

**Evaluation des vollautomatischen
Hämatologiegerätes CELL-DYN 3500 im klinischen
Einsatz bei Hund und Katze**

Felix Florian Neuerer

Aus der Medizinischen Tierklinik
Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. med. vet. Dr. habil. K. Hartmann)

unter Anleitung von
Prof. Dr. med. vet. Dr. habil. J. Hirschberger

**Evaluation des vollautomatischen Hämatologiegerätes CELL-DYN 3500 im
klinischen Einsatz bei Hund und Katze**

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

von
Felix Florian Neuerer
aus
Heidenheim an der Brenz

München 2005

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. J. Hirschberger

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. B. Aigner

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM	2
2.1	Automatische Hämatologiesysteme	2
2.1.1	Quantitative „Buffy Coat Analyse“	3
2.1.2	Widerstands- (Impedanz-) Messung	4
2.1.3	Durchflusszytometrie	5
2.2	Manuelle Methoden	9
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	10
3.1	Zielvorstellung	10
3.2	Material und Methoden	10
3.2.1	Material	10
3.2.1.1	Patientengut	10
3.2.1.2	Probenmaterial und Probenlagerung	11
3.2.1.3	Geräte	12
3.2.1.3.1	CELL-DYN® 3500 Blutanalysegerät	12
3.2.1.3.2	Mikrohämatokrit-Zentrifuge	15
3.2.1.3.3	Spektrallinienphotometer PCP 6121	15
3.2.1.3.4	Ames-Hema-Tek-Slide-Stainer	15
3.2.1.3.5	Mikroskop	16
3.2.2	Methoden	16
3.2.2.1	Methoden der Blutuntersuchung	16
3.2.2.1.1	Leukozytenbestimmung	16
3.2.2.1.2	Erythrozyten- und Thrombozytenbestimmung	24

3.2.2.1.3	Hämoglobinbestimmung	28
3.2.2.1.4	Hämatokritbestimmung	30
3.2.2.1.5	Differentialblutbilderstellung	31
3.2.2.2	Methoden der Datengewinnung	36
3.2.2.2.1	Qualitätskontrolle	36
3.2.2.2.2	Methodenvergleich	37
3.2.2.3	Statistische Methoden	38
3.2.2.3.1	Deskriptive Statistik	38
3.2.2.2.2	Liniendiagramme	38
3.2.2.3.3	Lineare Regressionsanalyse und Pearsonscher Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient	38
3.2.2.3.4	Bland-Altman Plots	39
3.2.2.3.5	T-Test für unabhängige Stichproben	39
3.3	Ergebnisse	40
3.3.1	Qualitätskontrolle	40
3.3.1.1	Präzision in der Serie	40
3.3.1.1.1	CELL-DYN® 3500	40
3.3.1.1.2	Referenzmethoden	41
3.3.1.2	Blutprobenlagerung	52
3.3.2	Methodenvergleich	66
4	DISKUSSION	87
4.1	Qualitätskontrolle	88
4.1.1	Präzision in der Serie	88
4.1.1.1	Hund (CELL-DYN® 3500)	88
4.1.1.2	Katze (CELL-DYN® 3500)	89
4.1.1.3	Referenzmethoden	90
4.1.2	Blutprobenlagerung	91
4.2	Methodenvergleich	92

5	ZUSAMMENFASSUNG	99
6	SUMMARY	102
7	ABKÜRZUNGEN	104
8	SCHRIFTTUMVERZEICHNIS	106
9	DANKSAGUNG	116
10	LEBENS LAUF	117

1 EINLEITUNG

Hämatologische Untersuchungen von Tierblutproben werden heute routinemäßig zur klinischen Diagnostik, im Rahmen der Lebensmittelkontrolle und Arzneimittelforschung sowie in der Forschung allgemein durchgeführt. Blutbilder werden von Tierärzten regelmäßig als präoperative Checks und immer häufiger auch im Rahmen der optimalen medizinischen Versorgung der Tierpatienten eingeleitet. Traditioneller Weise wurden diese Blutproben zu großen, meist kommerziellen Labors verschickt oder in der eigenen Praxis anhand zeit- und arbeitsintensiver manueller Methoden untersucht. Mit zunehmender Verfügbarkeit von halbautomatischen und vollautomatischen Hämatologiesystemen haben Pharmaunternehmen, Forschungseinrichtungen und praktizierende Tierärzte die Möglichkeit, Blutproben effizienter und akkurater zu analysieren als mit manuellen Methoden. In der tiermedizinischen Praxis sorgen diese Geräte für eine schnelle Probenbearbeitung und erhöhen die Qualität der Patientenversorgung und Besitzerzufriedenheit. In Forschungseinrichtungen führen technisch aufwendigere leistungsstärkere Geräte zu einem schnelleren Probendurchsatz und größerer Bearbeitungskapazität. Sie können eingesetzt werden, um Veränderungen einzelner Zellpopulationen zu identifizieren oder geringgradige Änderungen von Zellgrößen zu dokumentieren und quantifizieren.

Nahezu alle Hämatologiesysteme wurden für den Einsatz in der Humanmedizin konzipiert und sind für diese Zwecke evaluiert worden. Für menschliches Blut liefern sie daher akkurate und reproduzierbare Ergebnisse. Dass diese Geräte mit dem Blut verschiedener Tierarten vergleichbar gut arbeiten, kann nicht ohne weiteres vorausgesetzt werden, da Zahl und Größe von Blutzellen sowie Sedimentations- und Gerinnungsverhalten des Blutes der unterschiedlichen Spezies zu mannigfaltig sind. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das vollautomatische Hämatologiesystem CELL-DYN[®] 3500 auf seine Tauglichkeit in der tierärztlichen Praxis anhand von venösem Hunde- und Katzenblut zu überprüfen. Die Zuverlässigkeit der Messergebnisse soll mit Hilfe von Präzisionsuntersuchungen und Vergleichsmessungen mit manuellen Referenzmethoden ermittelt werden

2 SCHRIFTTUM

2.1 Automatische Hämatologiesysteme

Da tausende von Zellen pro Analysedurchgang von einem automatischen Hämatologiegerät untersucht werden, haben diese grundsätzlich höhere Präzisionen als manuelle Techniken. Die Verringerung manueller Zählfehler war deshalb auch einer der Hauptgründe, warum bereits Mitte der 30er Jahre des 20. Jahrhunderts die ersten automatischen Techniken zur Blutzellzählung entwickelt wurden. Eine große Vielzahl von Geräten, die zumeist für humane Blutproben entwickelt wurden, ist seitdem verfügbar. Untersuchungstechniken, die heutzutage bei Ermittlung des Blutbildes Verwendung finden, sind die Messung des elektrischen Widerstandes, die „Buffy Coat Analyse“, die Streulichtmessung, spezielle Zellfärbungs- und Lichtabsorptionsmethoden sowie eine Kombination aus diesen Methoden. Für die Bearbeitung von nichtmenschlichen Blutproben ist es essentiell, dass das entsprechende Gerät für eine Multispezies-Analyse evaluiert wurde. Geräte, die für Humanblut entwickelt wurden benötigen insbesondere Modifikationen bezüglich der Erythrozyten- und Leukozytenzählung (WEISER 1987). In letzter Zeit sind Geräte auf den Markt gekommen mit Voreinstellungen für die häufiger vorkommenden Tierarten. Es sind dies der Coulter Z1 oder ZBI, das QBC[®] VetAutoread[™] Hämatologiesystem, der Baker 9110, der VetABC, der CDC Hemovet, der Bayer Technicon H*1, der Bayer ADVIA 120 und der CELL-DYN[®] 3500 von Abbott.

Die einfachen Modelle liefern ausschließlich Zellzählungen (Erythro [RBC]-, Leuko [WBC]- und Thrombozyten [PLT]), während die komplexeren, neueren Geräte deutlich mehr Informationen liefern (z.B. Differentialblutbilder). Halbautomatische Instrumente sind arbeitszeitintensiver und benötigen vorbereitende Schritte wie z.B. Probenverdünnung. Vollautomatische Systeme verdünnen die Probe, fügen Lysereagenzien zu, führen die Blutprobenanalyse durch und drucken das Ergebnis abschließend aus. Die gängigsten auf dem Markt befindlichen Geräte werden im Folgenden anhand ihrer technischen Unterschiede besprochen.

2.1.1 Quantitative „Buffy Coat Analyse“

Das QBC[®] VetAutoread[™] Hämatologiesystem (IDEXX Inc., Westbrook, USA) ist ein Gerät, welches die speziell für die Veterinärmedizin optimierte quantitative „Buffy Coat Analyse“ einsetzt. Diese Technik wurde Anfang der 80iger Jahre entwickelt, um die Blutzellzählung zu vereinfachen (WARDLAW und LEVINE 1983). Das System basiert auf der Tatsache, dass die unterschiedliche physikalische Dichte der Zellen diese beim Zentrifugieren in einem Hämatokritröhrchen in verschiedene Schichten sortiert. Das Gerät gibt Werte für den Hämatokrit [HCT], die Hämoglobinkonzentration [HGB], RBC und WBC Zählungen, Zählungen der Gesamtgranulozyten, neutrophilen Granulozyten [NEU], Lymphozyten [LYM], Monozyten [MONO] und eosinophilen Granulozyten [EOS] (nur bei Hunden und Rindern), sowie Thrombozyten [PLT], mittleren Hämoglobinkonzentration der Erythrozytenmasse (MCHC) und eine Retikulozytenprozentzahl aus.

Das QBC[®] VetAutoread[™] Hämatologiesystem ist einfach zu bedienen und für den Einsatz bei den häufiger vorkommenden Tierarten (Hund, Katze, Pferd, Rind) als Screening-Methode geeignet (LEVINE et al. 1986). Ein Probenvolumen von 111 µl wird benötigt und die Ergebnisse stehen nach ca. sieben Minuten zur Verfügung, obwohl längere Inkubationszeiten und zusätzliche Zentrifugationsschritte besonders bei der Katze nötig sind, um die Trennung der einzelnen Zellschichten zu verbessern (HOFMANN-LEHMANN et al. 1998). Das Gerät arbeitet am akkuratesten bei physiologischen Blutproben. Es identifiziert die meisten Leukozytosen aber nur 57% der Leukozytopenien korrekt. Retikulozyten und canine eosinophile Granulozyten werden ebenfalls nur unzureichend erkannt (HOFMANN-LEHMANN et al. 1998).

Der Einsatz des Gerätes ist limitiert auf die oben genannten Tierarten und kalkuliert die Zahlen für RBC und WBC anhand der Annahme einer „normalen“ Zellgröße und Zellstruktur. Diese Annahme mag nicht zutreffen bei Tierarten wie z.B. Frettchen, Kaninchen oder Lamas. Auch für Reptilien und Vögel liegen keine Untersuchungen vor.

2.1.2 Widerstands- (Impedanz-) Messung

Es sind derzeit mehrere Geräte verfügbar, die die Zellzahl und Zellgröße nach der Methode der elektrischen Widerstandsmessung erfassen. Diese Technologie macht sich zu nutze, dass Zellen elektrische Ströme schlecht leiten. Das Blut wird hierbei mit einer Lösung verdünnt, deren elektrische Leitfähigkeit hoch ist und so in eine schmale Röhre zwischen zwei Elektroden verbracht. Auf die Messtechnik wird in Kapitel 3.2.2.1 „Methoden der Blutuntersuchung“ näher eingegangen.

Die Impedanz-Messmethode fand erstmals Anwendung in den 50iger Jahren mit den Coulter particle counters Model A, FN und ZBI (Coulter Corporation, Miami, USA) und deren Folgemodellen (Model S770, S880, S-Senior). Erstgenanntes Modell war ein halbautomatisches Einkanal-Gerät zur Partikelzählung und Zellgrößenanalyse (DUTCHER 1981).

