 2017.

Dura A. Blutzellzählung und -differenzierung bei Pferd und Schwein mit dem Hämatologiesystem ADVIA 120: Gerätevalidierung und Softwareadaptation [Dissertation]. Gießen: Justus-Liebig-Universität; 2005.

Dunker C. Evaluation der Hämatologiesysteme Sysmex pochH-100iV Diff und XT-2000iV für die Tierart Hund [Dissertation]. Gießen: Justus-Liebig-Universität, 2010.

Eder H, Fritsche H. Automated microfluorometric absolute count and maturation analysis of reticulocytes. *Klin Wochenschr.* 1989; 67: 1048 – 57.

Ehrlich P. Beobachtungen am anämischen Blut. *Berliner Klin Wochenschr.* 1881: 43 – 44.

Engelbrecht HM, Remmele W. Der Einfluss von Erythropoietin und somatotropem Hormon auf die Retikulozyten-Reifungszeit in vitro. *Blut*. 1969; 19: 385 – 93.

Erb W. Zur Entwicklungsgeschichte der roten Blutkörperchen. *Virchows Arch Path Anat Physiol*. 1865; 34: 138 – 93.

Evans GO, Fagg, R.. Reticulocyte Counts in Canine and Rat Blood made by Flow Cytometry. *J Comp Path*. 1994; 111: 107 – 11.

Ferguson DJ, Lee SF, Gordon PA. Evaluation of reticulocyte counts by flow cytometry in a routine laboratory. *Am J Hematol*. 1990; 33: 13 – 7.

Fuchs A, Eder H. Number and maturation distribution of the reticulocytes from six animal species. *Zentralbl Veterinarmed A*. 1991; 38: 749 – 54.

Geminard C, de Gassart A, Vidal M. Reticulocyte maturation: mitoptosis and exosome release. *Biocell*. 2002; 26: 205 – 15.

Gilmer PR Jr, Koepke JA. The reticulocyte. An approach to definition. *Am J Clin Pathol*. 1976; 66: 262 – 7.

Güssow A. Zur Retikulozytose ohne begleitende Anämie und dem erhöhten retikulozytären Hämoglobingehalt (CHr) bei Hunden [Dissertation]. Gießen: Justus-Liebig-Universität; 2017.

Hedberg P, Lehto T. Aging stability of complete blood count and white blood cell differential parameters analyzed by Abbott CELL-DYN Sapphire hematology analyzer. *Int J Lab Hematol*. 2009; 31: 87 – 96.

Heilmeyer L. Blutfarbstoffwechselstudien: Probleme, Methoden, und Kritik der Whippleschen Theorie. *Dtsch Arch Klein Med*. 1931; 171: 123 – 53.

Heilmeyer L, Westhäuser R Reifungsstadien an überlebenden Reticulozyten in vitro und ihre Bedeutung für die Schätzung der täglichen Hämoglobinproduktion in vivo. *Z Klin Med.* 1932; 121: 361 – 655.

Heimpel H, Diem H, Nebe T. Counting reticulocytes: new importance of an old method. *Med Klein.* 2010; 105: 538 – 43.

Hergert W, Wried T. From Electromagnetic Scattering to an Electromagnetic View of Matter. In: Hergert W, Wriedt T, editors. *The Mie Theory Basics and Applications.* 1 ed. Berlin-Heidelberg, Deutschland: Springer-Verlag, 2012. p. 27 – 33.

Holsteg M. Softwareadaptation und begleitende Evaluation des Hämatologiesystems ADVIA 120 für die Tierart Rind: Erstellung von hämatologischen Referenzbereichen für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und deutsches Fleckvieh [Dissertation]. Gießen: Justus-Liebig-Universität; 2002.

Horn F, Moc I, Schneider N, Grillhösl C, Berghold S, Lindenmeier G. Das Blutplasma In: *Biochemie des Menschen*, 3. Aufl. Stuttgart, Deutschland: Thieme Verlag, 2005. S. 511 – 2.

Jensen AL, Kjelgaard-Hansen M. Method comparison in the clinical laboratory. *Vet Clin Pathol.* 2006; 35: 276 – 86.

Kabata J, Gratwohl A, Tichelli A, John L, Speck B. Hematologic values of New Zealand white rabbits determined by automated flow cytometry. *Lab Anim Sci.* 1991; 41: 613 – 9.