Verglichen mit moderneren Geräten sind diese ersten Counter zeit- und arbeitsintensiv, die Messung von WBC und RBC erfolgte separat und die Proben müssen manuell vorverdünnt werden. Diese Verdünnung ist sehr wichtig, um zu verhindern, dass zwei oder mehr Zellen gleichzeitig in die Messvorrichtung eintreten (so genannte Koinzidenz, s. Kapitel 3.2.2.1 „Methoden der Blutuntersuchung“). Um akkurate Ergebnisse zu erhalten, sollte die Zellkonzentration kleiner 80000 pro μl Lösung liegen. Die Ergebnisse werden nach ca. fünf Minuten ausgegeben.

Die neueren Geräte (ZBI, Z1 und Z2) haben bereits veränderbare Messschwellen, die für eine akkurate Trennung der RBC und PLT im unteren Größenbereich (wichtig für Tierarten mit kleinen Erythrozyten) und der WBC und RBC im oberen Bereich sorgen. Es können so bis zu fünf Tierarten analysiert werden. Der Z2 benutzt als Größendiskriminatoren bereits 256 Kanäle.

Vollautomatische Hämatologiesysteme mit Veterinärapplikationen sind Counter der Baker 9000er Serie (Bio-Chem ImmunoSystems Inc., Allentown, USA) und der VetABC animal blood counter (ABX Hematology Inc., Garden Grove, USA). Diese Geräte bestimmen gleichzeitig WBC-, RBC- und PLT-Konzentrationen, das mittlere Erythrozytenvolumen (MVC) und die Hämoglobinkonzentration (HGB). Beide berechnen anschließend den Hämatokrit (HCT), die mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozytenmasse (MCHC) und den Hämoglobingehalt der einzelnen Erythrozyten (MCH). Sie können ca. 45 Proben pro Stunde analysieren.

Der Baker 9110 braucht 40 bis 110 µl Blut je nach Verdünnungsgrad, der VetABC lediglich 12 µl, was vorteilhaft ist, um z.B. Heimtierblut zu untersuchen. Beim Baker können die Schwellen vom Benutzer angepasst werden und so für zehn Tierarten vorprogrammiert werden. Der VetABC arbeitet mit speziesspezifischen elektronischen Karten in der Größe einer Kreditkarte, auf denen sämtliche Messeinstellungen für die Tierarten Katze, Hund, Pferd, Ratte, Maus, Meerschweinchen und Rind programmiert sind. Manuelle Korrekturen sind nicht möglich. Die Linearität für den MCV liegt beim Baker 9110 zwischen 50 und 150 Femtolitern (fL), sodass das Gerät Probleme mit Tierarten hat, deren RBC klein sind (z.B. Ziege und Schaf). Auch durch Größenüberlappung der z.T. sehr großen felines PLT mit den RBC kommt es zu ungenauen Messungen. Die weitere Spanne des VetABC für den MCV (25 bis 300 fL) löst die Probleme mit den kleinen RBC. Nach NEUERER und HÍRSCHBERGER (1999) sollte das Gerät aber ebenfalls nicht für die Bestimmung der felines Thrombozyten herangezogen werden.

Obwohl beide Geräte ein 3-Zell-Differentialblutbild ausgeben (Monozyten, Lymphozyten, Granulozyten) sollten die Ergebnisse ebenfalls nicht übernommen werden, da sie beim Baker Counter nicht akkurat sind (KNOLL 2000) und für den VetABC bezüglich Differentialblutbildern keine Evaluationsstudie vorliegt.

2.1.3 Durchflusszytometrie

Zwei modernere Hämatologiesysteme, der Bayer Technicon H*1 (Bayer, Fernwald) und der CELL-DYN[®] 3500 (Abbott, Wiesbaden) bedienen sich der Durchflusszytometrie zur Messung von Tierblutproben. Wenn Zellen von Laserlicht durchleuchtet werden, absorbieren und streuen sie Anteile des Lichtes. Unterbrechungen des Lichtstrahles werden hierbei zur Zellzählung genutzt, wogegen Änderungen im Streulichtverhalten des Laserlichtes Aussagen über die Zellgröße und deren inneren Strukturen (Komplexität des Zellkernes, Dichte des Zytoplasmas) ermöglichen (KOSANKE 1999). Beide Geräte sind vollautomatisch und bestimmen WBC-, RBC- und PLT-Konzentrationen, Hämoglobinkonzentrationen sowie Differentialblutbilder mit ca. 100 µl Blut. Der CELL-DYN[®] 3500 ist einfacher zu bedienen und etwas schneller als der Technicon (Resultate verfügbar nach ca. 45 bzw. 60 Sekunden). Anders als andere moderne Geräte wie z.B. der Coulter STKS,

sind beide Maschinen für den Einsatz in der Tiermedizin vorbereitet (Veterinär-Software).

Der Technicon H*1 wurde erstmalig von DAVIES und FISHER (1991) für Tierblut validiert. Neun Spezies (Ratten, Mäuse, Hunde, Kaninchen, Cynomolgus Affen, Rhesus Affen, Katzen, Pferde und Menschen) sind in der Multi-Spezies-Software vorprogrammiert. Nachträgliche Anpassungen sind nicht möglich, sodass akkurate Resultate von Tieren mit ungewöhnlichen RBC (z.B. Lamas oder Ziegen) nicht zu erzielen sind.

Die CELL-DYN[®] 3500 Veterinärsoftware basiert auf Daten für Humanblut und kann individuell für mehr als 50 Tierarten im jeweiligen Labor modifiziert werden. Um die Schwellenwerte des Lasers einzustellen (gain settings) müssen mindestens fünf physiologische Blutproben einer neuen Tierart herangezogen werden und die Ergebnisse gleichzeitig anhand von Referenzmethoden überprüft werden. Da diese Einstellungen sich deutlich von Gerät zu Gerät unterscheiden, muss dieser als Kalibration bezeichnete Prozess bei jedem neuen Gerät individuell durchgeführt werden.

Obwohl beide Geräte die Durchflusszytometrie nutzen, unterscheiden sich die Messtechniken deutlich voneinander. Der Technicon H*1 benutzt eine einzigartige Zwei-Winkel-Streulichttechnik für die RBC und PLT Zählung sowie für die MCHC Messung. Hierbei werden Erythrozyten zunächst fixiert und abgerundet, um Artefakte durch unterschiedliche Richtungen der RBC zum Laserlicht zu mindern. Sobald RBC und PLT das Laserlicht passieren, werden individuelle Messungen an jeder Zelle vorgenommen. „Klein-Winkel-Streulicht“ korreliert mit der Zellgröße, Recht-und-Groß-Winkel-Streulicht dagegen mit interner Granularität und Dichte der Zelle. Hierbei verhält sich die intrazelluläre Hämoglobinkonzentration linear zu dem RBC-Refraktivitäts-Index (gemessen als „Groß-Winkel-Streulicht“). Diese Technik verbessert die Trennbarkeit von RBC und PLT, da beide Zellarten unterschiedliche Refraktivitäts-Indizes besitzen und ermöglicht genauere Aussagen über abnormale RBC. Basierend auf Zellgröße und Hämoglobinkonzentration werden RBC klassifiziert als makrozytär, mikrozytär, hypochrom oder hyperchrom. Trotz dieser vorteilhaften Methodik ist es auch mit dem Technicon H*1 wie schon bei den Impedanz-Counter erwähnt, nicht möglich, feline Thrombozyten akkurat zu bestimmen (LIEDL 1996). Nach TASKER et al. (2001), der verschiedene Hämatologiegeräte mit der Referenzmethode „Zählkammer“ verglichen hat, konnte

keines der Geräte die PLT-Zahl akkurat wiedergeben. Die beste Methode in dieser Studie war die Schätzung der felines PLT-Zahl anhand von Blutausrichen.

Der CELL-DYN[®] 3500 benutzt die traditionelle Impedanz-Messtechnik für die Zählung von RBC und PLT (s. Kap. 3.2.2.1.2 „Erythrozyten- und Thrombozytenbestimmung“).

Auch die Messtechnik der Leukozyten (Zählung und Differenzierung) unterscheidet sich bei beiden Geräten. Auf die Technik des CELL-DYN[®] 3500 wird in dem entsprechenden Kapitel „Leukozytenbestimmung“ in Material und Methoden näher eingegangen (Kap. 3.2.2.1.1).

Die Bestimmung der Leukozytenkonzentration erfolgt beim Technicon H*1 anhand einer Doppelmessung mit zwei voneinander unabhängigen Messmethoden. Die erste Messung erfolgt im Peroxidasekanal, die zweite im sog. Kernsegmentierungskanal. Beiden Messmethoden liegt das Prinzip der optisch-elektronischen Zellzählung zugrunde. Ein Unterschied besteht nur in der Art der Streulichterfassung beider Kanäle (SCHNEIDER 1989a).

Im Peroxidasekanal wird die durchflusszytometrische kombiniert mit einer automatisierten zytochemischen Messung und so eine Zellzählung und eine Zelldifferenzierung vorgenommen. Hierbei werden die Leukozytenpopulationen, die sich von einander durch ihre Größe und die Intensität ihrer Peroxidaseaktivität unterscheiden, aufgetrennt. Bei den meisten Spezies besitzen z.B. die eosinophilen Granulozyten die höchste Peroxidaseaktivität, während Lymphozyten überhaupt keine Aktivität aufweisen.

Im Kernsegmentierungskanal wird das Zytoplasma der Leukozyten aufgelöst und die nackten Zellkerne klassifiziert als polymorphkernig oder mononukleär. Anschließend werden die Zellen nach ihrer Größe eingeteilt. Basophile Granulozyten werden von anderen Leukozyten dadurch unterschieden, dass ihre Zellmembran resistent gegenüber dem Lyse-Reagenz ist. Eine Diskrepanz der Ergebnisse aus beiden Messungen wird vom Technicon durch Angabe von Warnungen („flags“) vor bestimmten Zelltypen (z.B. unreife/stabkernige Granulozyten, Blasten oder kernhaltige Erythrozyten) kommentiert. Die Ergebnisse der Analyse werden vom Gerät anhand mehrerer Histogramme (RBC und HGB) und Punktwolkendiagramme graphisch dargestellt. Es wurde von TVEDTEN (1993a) eine Multispezies-Anleitung zur Interpretation der RBC- und WBC-Zytogramme herausgegeben.

Nach der Arbeit von LIEDL (1996) werden, trotz der besseren Technik im Vergleich zur Impedanz-Methode, die PLT der Katze nicht zuverlässig gemessen. Ebenfalls kritisch sollten die Daten der automatischen Blutzelldifferenzierung betrachtet werden. Aufgrund des Mangels an Peroxidase in den felines eosinophilen Granulozyten werden diese Zellen vom Technicon H*1 nicht erkannt (JAIN 1993). Probleme hat das Gerät auch bei der zuverlässigen Differenzierung von Monozyten und basophilen Granulozyten von Hunden und Katzen.

Das neueste Gerät von Bayer mit Veterinärapplikationen ist der ADVIA 120 (Bayer, Fernwald). Er kann zu den beim Technicon H*1 genannten Spezies auch Blut von Meerschweinchen, Ziegen, Rindern und Schafen analysieren. Basierend auf der Technik des Technicon H*1 kann der ADVIA 120 bis zu 120 Proben pro Stunde verarbeiten und ist damit noch einmal deutlich schneller als alle bislang erwähnten Geräte. Nach der Erfassung der RBC-Daten schließt der ADVIA 120 eine weitere Messung an, bei der er die Niedrig- und Hochwinkelstreulichtsignale verstärkt und so eine verbesserte PLT-Auflösung erzielt. Die PLT-Zählung wird genauer, ebenso die PLT-Größenmessung (mittleres Plättchenvolumen, MPV). Diese zweite Messung ermöglicht zudem die Bestimmung eines weiteren Parameters, des sog. MPC (mean platelet component) (ZELMANOVIC und HETHERINGTON 1998). Der MPC könnte für die Veterinärmedizin interessant sein, da er sich in der Humanmedizin als Maßstab für den Aktivitätszustand der PLT zu eignen scheint und wesentlich weniger aufwendig ist als alternative Methoden wie Fluoreszenz-Durchflusszytometrie oder Dichte-Gradienten-Analyse (CHAPMAN et al. 1996 und 2003, MACEY et al. 1999). Zusätzlich führt der ADVIA 120 automatisierte Retikulozyten-Zählungen durch.

Der ADVIA 120 wurde von MORITZ (2000) für Hunde- und Katzenblut evaluiert. Vom selben Autor sind kürzlich auch Referenzwerte für den ADVIA 120 bei Hunden und Katzen publiziert worden (MORITZ et al. 2004).

Das Gerät erwies sich als zuverlässig in der hämatologischen Routinediagnostik. Insbesondere die eosinophilen Granulozyten der Katze, deren Differenzierung für den Technicon H*1 ein großes Problem darstellte, korrelierten beim ADVIA 120 mit der manuellen Referenzmethode deutlich besser ($r > 0,800$). Da der ADVIA 120 Thrombozytenaggregate quantifizieren kann, konnten auch die Thrombozytenkonzentrationen bei der Katze vom Gerät übernommen werden, wenn die Anzahl der Aggregate kleiner 1000 war (MORITZ et al. 2004). Die Zahl der Retikulozyten scheint nur gut mit der manuellen Referenzmethode

übereinzustimmen, wenn ausschließlich die aggregierten Retikulozyten (Typ 3) gezählt werden (MORITZ et al 2004). Zum Beleg dieser Hypothese sind aber weitere detaillierte Studien nötig.

2.2 Manuelle Methoden

Auf die Art und Durchführung der manuellen Methoden der Blutzellanalyse wird im Kapitel „Material und Methoden“ ausführlich eingegangen. Sie sind in der veterinärmedizinischen Literatur gut dokumentiert (KRAFT und DÜRR 1995, KNOLL und ROWELL 1996, JAIN 1986).

Die systematische mikroskopische Blutzelldifferenzierung umfasst eine Leukozyten- und Thrombozytenschätzung (mit dem Vermerk, ob Thrombozytenaggregate erkennbar sind), eine Beurteilung der Leukozyten- und Erythrozytenmorphologie und die eigentliche Leukozytendifferenzierung. Die Richtigkeit dieser manuellen Referenzmethode hängt ab von der Qualität des Blutausriches und wird zudem beeinflusst durch den Bereich, der zur Differenzierung herangezogen wird, von der Anzahl der Zellen, die beurteilt werden und von der Anzahl der einzelnen Zelltypen, die in der Blutprobe vorhanden sind. Die mikroskopische Blutzelldifferenzierung bedarf einer großen Portion Erfahrung und Fachkenntnis, um die weite Spanne an Blutabnormalitäten, die vorkommen können, korrekt zu identifizieren. Einige Farbatlanten mit Abbildungen normaler und pathologischer Blutzellen verschiedener Tierarten sind in der Veterinärmedizin verfügbar (HAWKEY et al. 1989, REAGAN et al. 1998).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Zielvorstellung

Die Evaluation des Hämatologiesystems CELL-DYN[®] 3500 soll unter Routinelaborbedingungen erfolgen. Die hierfür benötigten venösen Hunde- und Katzenblutproben stammen von klinisch gesunden und kranken Tieren und werden im normalen Laborbetrieb untersucht. Anhand von Präzisionsmessungen sowie in einem Methodenvergleich sollen die vom Gerät ausgegebenen Messergebnisse überprüft werden. Zusätzlich soll der Einfluss der Blutalterung oder Blutlagerung auf die automatische Zellzählung und Blutzellendifferenzierung untersucht werden. Die Ergebnisse werden statistisch ausgewertet und graphisch oder tabellarisch dargestellt.

3.2. Material und Methoden

3.2.1 Material

3.2.1.1 Patientengut

Die Hunde- und Katzenblutproben stammen von ambulanten und stationären Patienten der Medizinischen Kleintierklinik und der Chirurgischen Tierklinik der Universität München. Um möglichst den gesamten Messbereich des Gerätes auszutesten, wird der Untersuchung sowohl das Blut klinisch gesunder, als auch das kranker Tiere zugeführt. Die Auswahl erfolgt hierbei zufällig und ist weder abhängig von Rasse, Alter, Geschlecht der Tiere, noch der Art der Krankheit der Patienten. Überprüft werden die Parameter Leukozytenzahl, Erythrozytenzahl, Thrombozytenzahl, Hämoglobinkonzentration, Hämatokrit, Lymphozytenzahl, Monozytenzahl und Zahl neutrophiler, eosinophiler und basophiler Granulozyten.

Zur Auswertung gelangen insgesamt je 315 Hunde- bzw. Katzenblutproben. Diese teilen sich wie folgt auf:

Im Methodenvergleich werden je 100 Hunde- und Katzenblutproben analysiert sowie je Tierart 200 Blutausstriche mit den vom Gerät erstellten Differentialblutbildern verglichen.

Für die Präzisionsmessungen werden je fünf Blutproben pro Tierart verwendet.

Zur Überprüfung der Lagerfähigkeit des Blutes werden je fünf Blutproben pro Tierart bei Raumtemperatur und Dunkelheit bzw. im Kühlschrank gelagert, untersucht.

3.2.1.2 Probenmaterial und Probenlagerung

Als Probenmaterial dient bei beiden Tierarten mit Gerinnungshemmer versetztes Vollblut. Die Blutentnahme erfolgt nach Rasur der Punktionsstelle unter sterilen Kautelen durch Punktion der Vena cephalica antebrachii oder der Vena saphena lateralis mit einer sterilen Einmalkanüle (Sterican 0,9 x 40 mm der Fa. Braun Melsungen AG, Melsungen). Das Blut wird unmittelbar in mit EDTA beschichtete Röhrchen (1,2 bis 2 mg/ml Blut) der Fa. Sarstedt (Nümbrecht) aufgefangen.

Die Blutanalyse mit dem CELL-DYN[®] 3500 sowie die Aufbereitung der Proben für die manuelle Zellzählung, die Beschickung der Mikrohämatokritzentrifuge und die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration am Photometer erfolgt innerhalb von maximal einer Stunde nach der Blutentnahme.

Die Blutausstriche werden auf fettfreien, 25 x 75 mm Objektträgern (Fa. Assistent) sofort angefertigt und nach dem Trocknen bei Raumtemperatur mittels Wright-Färbung im Färbeautomaten (Ames-Hema-Tek-Slide-Stainer der Fa. Miles, Tarrytown, New York) gefärbt.

3.2.1.3 Geräte

3.2.1.3.1 CELL-DYN® 3500 Blutanalysegerät

Der CELL-DYN® 3500 der Firma Abbott Laboratories (IL, USA), wird in Deutschland vertrieben durch Abbott GmbH Diagnostika (Wiesbaden). Es ist ein vollautomatisches elektronisches Blutanalysegerät, das die Impedanzmessmethode mit der Durchflusszytometrie in einem Gerät vereint.

Zur Ermittlung der hämatologischen Parameter werden im Gerät vier voneinander unabhängige Messungen vorgenommen.

- Die Daten für die optische Leukozytenzählung (WOC) und für die Leukozytendifferenzierung werden im optischen Kanal gemessen.
- Die Leukozytenwiderstandsmessung (WIC) erfolgt in einem Widerstandsmesskanal.
- Die Erythrozyten (RBC)- und Thrombozyten (PLT)-Daten werden in einem zweiten Widerstandsmesskanal erfasst.
- Die Hämoglobinkonzentration (HGB) wird im Spektrophotometriekanal gemessen.

Probenanalyse

Bei jedem Gerätezyklus werden Ansaugung, Verdünnung und Mischung der Probe und die für jeden Parameter erforderlichen Messungen durchgeführt.

Das Gerät benötigt insgesamt 130 µl K₃EDTA-Blut oder Vollblut.

Die Blutprobe wird über ein Scherventil aufgeteilt in drei Verdünnungen:

- WOC-Verdünnung
- WIC-/HGB-Verdünnung
- RBC-/PLT-Verdünnung

Die Analyse der Leukozyten (WBC) erfolgt in zwei getrennten Kanälen: im optischen Kanal (WOC) und im Widerstandsmesskanal (WIC).

Die optische WBC-Zählung wird wie folgt durchgeführt:

Nach Verdünnung mit dem Sheath-(Hüll-) Reagenz (sorgt für Unsichtbarmachung der Erythrozyten) wird eine definierte Probenmenge in der WOC-Mischkammer zur Probenzuführung in die WOC-Durchflussküvette vorbereitet. Die WOC-Verdünnung wird hydrodynamisch zu einem schmalen Strom fokussiert, sodass jeder Leukozyt einzeln vom Laserlicht in der Durchflussküvette erfasst wird. Sobald der Probenstrom den Laserstrahl durchquert, wird das durch die mitgeführten Zellen gestreute Licht aus vier verschiedenen Winkeln gemessen. Diese Streulichtmessung dient der Leukozytendifferenzierung und wird im Kapitel 3.2.2.1 „Methoden der Blutuntersuchung“ näher beschrieben. Es werden pro Messung ca. 10000 Leukozyten differenziert.

Die WBC-Widerstandsmessung (WIC) wird wie folgt durchgeführt:

Eine definierte Probenmenge wird mit Diluent-(Verdünnungs-) Reagenz und WIC-/HGB-Lyse-Reagenz (zur Lyse der Erythrozyten) in der Mischkammer des Von-Behrens-WIC-Transducers mittels Luftblasen gemischt und mittels Vakuum durch die Messöffnung gesaugt. Durch das als volumetrische Messung bezeichnete Verfahren (s. Kapitel 3.2.2.1 „Methoden der Blutuntersuchung“) wird sichergestellt, dass genau 200 µl Verdünnung für die Messung verwendet werden.

RBC-/PLT-Analyse:

Eine definierte Probenmenge wird mit Diluent-(Verdünnungs-) Reagenz versetzt und analog der WIC-Messung im Widerstandskanal analysiert.

HGB-Bestimmung:

Der Rest der WIC-HGB-Verdünnung gelangt im Anschluss an die WIC-Messung in die HGB-Durchflussküvette und wird mittels Spektrophotometrie analysiert.

Ergebnisanzeige:

Die Daten werden zur Analyse an die Datenstation übertragen. Dort werden für alle Parameter die Ergebnisse berechnet und im Menü RUN (Probenlauf) der Datenstation angezeigt. Die Ergebnisse werden darüber hinaus im Journalformat unter der Bezeichnung Data Log (Ergebnisdatei) gespeichert.

Reinigung des Gerätes:

Nach jedem Messzyklus wird:

- Die Ansaugnadel innen und außen mit Verdünnungsmittel gespült.
- Die WIC- und die RBC-/PLT-Mischkammern mit Verdünnungsmittel gespült.
- Die WOC-Mischkammer mit Sheath-Reagenz gespült.
- Die WIC- und die RBC-/PLT-Volumenmesseinheit, sowie die HGB-Durchflussküvette mit Detergens gespült.