Kaufhold A, Hirschberger J, Reese S, Foerster G, Hein J. Retikulozytenzahlen beim Kaninchen – Referenzwerte und Vergleich der manuellen und automatischen Zählung mit dem Advia 2120i. Poster-Abstract 1. DVG Thementagung Kleinsäuger, Augsburg 25.06.2016. *Kleintierpraxis* 2016; 7: 402 – 3.

Kaspers B, Göbel T. Blutstillung und Blutgerinnung In: Von Engelhardt W. Hrsg. Physiologie der Haustiere. 3. ed., Stuttgart, Deutschland: Enke Verlag, 2010. S. 212 – 9.

Koepke JF., Koepke JA. Reticulocytes. Clin Lab Haematol. 1986; 8: 169 – 79.

Lippi G, Salvagno GL., Solero GP, Franchini M, Guidi GC. Stability of blood cell counts, hematologic parameters and reticulocytes indexes on the Advia A120 hematologic analyzer. J Lab Clin Med. 2005; 146: 333 – 40.

Marvin HN, Lucy DD. The survival of radiocobalt-tagged erythrocytes in pigeons, ducks and rabbits. Acta Haematol. 1957; 18: 239 – 45.

Mathers R, Evans G, Bleby J, Tornow T. Evaluation of the Sysmex XT-2000iV haematology analyser for rat, dog and mouse whole blood samples. Comp Clin Pathol. 2008; 17: 137 – 44.

McLaughlin RM, Fish RE. Clinical biochemistry and hematology. In: Manning P, Ringer D, Newcomer C. editors. The Biology of the Laboratory Rabbit. 2. ed., New York, USA: Academic Press, 1974. p. 111 – 27.

Meyer K. Softwareadaptation und Evaluation des Advia 120 bei der Tierart Katze [Dissertation] Gießen: Justus-Liebig-Universität; 2005.

Miale JB. Laboratory medicine, hematology. 5. ed., St. Louis, USA: CV. Mosby Co, 1977. p. 561 – 2.

Moritz A, Fickenscher Y, Meyer K, Failing K, Weiss DJ. Canine and feline hematology reference values for the ADVIA 120 hematology system. Vet Clin Path. 2004; 33: 32 – 8.

NCCLS. Methods for Reticulocyte Counting (Automated Blood Cell Counters, Flow Cytometry, and Supravital Dyes); Approved Guideline. In: NCCLS document H44-A2. 2.ed., Pennsylvania, USA: 2004.

Nebe C, Diem H, Heimpel H. Aktuelle Aspekte zur Bestimmung der Retikulozytenzahl. *J Lab Med.* 2010; 34: 295 – 304.

Neuberger A, Niven JS. Haemoglobin formation in rabbits. *J Physiol.* 1951; 112: 292 – 310.

Olver CS. Erythropoiesis. In: Weiss DJ, Wardrop KJ editors. *Schalm's Veterinary Hematology.* 6.ed, Iowa, USA: Wiley Blackwell; 2010. p.36 – 42.

Olver CS, Andrews GA, Smith JE, Kaneko JJ. Erythrocyte Structure and Function. In: Weiss DJ, Wardrop KJ editors. *Schalm's Veterinary Hematology.* 6. ed, Iowa, USA: Wiley Blackwell; 2010. p.123 – 30.

Peebles DA, Hochberg A, Clarke TD. Analysis of manual reticulocyte counting. *Am J Clin Pathol.* 1981; 76: 713 – 7.

Piva E, Brugnara C, Chiandetti L, Plebani M. Automated reticulocyte counting: state of the art and clinical applications in the evaluation of erythropoiesis. *Clin Chem Lab Med.* 2010; 48: 1369 – 80.

Pschyrembel W. *Pschyrembel - Klinisches Wörterbuch.* 266. Aufl., Berlin/Boston: De Gruyter, 2014.

Püsch M. *Hämatologiesystem ADVIA 120, Softwareadaptation und Evaluation bei den Tierarten Schaf und Ziege [Dissertation].* Gießen: Justus-Liebig-Universität; 2002.

Riley RS, Ben-Ezra JM., Goel R, Tidwell A. Reticulocytes and reticulocyte enumeration. *J Clin Lab An.* 2001; 15: 267 – 94.

Sakoguchi T, Fujii S, Inuzumi K, Kaminoh Y, Hirose M, Masaki M, Koshiba M. Verification of complete blood cell count (CBC) data from heparinized blood gas samples. *Rinsho Byori.* 2014; 62: 139 – 46.