Kalibrierung und Qualitätskontrolle

Der CELL-DYN® 3500 besitzt eine Veterinärsoftware, die vom Hersteller vorinstalliert ist. Das Gerät wurde vor der Evaluierung von Technikern der Firma Abbott kalibriert. Nur die gemessenen Parameter weiße Blutzellen (WBC), rote Blutzellen (RBC), Hämoglobinkonzentration (HGB), mittleres korpuskuläres Volumen (MCV) und Blutplättchen (PLT) können kalibriert werden. Die Humanblutsoftware ist ab Werk installiert und kalibriert. Sie dient als Basis für die Veterinärsoftwarekalibrierung. Interne Qualitätskontrollprogramme überprüfen fortlaufend die korrekte Kalibrierung des Gerätes. Sie werden wie folgt bezeichnet:

- **X-B Analyse** Dieses Programm kalkuliert Durchschnittswerte der Erythrozytenindizes und einiger optischer Parameter der Leukozytendifferenzierung über einen längeren Zeitraum. Die Ergebnisse sind graphisch darstellbar. Hierbei findet das „Bull’s Moving Average Program“ (Programm des gleitenden Mittelwertes nach Bull) Anwendung.
- **QC-Dateien** Statistische und graphische Analyse der in den 20 QC-Dateien enthaltenen Daten zum Berechnen des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten.
- **Westgard-Regeln** Das Programm „Westgard rules“ testet die Kontrolldaten aus den QC-Dateien gegen Referenzdaten, um zu überprüfen, ob das Gerät akzeptable Richtigkeits- und Präzisionswerte erzielt. Die Referenzdaten werden aus Mittelwert und Standardabweichung von Kontrollmessungen ermittelt.

Täglich vor Beginn der Messungen wurde die Präzision und richtige Kalibrierung des Gerätes anhand von drei unterschiedlichen Kontrollblutproben überprüft (WB control „low“, „normal“, „high“, REF 99106-01, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, 60064, USA). Hierbei handelt es sich um Proben im niedrigen, normalen und hohen Konzentrationsbereich der Blutzellen.

3.2.1.3.2 Mikrohämatokrit-Zentrifuge

Die manuelle Hämatokritbestimmung erfolgt mit der Kleinzentrifuge HAEMATOKRIT 24 (Fa. HETTICH, Tuttlingen). Hierzu wird die zu ca. $\frac{3}{4}$ mit Blut gefüllte HETTICH-Hämatokritkapillare in den Schleuderteller eingelegt und fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wird der Hämatokrit auf einer Auswertungsskala abgelesen (HETTICH 1991)

3.2.1.3.3 Spektrallinienphotometer PCP 6121

Für die Referenzwertbestimmung der Hämoglobinkonzentration wird das Spektrallinienphotometer PCP 6121 der Fa. Eppendorf, Hamburg, verwendet. Die photometrische Einheit des PCP 6121 ist mit einem Mikroprozessor verbunden. Dieser überwacht zum einen den Messablauf der photometrischen Analysen und errechnet zum anderen aus den gemessenen Extinktionsänderungen die Hämoglobinkonzentration, die als Ergebnis digital angezeigt wird (EPPENDORF 1981).

3.2.1.3.4 Ames-Hema-Tek-Slide-Stainer

Die Blutausstriche werden in dem automatischen Färbegerät Ames-Hema-Tek-Slide-Stainer (Fa. Miles, Tarrytown, New York) gefärbt. Hierbei werden die Objektträger mittels zweier Transportschnecken mit der zu färbenden Fläche nach unten über eine Fixier- und Färbepalette bewegt, auf der durch Kontaktauslösung die entsprechenden Fixier-, Farb- und Spüllösungen freigesetzt werden. Das Trocknen der Objektträger erfolgt im Anschluss an den Färbe- und Spülvorgang in einem Gebläseluftstrom.

Als Färbemethode findet eine modifizierte Wright-Färbung Verwendung (Ames 1975).

3.2.1.3.5 Mikroskop

Zur manuellen Zählung von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten wird das Standardmikroskop CH-2 der Fa. Olympus (Unterhaching) und ein Handzähler verwendet. Die Differenzierung der Blutaussstriche erfolgt ebenfalls mit Hilfe des oben bezeichneten Mikroskops sowie des elektrischen Zählgerätes CD 2010 der Fa. Clinicon International GmbH (Mannheim).

3.2.2 Methoden

3.2.2.1 Methoden der Blutuntersuchung

3.2.2.1.1 Leukozytenbestimmung

a) *CELL-DYN[®] 3500 (Abbott GmbH Diagnostika 1996):*

Vom Gerät werden zwei WBC- Werte ermittelt:

- WIC (WBC-Widerstandsmessung)
- WOC (optische WBC-Zählung)

Vom Gerät wird primär der WOC-Wert ausgegeben.

Unterscheiden sich beide Werte über ein bestimmtes Maß voneinander, werden die Daten zur Ermittlung eines möglichst genauen Ergebnisses weiteren Überprüfungen unterzogen. Mittels eines Datenanalyse-Algorithmus wird jede Messung automatisch bewertet und das plausiblere Ergebnis für die Ausgabe ausgewählt. Der im CELL-DYN[®] 3500 verwendete Algorithmus gliedert sich in drei Hauptteile: 1) den WOC-Entscheidungsbaum für die Analyse und Ausgabe der WOC-Daten; 2) den WIC-Entscheidungsbaum für die Analyse und Ausgabe der WIC-Daten und 3) einen

vergleichenden WIC-/WOC-Entscheidungsbaum für den Vergleich der beiden Ergebnisse.

Liegt nun wie oben erwähnt eine deutliche Abweichung vor, erfolgt eine weitergehende Überprüfung der Werte zur Ursachenermittlung. Je nach Art der Ursache (Interferenztyp, s.u.) wird vom Algorithmus entweder der WOC-Wert oder der WIC-Wert als WBC-Zählung mit den entsprechenden Markierungen (sofern vorhanden) ausgegeben, je nachdem, welcher Wert plausibler ist.

WIC-Messung:

Die WIC-Messung erfolgt im Widerstandsmesskanal. Es werden hierfür die Erythrozyten lysiert. Eventuell vorhandene kernhaltige Erythrozyten werden ebenfalls lysiert und die Zellkerne in den WIC-Wert einbezogen. Folglich ist in diesem Fall der WIC-Wert als Leukozytenzählung falsch hoch (Interferenztyp NRBC „nucleated red blood cells“). Das Gerät erkennt das Problem NRBC und bevorzugt den WOC-Wert als Ergebnis der Leukozytenzählung.

Das Widerstandsmessprinzip basiert auf der Messung von Veränderungen des elektrischen Stroms, die durch ein Partikel, das in einer leitfähigen Flüssigkeit suspendiert ist, bei seinem Durchtritt durch eine Messöffnung bekannter Größe hervorgerufen werden. An den gegenüberliegenden Seiten der Messöffnung sind zwei Elektroden in die Flüssigkeit getaucht, zwischen denen ein elektrischer Strom fließt. Beim Durchtritt eines Partikels durch die Messöffnung kommt es zu einer kurzzeitigen Veränderung des elektrischen Widerstandes zwischen den beiden Elektroden. Diese Veränderung löst einen messbaren elektrischen Impuls aus. Die Anzahl der Impulse entspricht der Anzahl der Partikel, die die Messöffnung passiert haben. Die Amplitude eines Impulses ist im Wesentlichen proportional zu jeweiligem Partikelvolumen. Jeder Impuls wird verstärkt und mit internen Referenzspannungskanälen verglichen. Diesen Kanälen sind kalibrierte Größendiskriminatoren vorgeschaltet, so dass jeweils nur Signale einer bestimmten Amplitude akzeptiert werden. Auf diese Weise werden die Impulse entsprechend ihrer Amplitude unterschiedlichen Größenkanälen zugeordnet.

Als Koinzidenzverlust wird bezeichnet, wenn zufällig mehr als eine Zelle gleichzeitig durch die Messeinheit fließt. Die so ermittelte Zellzahl wäre falsch niedrig. Dieser Koinzidenzverlust lässt sich statistisch vorhersagen, da er im direkten

Zusammenhang mit dem tatsächlichen Volumen der Messöffnung und der Menge der Verdünnung steht. Er wird vom Gerät automatisch korrigiert.

Die Bestimmung der absoluten Zellzahl setzt voraus, dass das genaue Volumen des verdünnten Blutes bekannt ist, das während des Zählzyklus die Messeinheit passiert. Im CELL-DYN[®] 3500 besteht die Volumenmesseinheit aus zwei optischen Sensoren und einer dazwischen liegenden Glassäule mit Präzisionsbohrung (s. Abb. 3.1). Der Abstand zwischen den Sensoren ist so gewählt, dass genau 200 µl abgemessen werden. Zur Bildung eines Meniskus in der Flüssigkeit wird dem Verdünnungsmittel in der Volumeneinheit Detergens zugesetzt. Der Zählzyklus wird ausgelöst, wenn der Meniskus den oberen Sensor erreicht und gestoppt, sobald der Meniskus den unteren Sensor erreicht. Die Zeit, die der Meniskus benötigt, um vom oberen zum unteren Sensor zu gelangen, wird vom Gerät ständig überwacht, genau wie die Zeit, die zur Bildung eines neuen Meniskus benötigt wird. Bei Verschmutzung der Messöffnung, Vakuumschwankungen und Luftblasen in der Volumenmesseinheit kann es zu deutlichen Abweichungen kommen. Das Gerät gibt eine Warnung und Aufforderung zur Fehlerbehebung aus und die Ergebnisse werden unterdrückt.

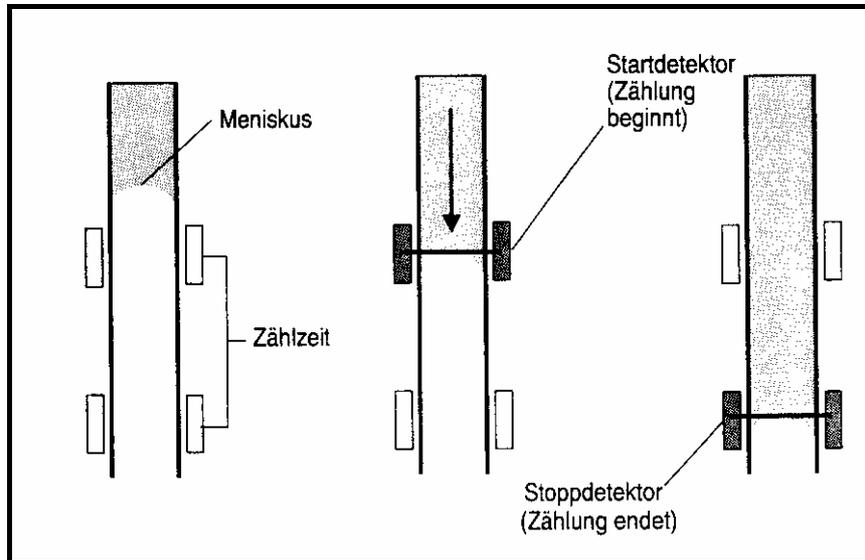


Abbildung 3.1: Volumetrische Messung

nach: CELL-DYN[™], M.A.P.S.S. Laser-Differenzierung, „Der Blick in die Zukunft“, (1995)

Die Daten der WIC-Zählung werden, sofern sie über der unteren WBC-Schwelle liegen (Kanal 40), als WBC registriert und in einem 256-Kanal-Histogramm gespeichert, wobei ein Kanal 0,5 Femtolitern (fL) entspricht.

Nach Korrektur des Koinzidenzverlustes wird der WIC-Wert abschließend per Algorithmus mit dem WOC-Wert verglichen.

WOC-Messung:

Die mit Sheath-Reagenz verdünnte, definierte Probenmenge wird zur optischen Zellzählung und Zelldifferenzierung hydrodynamisch fokussiert, damit die Zellen die WOC-Durchflussküvette, eine optisch reine Quarzkammer, einzeln hintereinander passieren (s. Abb. 3.2).

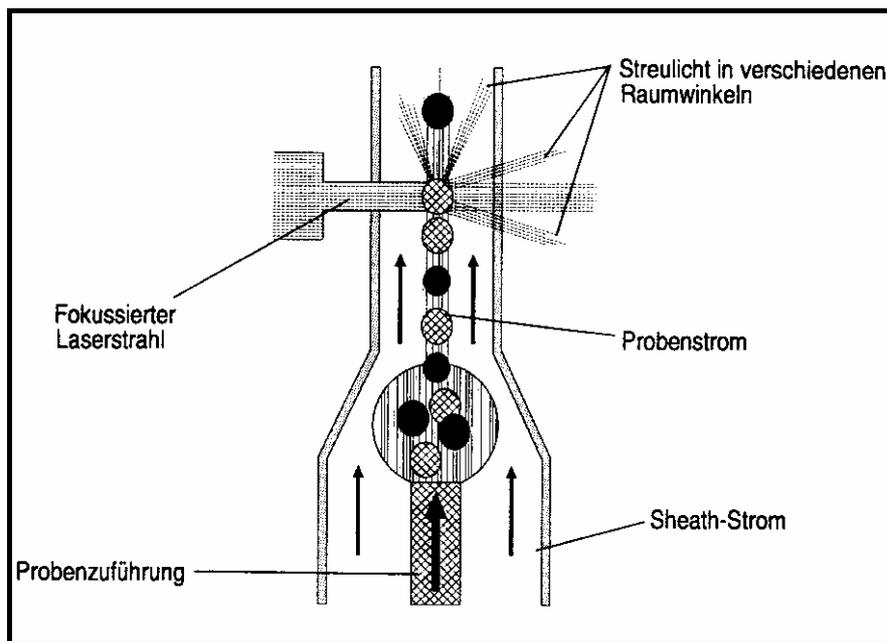


Abbildung 3.2: WOC-Durchflussküvette mit hydrodynamisch fokussiertem Probenstrom

nach: CELL-DYN™, M.A.P.S.S. Laser-Differenzierung, „Der Blick in die Zukunft“, (1995)

Als Lichtquelle dient ein vertikal polarisierter Helium-Neon-Laser. Die vom Gerät in der so genannten optischen Bank (s. Abb. 3.3) gemessenen Streulichtwinkel sind: Vorwärtsstreuung (1 bis 3°, im folgenden als 0° bezeichnet), im rechten Winkel abgestrahlte Seitwärtsstreuung (70 bis 110°, im folgenden als 90° bezeichnet), Schmalwinkelstreuung (7 bis 11°, im folgenden als 10° bezeichnet) und Seitwärtsstreuung (depolarisiert) (70 bis 110°, im folgenden als 90° depolarisiert, kurz 90°D bezeichnet). Dieses Verfahren wird als MAPSS™ (Multi Angle Polarized Scatter Separation, Mehrwinkelstreu-Depolarisation) bezeichnet. Es werden verschiedene Kombinationen dieser vier Messungen verwendet, um die Leukozyten-subpopulationen zu klassifizieren und morphologische Markierungen (Flags) zu generieren (s. Kap. 3.2.2.1.5 Leukozytendifferenzierung).

Die aus allen vier Messungen gewonnenen Daten erlauben die Differenzierung der Leukozyten in fünf Subpopulationen:

- Neutrophile Granulozyten
- Lymphozyten
- Monozyten
- Eosinophile Granulozyten
- Basophile Granulozyten

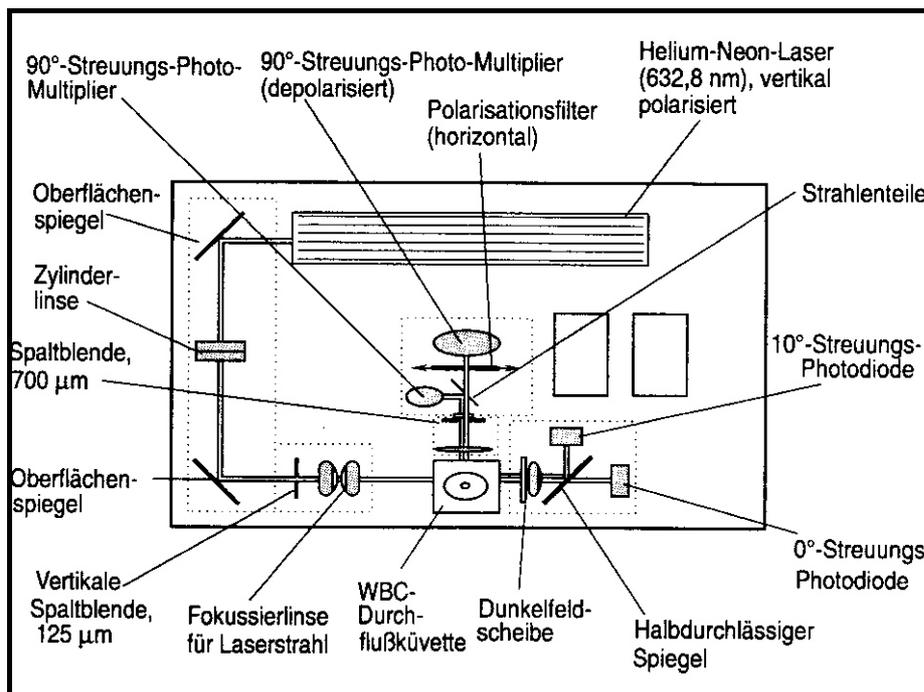


Abbildung 3.3: Optische Bank

nach: CELL-DYN™, M.A.P.S.S. Laser-Differenzierung, „Der Blick in die Zukunft“, (1995)

Zur Ermittlung der WBC-Zahl werden die Impulse gezählt, die über der vom Rechner vorgegebenen Schwelle im 0°-Kanal liegen.

Die WOC-Daten werden graphisch als Scattergramm ausgegeben.

Das Sheath-Reagenz dient bei der WOC-Messung unter anderem auch der optischen Lyse der Erythrozyten (s.u. „Reagenzien“). Sollte das Gerät lyseresistente Erythrozyten vermuten, die bei der WOC-Messung der Leukozytenzahl zu falsch hohen Werten führen würden (Interferenztyp RRBC „resistant red blood cells“), wird vom Algorithmus der Datenstation der WIC-Wert ausgegeben. Die Messung wird in diesem Fall mit „RRBC“ markiert und der Benutzer aufgefordert, die Probe noch

einmal im so genannten „RRBC-Modus“ zu messen. Die Lysezeit ist in diesem Modus stark verlängert, um dem WIC/HGB-Lyse-Reagenz (s.u.) mehr Zeit zur Lyse der Erythrozyten zu verschaffen. Sollte nach Wiederholung der Messung das Problem behoben sein, wird der WOC-Wert als wahrer Wert der Leukozytenzählung ausgegeben. Sollte nach Wiederholung der Messung das Problem weiter bestehen, wird vom Gerät der WIC-Wert ausgegeben.

Reagenzien:

Die vom CELL-DYN® 3500 benötigten Reagenzien sind:

1. Sheath-Reagenz (REF 99311-01) verdünnt die Leukozyten bei der WOC-Messung, ohne diese morphologisch zu beeinflussen. Da der osmotische Druck der Erythrozyten höher ist, als im Reagenz, diffundiert Hämoglobin aus den Erythrozyten in das Reagenz und Wasser aus dem Sheath-Reagenz in die Zelle. Die Zellmembran bleibt dabei zwar intakt, die Erythrozyten weisen aber nun den gleichen Brechungsindex wie das Sheath-Reagenz auf und sind somit für den Laser unsichtbar. Das Reagenz dient darüber hinaus als Hüllstrom während der hydrodynamischen Fokussierung und verhindert die Ansammlung von Luftblasen im Durchflusszytometer.
2. Diluent (REF 99231-01) dient als Verdünnungslösung der Leukozyten bei der WIC-Messung, sowie bei der RBC-, PLT- und HGB-Messung.
3. WIC/HGB lyse (REF 99431-01) dient der schnellen Lyse der Erythrozyten. Die Zellmembran der Leukozyten wird ebenfalls lysiert, die Kernmembran dabei aber erhalten. Somit können die Leukozytenzellkerne bei der WIC-Messung gezählt werden. Zudem wandelt das Reagenz Hämoglobin in einen modifizierten Hämiglobincyanid-Komplex um, welcher bei 540 nm gemessen wird (s.u.).
4. Detergent (REF 99321-01) dient als optisch klare Lösung zur 0-Wert Kalibrierung bei der HGB-Messung, zur Erzeugung und zum Erhalt eines Meniskus für die WIC-, RBC- und PLT-Messung (s.o.) und zur Spülung der WIC-/RBC-/PLT-Zählkammer, sowie der HGB-Messzelle unter Minimierung der Luftblasenbildung
5. Enzymatic Cleaner (REF 93641-01) dient zur enzymatischen Reinigung des Gerätes, insbesondere der Entfernung von Proteinrückständen.

Die unter 1. bis 4. genannten Reagenzien werden bei jedem Messzyklus benötigt, der Enzymatic Cleaner wurde jeden Abend zur Reinigung des Systems eingesetzt.

b) ZÄHLKAMMERMETHODE:

Die Leukozyten wurden mit der Zählkammer nach NEUBAUER gezählt.

Auf die saubere und trockene Zählkammer wird ein sauberes und trockenes geschliffenes Deckglas aufgelegt (s. Abb. 3.4). Hierbei ist auf optimale und nahtlose Haftung zu achten, erkennbar durch die Entstehung Newtonscher Farbringe am seitlichen Zählkammerrand (KRAFT und DÜRR 1995).

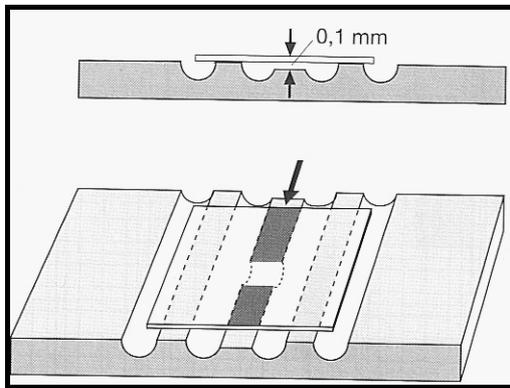


Abbildung 3.4: Neubauer-Zählkammer; Vorbereitung der Kammer

nach: KRAFT und DÜRR, Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, (1995)

Die Aufbereitung der Vollblutprobe erfolgt mit der Unopette[®] für Leukozyten (Fa. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg). Zunächst wird das Unopetten[®]-Fläschchen¹ mit der Kunststoffhülse der Kapillare durchstoßen.

Danach wird die Kapillare vollständig mit Blut (25 µl) gefüllt. Außen auf der Spitze des Kapillarstiftes anhaftendes Blut wird vorsichtig mit Zellstoff entfernt. Nun drückt man mit zwei Fingern das Unopetten[®]-Fläschchen zusammen, um einen leichten Unterdruck im Flascheninneren entstehen zu lassen. Gleichzeitig wird die blutgefüllte Kapillare auf die Fläschchenöffnung aufgesetzt und das Blut durch den Unterdruck in die Verdünnungslösung gesaugt. Durch mehrmaliges, vorsichtiges Zusammendrücken des Fläschchens wird die aufsitzende Kapillare gespült und somit das Blut vollständig in die Verdünnungslösung überführt. Anschließendes Schwenken gewährleistet eine gute Durchmischung von Blut und

¹ Inhalt: 5 %ige Eisessig-Lösung (Fa. Becton Dickinson and Comp., Rutherford, New Jersey, USA)

Verdünnungslösung. Die Blutverdünnung muss zur vollständigen Lyse der Erythrozyten mindestens zehn Minuten ruhen. Danach zieht man die Kapillare aus dem Fläschchen und setzt das Adapterteil mit der Kapillare nach außen auf den Fläschchenhals auf (BECTON DICKINSON AND COMP., 1991)

Nach Verwerfen der ersten Tropfen wird die Blutverdünnung blasenfrei bis zur vollständigen Füllung des gesamten Kammerteils auf die Zählkammer verbracht. Vor der Auszählung lässt man das Gemisch fünf Minuten sedimentieren.