Savage R, Skoog D, Rabinovitch A. Analytical bias and imprecision in reticulocyte counting. A preliminary report from the College of American Pathology Reticulocyte Project. *Blood Cells*. 1985; 11: 97 – 112.

Schäfers A. Hämatologische und klinische Referenzwerte für Hunde [Dissertation]. München: Ludwig-Maximilian Universität; 2013.

Schimenti KJ, Lacerna K, Wamble A, Maston L, Iaffaldano C, Straight M, Rabinovitch A, Lazarus HM, Jacobberger JW. Reticulocyte quantification by flow cytometry, image analysis, and manual counting. *Cytometry*. 1992; 13: 853 – 62.

Smith T. On changes in the red blood cell corpuscles in the pernicious anemia of Texas cattle fever. *Trans Assoc Am Phys*. 1891; 6: 263.

Siemens Health Care Diagnostics. Operator's guide. In: Advia 2210/2120i Hemaotology Systems. Erlangen, Deutschland: Siemens Health Care Diagnostics, 2010; 308 – 43.

Steinberg J D, Olver CS. Hematologic and biochemical abnormalities indicating iron deficiency are associated with decreased reticulocyte hemoglobin content (CHr) and reticulocyte volume (rMCV) in dogs. *Vet Clin Pathol*. 2005; 34: 23 – 7.

Sysmex Deutschland GmbH. XT-2000iV – Fluoreszenz-Durchflusszytometrie in der Tierblutanalytik. Norderstedt, Deutschland: Sysmex Xtra 2, 2007; 1 – 10.

Tvedten H. Laboratory and Clinical Diagnosis of Anemia. In: Weiss DJ, Wardrop KJ editors. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6.ed, Iowa, USA: Wiley Blackwell; 2010. p. 152 – 61.

Vacha J. Red cell life span. In: *Red Blood Cells of Domestic Mammals*. New York, USA: Elsevier, 1983.

Vömel T, Platt D. Lifespan of rabbit erythrocytes and activity of the reticulohistiocyte system. *Mech Ageing Dev*. 1981; 17: 261 – 6.

Weiser M G, Kociba GJ. Persistent macrocytosis assessed by erythrocyte subpopulation analysis following erythrocyte regeneration in cats. *Blood*. 1982; 60: 295 – 303.

Weiss DJ, Moritz A. Equine immune-mediated hemolytic anemia associated with *Clostridium perfringens* infection. *Vet Clin Pathol*. 2003; 32: 22 – 6.

Weissert D. Lasergestützte Erythrozytenanalyse (ADVIA® 120 und LaserCyte®) bei Hund und Katze mit Auswertung der Erythrozytenmorphologie [Dissertation] Gießen: Justus-Liebig-Universität; 2011.

Wells MY, Decobecq CP, Decouvelaere DM, Justice C, Guittin P. Changes in clinical pathology parameters during gestation in the New Zealand white rabbit. *Toxicol Pathol*. 1999; 27: 370 – 9.

Wiemer U. Die tierartliche Verschiedenheit der Retikulozyten-Reifegradverteilung und deren Beeinflussung durch Erythropoietin bei der normozythämischen Ratte. [Dissertation]. Gießen: Justus-Liebig-Universität; 1986.

Wright CS, Dodd MC, Bouroncle BA, Bunner AE. Production of iso-hemagglutinins in rabbits for the determination of normal erythrocyte survival by differential hemagglutination. *J Immunol*. 1955; 74: 81 – 8.

## VIII. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Professor Dr. J. Hirschberger danke ich für die Überlassung des Themas und Unterstützung bei der Durchführung der Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. J. Hein für die allzeit gute fachliche Betreuung und Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Arbeit, sowie bei der Hilfestellung bei Problemen und Unterstützung bei der Abfassung des Artikels und der Dissertation.

Meinen herzlichen Dank auch an Herrn Dr. S. Reese für die gute Unterstützung und Betreuung der statistischen Belange dieser Arbeit und die Hilfe bei der Einführung in SPSS sowie MedCalc.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. H. Maier und Frau Dr. G. Foerster für die Bereitstellung des Labors bedanken, sowie des Laborteams der Abteilung Hämatologie, ohne deren Mitwirken die Arbeit nicht zu realisieren gewesen wäre.

Schließlich möchte ich noch meiner Familie für die Motivation, die geleistete Hilfe und die nicht unerhebliche finanzielle Unterstützung bedanken.

Ein großes Dankeschön auch an meinen Verlobten Manuel Baur, der mich zu jeder Tages- und Nachtzeit unterstützt und motiviert hat.