Die Leukozytenzählung erfolgt bei 100 bis 200facher Vergrößerung und klein gestellter Blende durch Auszählung der vier Großquadrate (L) der Zählkammer (s. Abb. 3.5).

Zur Berechnung multipliziert man die erhaltene Zahl von Zellen (n) mit dem Faktor 50 und gibt das Ergebnis in Leukozytenzahl pro Mikroliter Blut an:

$$n \times 50 = \text{Leukozyten}/\mu\text{l}$$

Zur Qualitätskontrolle werden jeweils Doppelzählungen durchgeführt.

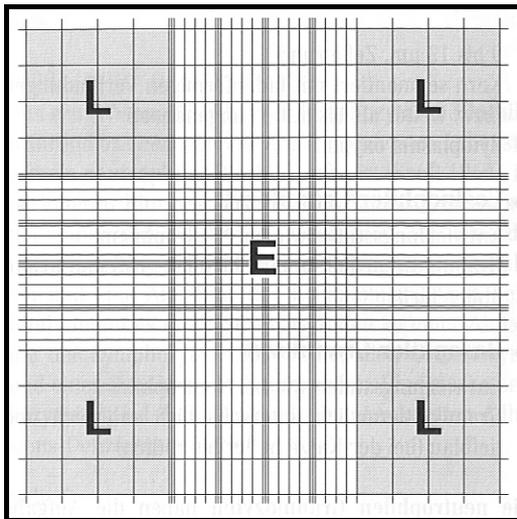


Abbildung 3.5: Neubauer-Zählkammer
E = Erythrozytenzählfeld
L = Leukozytenzählfelder

nach: KRAFT und DÜRR, Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, (1995)

3.2.2.1.2 Erythrozyten- und Thrombozytenbestimmung

a) *CELL-DYN[®] 3500 (Abbott GmbH Diagnostika 1996):*

Die Erythrozyten- und Thrombozytendaten werden im Widerstandsmesskanal ermittelt. Nach Verdünnung einer definierten Probenmenge wird beim Durchtritt der Zellen im Von-Behrens-RBC-/PLT-Transducer (Messeinheit) deren Zahl und Größe nach dem Widerstandsmessprinzip erfasst (Technik s. „WIC-Messung“ Kap. 3.2.2.1.1. a)). Eine bewegliche Schwelle (s.u.) trennt die Thrombozyten von den Erythrozyten. Die zu analysierende Probe von 100 µl wird von der RBC-/PLT-Volumenmeseinheit genau dosiert (Technik s. „Volumetrische Messung“ Kap. 3.2.2.1.1. a)). Liegt der erzeugte Impuls über der unteren PLT-Schwelle (1 fL), wird er als ein PLT registriert. Liegt der erzeugte Impuls hingegen über der unteren RBC-Schwelle (35 fL), wird er als ein RBC registriert. Für jeden der Parameter stehen 256 Größenkanäle zur Verfügung, wobei ein RBC-Größenkanal 1 fL und ein PLT-Größenkanal 0,137 fL entspricht.

Die RBC-Zählung wird um den Koinzidenzverlust korrigiert (analog „WIC-Messung“) und der MCV von der RBC-Größenverteilungskurve (dargestellt als Histogramm) abgeleitet.

Alle Impulse zwischen 1 und 35 fL gehen in die Thrombozytenzählung ein. Liegt keine Interferenz vor, wird die untere und obere Schwelle auf 2 bzw. 30 fL eingestellt. Bei Interferenzen sorgen bewegliche Schwellen für eine bessere Trennung zwischen der Interferenz und der PLT-Population. Die untere Schwelle liegt dann zwischen 1-3 fL und die obere zwischen 15-35 fL. Nach dem Setzen der Schwellen wird die PLT-Zählung aus den dazwischen liegenden Daten ermittelt.

Interferenzen im oberen Schwellenbereich sind in der Regel auf mikrozytäre Erythrozyten oder makrozytäre Thrombozyten zurückzuführen. Daher werden nach dem Setzen der oberen PLT-Schwelle die Daten zwischen dieser und der unteren RBC-Schwelle neu berechnet. Liegt die obere PLT-Schwelle unter 35 fL, werden Zählungen darüber (aber unterhalb der RBC-Schwelle) der RBC-Zählung hinzugerechnet.

Erythrozytenindizes:

MCV Das mittlere Erythrozyteneinzelvolumen (MCV) wird von der RBC-Größenverteilungskurve abgeleitet und in Femtolitern (fL) angegeben (s.o.)

MCH Das mittlere Zellhämoglobin (MCH) ist der durchschnittliche Hämoglobinanteil eines Erythrozyten, der in Picogramm (pg) angegeben wird. Das MCH wird aus den Erythrozyten (RBC) und dem Hämoglobin (HGB) wie folgt errechnet:

$$\text{MCH} = (\text{HGB}/\text{RBC}) \times 10$$

MCHC Die mittlere Zellhämoglobinkonzentration (MCHC) ist die Hämoglobinkonzentration im durchschnittlichen Erythrozyten und wird in Gramm pro Deziliter angegeben. Sie wird aus dem Hämoglobin (HGB) und Hämatokrit (HCT) wie folgt errechnet:

$$\text{MCHC} = (\text{HGB}/\text{HCT}) \times 100$$

RDW Die Verteilungsbreite der Erythrozyten (RDW) ist ein Maß für die Heterogenität der RBC-Population. Vom CELL-DYN® 3500 wird eine relative RDW ausgegeben, die einem Variationskoeffizienten (VK) in Prozent entspricht. Die RDW wird aus dem RBC-Histogramm unter Verwendung der Breite der Erythrozytenkurve bei 50 % der Maximalhöhe abgeleitet.

b) ZÄHLKAMMERMETHODE:

Erythrozytenzählung mit der Zählkammer nach NEUBAUER

Die Vorbereitungen für das Füllen der Zählkammer laufen analog der Leukozytenzählung ab (s. Kap. 3.2.2.1.1b)). Hierbei wird die Erythrozyten-Unopette^{®2} (Fa. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) mit einem Fassungsvermögen von 10 µl verwendet.

Die Erythrozyten werden im mittleren Großquadrat (s. S. 23, Abb. 3.5: **E**) bei 400facher Vergrößerung durch Auswertung von fünf Gruppenquadraten gezählt (s. Abb. 3.6).

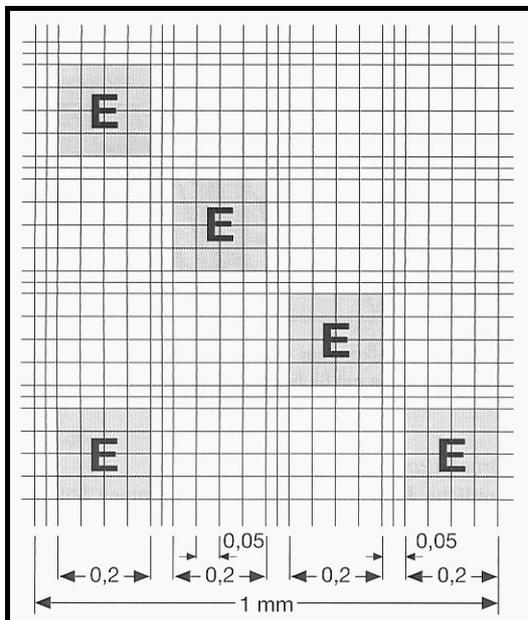


Abbildung 3.6: Erythrozytenzählfeld. Die fünf mit E bezeichneten Gruppenquadrate werden zur Erythrozytenzählung herangezogen.

nach: KRAFT und DÜRR, Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, (1995)

²Inhalt: 0,5 %ige Natriumazid-Natriumchlorid-Lösung (Fa. Becton Dickinson and Comp., Rutherford, New Jersey, USA)

Um Doppelzählungen zu vermeiden wird dabei nach der so genannten L-Regel vorgegangen (s. Abb. 3.7).

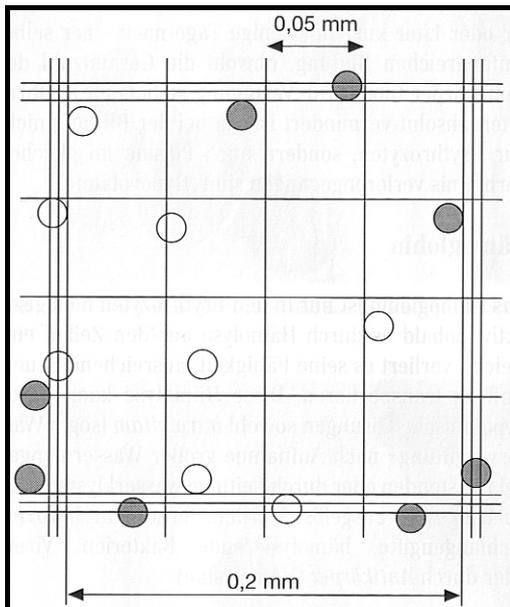


Abbildung 3.7: Alle die innere Linie der linken und unteren Dreifachlinie berührenden und innerhalb des Gruppenquadrates liegenden Zellen werden gezählt (O). Nicht berücksichtigt werden die innere obere und rechte Linie berührende oder außerhalb liegende Zellen.

nach: KRAFT und DÜRR, Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, (1995)

Die erhaltene Zahl von Zellen (n) wird mit dem Faktor 10000 multipliziert. Daraus resultiert die Erythrozytenzahl pro Mikroliter Blut:

$$n \times 10000 = \text{Erythrozytenzahl}/\mu\text{l}$$

Zur Qualitätskontrolle werden jeweils Doppelzählungen durchgeführt.

Thrombozytenzählung in der Zählkammer nach NEUBAUER

Eine mit EDTA beschichtete, 20- μl -End-zu-End-Kapillare der Fa. Sarstedt, Nümbrecht wird vollständig mit Blut gefüllt. Außen anhaftende Blutreste werden vorsichtig mit Zellstoff entfernt und die Kapillare wird in ein Thrombo-plus[®]-Röhrchen³ der Fa. Sarstedt, Nümbrecht gegeben.

Durch Schwenken des Röhrchens wird der Inhalt der Kapillare vollständig in das Reagenz überführt und die Probe gut gemischt. Um eine vollständige Hämolyse der enthaltenen Erythrozyten zu gewährleisten, wird das Probengemisch fünf Minuten

³Inhalt: ?; <2,5 mg Quecksilber/ml Lösung (Fa. Sarstedt, Nümbrecht)

auf dem Blutröhrchen-Roller gerollt. Nach Beschickung der Zählkammer analog der Leukozyten- und Erythrozytenzählung, lässt man das Gemisch fünf bis zehn Minuten sedimentieren.

Fünf Gruppenquadrate des mittleren Großquadrates aus Abb. 3.5 werden bei 400facher Vergrößerung im Phasenkontrastmikroskop ausgewertet.

Durch Multiplikation der erhaltenen Thrombozytenzahl (n) mit dem Faktor 5000 erhält man das Ergebnis pro Mikroliter Blut:

$$n \times 5000 = \text{Thrombozyten}/\mu\text{l}$$

(THROMBO-PLUS® SARSTEDT 1995)

Es werden ebenfalls Doppelzählungen zur Qualitätskontrolle durchgeführt.

3.2.2.1.3 Hämoglobinbestimmung

a) *CELL-DYN® 3500 (Abbott GmbH Diagnostika 1996):*

Der HGB-Kanal dient zur kolorimetrischen Hämoglobinbestimmung. Die Messung erfolgt im Anschluss an die Verdünnung der Probe und Lyse der Erythrozyten gemeinsam mit der WIC-Zählung (s.o.). Das WIC-/HGB-Lyse-Reagenz wandelt das freigesetzte Hämoglobin in ein stabiles Chromogen um. Nach Abschluss der WIC-Zählung wird die Probe in die Hämoglobindurchflussküvette überführt, wo die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration erfolgt. Das von der LED abgegebene Licht passiert die Durchflussküvette und ein 540-nm-Filter, bevor es auf den Photodetektor trifft. Die Hämoglobinkonzentration ist der Absorption der Probe bei 540 nm direkt proportional. An jeder Probe werden fünf separate Hämoglobinbestimmungen vorgenommen. Der endgültige HGB-Wert ist der Mittelwert aus drei Messungen, wobei der höchste und der niedrigste Wert unberücksichtigt bleiben. Nach der Hämoglobinbestimmung wird die HGB-Durchflussküvette mit Detergens gespült. Frisches Detergens dient anschließend der Leerwertbestimmung. Auch hierbei werden 5 Messungen durchgeführt und analog der Probenmessung der Mittelwert bestimmt, der als Referenzwert bei der anschließenden Probenmessung dient. Die HGB-Konzentration der Probe wird mit dem Referenzwert verglichen und das HGB-Ergebnis in Gramm Hämoglobin pro Deziliter Vollblut angegeben.

b) ZYANMETHÄMOGLOBINMETHODE:

Die Hämoglobin-Vergleichsbestimmung wird mit der photometrischen Methode und dem Reagenssatz Hämoglobin-Merckotest[®] der Fa. Merck, Darmstadt, durchgeführt.

Aus den einzelnen Reagenzien des Hämoglobin-Merckotest[®] stellt man zunächst die benötigte Reaktionslösung her. Dazu gibt man in einen 1000-ml-Messkolben 800 ml Aqua bidest., leert dann den Inhalt je einer Flasche Reagenz 1 (Kaliumhexazyanoferat (III)-Lösung) und Reagenz 2 (Kaliumzyanid-Lösung) in den Kolben, spült gut nach und füllt mit Aqua bidest. bis zur 1000-ml-Marke auf.

Durch Mischen von Blut und der hergestellten Reaktionslösung kommt es zu folgender Reaktion:

Das im Blut enthaltene Hämoglobin wird durch Kaliumhexazyanoferat (III) zu Hämoglobin (frühere Bezeichnung: Methämoglobin) oxidiert. Dieses wiederum wird durch Kaliumzyanid in Hämoglobinzyanid (frühere Bezeichnung: Zyanmethämoglobin) umgewandelt, das bei 546 nm ein typisches Absorptionsmaximum aufweist. Durch den im Reaktionsgemisch vorliegenden pH-Wert von 7,2 ist eine vollständige Umwandlung innerhalb von drei Minuten gewährleistet (VAN KAMPEN und ZIJLSTRA 1961).

Diese Lösung ist bei Aufbewahrung in einer dunklen Flasche bei Raumtemperatur mindestens vier Monate haltbar. Bei auftretender Verfärbung oder Trübung ist sie zu verwerfen.

Für die Hämoglobin-Bestimmung mischt man 5 ml der Reaktionslösung mit 0,02 ml Blut. Auf vollständige Überführung des Blutes ist zu achten. Das Probengemisch wird mindestens drei Minuten inkubiert.

Zur Messung wird das Photometer (Spektrallinienphotometer PCP 6121 der Fa. Eppendorf, Hamburg) auf die Schichtdicke ein Zentimeter, bei einem Filter mit der Wellenlänge 546 nm und einem Berechnungsfaktor von 36,8 eingestellt. Als Leerwertbestimmung wird die Extinktion der Reaktionslösung ohne Blut gemessen. Diesen legt das Photometer bei der anschließenden Hämoglobinbestimmung als Nullwert zugrunde. Vor den Probenmessungen wird eine Kontrollmessung mit dem Kontrollblut (CELL-DYN[®]3000 Tri-Level, REF 99106-01, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, 60064, USA) durchgeführt. Liegen die Werte innerhalb der geforderten Bereiche, können die weiteren Messungen erfolgen. Die oben beschriebenen

Einstellungen des Photometers ermöglichen ein direktes Ablesen der Hämoglobin-Konzentration auf der Digitalanzeige (MERCCK-PUBLIKATION 1996)

Zur Qualitätskontrolle werden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.2.2.1.4 Hämatokritbestimmung

a) *CELL-DYN[®] 3500 (ABBOTT GMBH DIAGNOSTIKA 1996):*

Der Hämatokrit (HCT) ist das Verhältnis der zellulären Bestandteile des Blutes zum Blutplasma (PSCHYREMBEL, 1990). Aufgrund der Mengenverhältnisse wird als Hämatokrit im weiteren Sinne der Anteil der Erythrozyten am Plasma bezeichnet. Die korrekte Bezeichnung hierfür lautet im Englischen „packed cell volume“ (PCV).

Im CELL-DYN[®] 3500 wird der HCT (besser PCV) aus der Erythrozyten(RBC)-Zählung und dem mittleren Erythrozyteneinzelvolumen (MCV) wie folgt berechnet:

$$\text{HCT} = (\text{RBC} \times \text{MCV})/10$$

Das Ergebnis wird in % angegeben.

b) *MIKROHÄMATOKRITMETHODE:*

Als Referenzmethode der Hämatokritbestimmung wird die Mikrohämatokritmethode herangezogen.

Hierfür werden spezielle Kapillaren (NH₄-heparinisierte Mikrohämatokritkapillaren der Fa. Brand, Wertheim) in die Blutprobe gehalten, $\frac{3}{4}$ bis $\frac{4}{5}$ über Kapillarwirkung mit Blut gefüllt und an einem Ende mit Spezialkitt (Seal-Ease[®] der Fa. Becton Dickinson and Comp., Rutherford, New Jersey) verschlossen. Die Kapillare wird mit dem verschlossenen Ende in zentrifugaler Richtung auf den Schleuderteller der Mikrohämatokrit-Zentrifuge (Fa. HETTICH, Tuttlingen) gelegt und fünf Minuten mit einer Zentrifugalkraft von 13000 g zentrifugiert (KRAFT und DÜRR 1995; HETTICH-PUBLIKATION 1991).

Der Anteil der Erythrozyten am Gesamtblut kann anschließend mit Hilfe einer Mikrohämatokrit-Schablone oder eines speziellen Auswertgerätes abgelesen werden (BEGEMANN 1997)

3.2.2.1.5 Differentialblutbilderstellung

a) *CELL-DYN® 3500 (ABBOTT GMBH DIAGNOSTIKA 1996 und NEBE 1997):*

Die Leukozyten werden nach Lyse der Erythrozyten durch eine als hydrodynamische Fokussierung bezeichnete Technik (s.o.) wie in einer Perlenkette einzeln einem Messpunkt zugeführt. Dort wird jede Zelle vollständig und einzeln vom Laserstrahl beleuchtet, und das in verschiedene Richtungen gestreute Licht wird durch Detektoren (Photonenvervielfacherröhren oder Photodioden) in seiner Intensität gemessen.

Jeder Raumwinkel erfasst unterschiedliche physikalische und biologische Eigenschaften der Zelle. Das im engen Winkel gestreute Licht (0° bis 3° -Vorwärtstreulicht „SIZE“) ist primär der Zellgröße proportional. 10° Vorwärtstreulicht (7° bis 11° „Complexity“) ist ein relativer Indikator für die Zellstruktur und die Komplexität, das Kern-Zytoplasma-Verhältnis. Das im rechten Winkel gestreute Laserlicht (90° orthogonal [70° bis 110°] „Lobularity“) ist den optischen Phasenübergängen, das heißt dem Granula-Gehalt des Zytoplasmas proportional und zudem ein Maß der Lobularität („Segmentkernigkeit“, lobularity) des Zellkerns. Depolarisierte 90° Lichtstreuung (70° bis 110° , „Granularity“) wird benutzt, um Eosinophile von Neutrophilen und anderen Zellen zu trennen. Dies basiert auf der Tatsache, dass durch Mehrfachreflexion an den Granula der Eosinophilen polarisiertes Laserlicht depolarisiert wird.

Die aus der Lichtstreuung gewonnenen Informationen werden in ein mehrdimensionales Koordinatensystem eingeordnet. Die Messwerte von Zellklassen mit jeweils gleichen optischen Eigenschaften wie Lymphozyten, Monozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten bilden dort Wolken von Messpunkten, die sich eindeutig voneinander abgrenzen lassen und graphisch in Form von Punktwolkendiagrammen (Scattergrammen) ausgegeben werden. Jeder Punkt im Diagramm entspricht einer Zelle und entspricht dem Schnittpunkt der auf der X- und Y-Achse aufgetragenen Kanalzahl.

Im CELL-DYN® 3500 System werden fünf Subpopulationen des weißen Blutbildes und sog. Non-White-Blood-Cells (s.S. 35) farbig dargestellt (s. Abb. 3.8):

- Neutrophile [NEU] (gelb/ beim Ausdrucken rot)
- Lymphozyten [LYM] (blau)
- Monozyten [MONO] (purpurfarben)
- Eosinophile [EOS] (grün)
- Basophile [BASO] (weiß/ beim Ausdrucken schwarz).
- Non-White-Blood-Cells [NWBC] (unterschiedlich farbig)

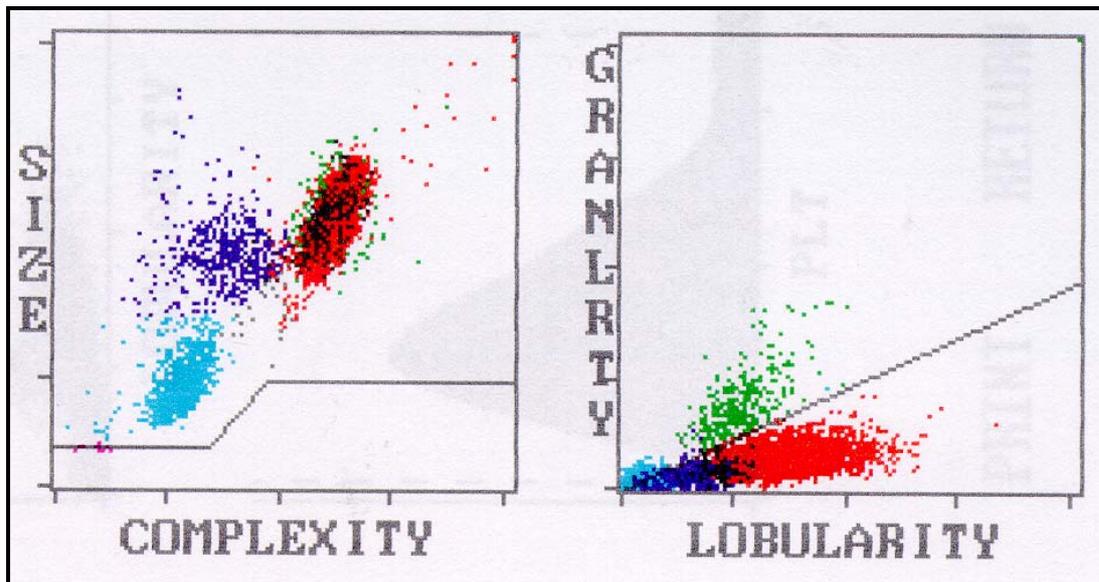


Abbildung 3.8: Ausdruck CELL-DYN® 3500 „physiologisches Blutbild Hund“

Die Analyse der Daten der Leukozytendifferenzierung (sog. Listmode Daten) findet in der Datenstation statt. Sie läuft im mehreren Schritten ab:

1. Schritt (optische Messung)

Das hochauflösende Flowzytometer erfasst von jedem Leukozyten vier verschiedene Streulicht-Parameter. Ein Mikroprozessor sammelt diese Daten und erstellt eine Liste. Bei dieser Stufe sind alle Zellklassifikationen noch unbekannt (s. Abb. 3.9 links).

2. Schritt (Trennung mononukleär und polymorphkernig)

Die Daten der Komplexitäts- (10°) und Lobularitätsmessungen (90°) werden analysiert, und die Zellen werden in zwei Gruppen getrennt, polymorphkernige und mononukleäre Zellen. Eine dynamische Schwelle wird benutzt, um die optimale Trennung zu finden. Jede Zelle wird so entweder als mononukleär

oder polymorphkernig klassifiziert und im Schirmbild und im Ausdruck verschiedenfarbig markiert (s. Abb. 3.9 rechts).

Der Begriff „Nicht-granuliert“ anstelle von „mononukleär“ wäre hier richtiger, weil die so erhaltene Population der mononukleären Zellen auch Basophile enthält. Deren Granula werden durch das Sheath-Reagenz (s.o.) zum Verschwinden gebracht. Der eingeführte Name „mononukleär“ soll hier jedoch beibehalten werden.

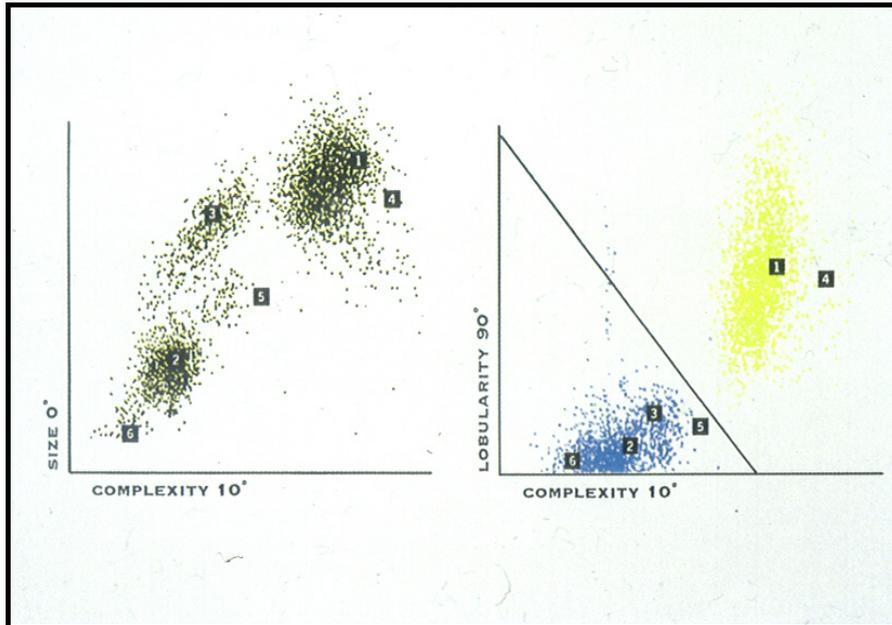


Abbildung 3.9: Schritt eins (links) und zwei (rechts) der Datenanalyse

1: NEU 2: LYM 3: MONO 4: EOS 5: BASO 6: NWBC

nach: CELL-DYN™, M.A.P.S.S. Laser-Differenzierung, „Der Blick in die Zukunft“, (1995)

3. Schritt

(Polymorphkernige: Unterklassifizierung in Neutrophile und Eosinophile)

Zellen, die als polymorphkernig identifiziert wurden, werden anschließend auf ihre Granularität, („Körnigkeit“, 90° depolarisiert) und ihre Lobularität (90°) geprüft. Dabei werden die Zellen entweder als Neutrophile oder als Eosinophile klassifiziert, wobei eine automatisch arbeitende („gleitende“) Schwelle verwendet wird, um die beste Trennung zwischen den Gruppen zu finden. Die mononukleären Zellen wurden bereits als noch einheitliche Gruppe im Schritt zwei identifiziert und interferieren deshalb nicht bei der weiteren Klassifikation der polymorphkernigen Zellen. Jede Zelle, die so als NEU oder EOS klassifiziert wurde, wird im Monitorbild und im Ausdruck mit verschiedenen Farbmarkierungen versehen (s. Abb. 3.10 links).

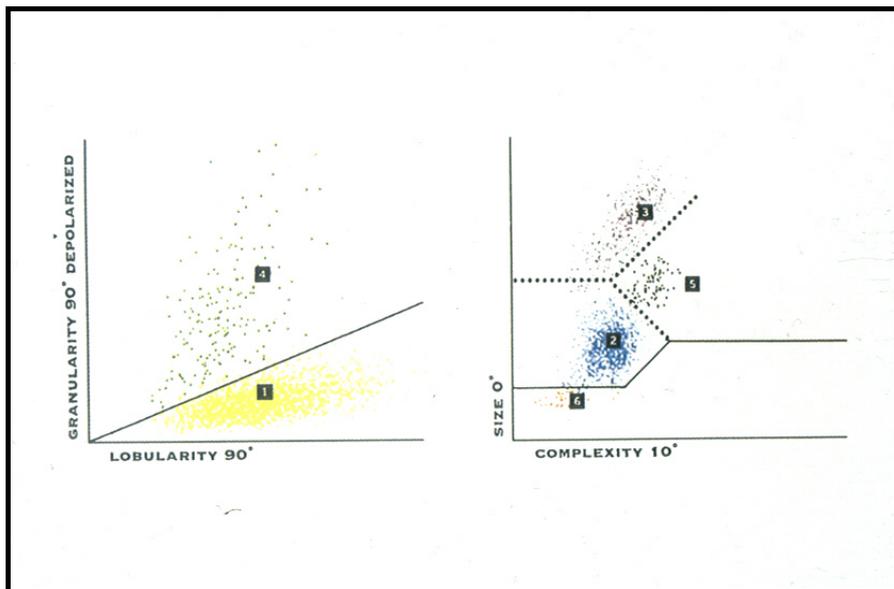


Abbildung 3.10: Schritt drei (links) und vier (rechts) der Datenanalyse

1: NEU 2: LYM 3: MONO 4: EOS 5: BASO 6: NWBC

nach: CELL-DYN™, M.A.P.S.S. Laser-Differenzierung, „Der Blick in die Zukunft“, (1995)

4. Schritt: (Mononukleäre: Unterklassifizierung in Lymphozyten, Monozyten und Basophile)

Mononukleäre Zellen werden durch Messung der Größe (0°) und der Komplexität (10°) weiter analysiert. Die Zellen werden dann unter Verwendung gleitender Schwellen (optimale Trennung) als Lymphozyten, Monozyten und Basophile klassifiziert. Analog zu Schritt drei werden ausschließlich die im Schritt zwei als mononukleär klassifizierten Zellen weiter analysiert, so dass die polymorphkernigen Zellen hierbei nicht interferieren. Jede Zelle wird dann entsprechend als LYM, MONO oder BASO am Monitor und im Ausdruck mit verschiedenen Farbmarkierungen versehen (s. Abb. 3.10 rechts).

5. Schritt: (Kombination aller Klassifizierungen)

Wenn die Auswertung der Listmode-Daten vollständig ist, liegt ein genaues Bild der Leukozyten-Klassen vor. Jede Zelle wurde identifiziert und dann in einer individuellen Farbe auf dem Monitor und im Ausdruck dargestellt (s. Abb. 3.11).

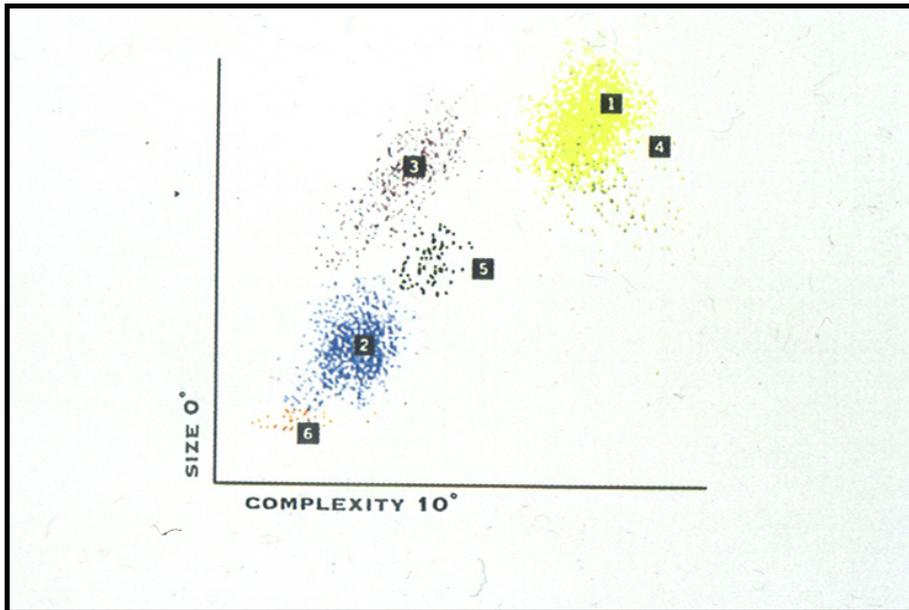


Abbildung 3.11: Schritt fünf der Datenanalyse

1: NEU 2: LYM 3: MONO 4: EOS 5: BASO 6: NWBC

nach: CELL-DYN™, M.A.P.S.S. Laser-Differenzierung, „Der Blick in die Zukunft“, (1995)

Schließlich bewertet das Gerät den Bereich, der zwar unterhalb der Lymphozyten-Wolke, aber oberhalb der von der Hardware vorgegebenen Schwelle (Kanal 23) liegt (s. Abb. 3.11, Punkt 6). Über eine bewegliche Schwelle werden alle Partikel, die in diesem Bereich fallen, von den Lymphozyten getrennt.

In diesem Bereich sind unter anderem folgende Zelltypen zu finden (sog. Non-White-Blood-Cells, NWBC's):

- Erythroblasten (Normoblasten, kernhaltige Erythrozyten)
- Unlysierte Erythrozyten
- Riesenthrombozyten
- Thrombozytenaggregate.

Die im WIC-Kanal gewonnenen Daten (s. Kap. 3.2.2.1.1 „Leukozytenbestimmung“) werden auch zur Identifizierung dieser Partikel verwendet, die nicht in die Leukozyten-Zählung und Leukozyten-Differenzierung einbezogen werden.

b) MIKROSKOPISCHE DIFFERENZIERUNG:

Aus einer gut gemischten Blutprobe wird ein kleiner Tropfen auf das Ende eines fettfreien Objektträgers aufgebracht und mit einem zweiten Objektträger ausgestrichen, in dem dieser von Vorne an den Blutstropfen herangeführt wird. Anschließend lässt man den Ausstrich einige Minuten lufttrocknen, bevor er gefärbt wird (KRAFT et al. 1995). Als Methode der Ausstrichfärbung wird die Wright-Färbung verwendet.

Es werden jeweils 400 Leukozyten pro Blutausstrich bei 1000facher Vergrößerung (Ölimmersion) beurteilt.

Prinzip der Wright-Färbung

Die Färbung der gut getrockneten Blutausstriche erfolgt automatisch im Ames-Hema-Tek-Slide-Stainer. Sie wird in vier chronologischen Schritten vollzogen. Zunächst werden die Blutausstriche mit Methylalkohol fixiert. Methylenblau, als basischer Farbstoff, wird von der basophilen Kernstruktur adsorbiert, während Eosin, als saurer Farbstoff, sich mit den basischen Bestandteilen im Zytoplasma verbindet. Abschließend wird der Objektträger durch eine Spülflüssigkeit von überschüssiger Färbelösung befreit und in einem Gebläseluftstrom getrocknet.

3.2.2.2 Methoden der Datengewinnung

Die Probenbearbeitungen und Probenauswertungen wurden sowohl bei der Qualitätskontrolle als auch beim Methodenvergleich ausschließlich von einer Person durchgeführt.

3.2.2.2.1 Qualitätskontrolle

Auf die internen Qualitätskontrollen des Gerätes wurde bereits im Kapitel 3.2.1.3.1 eingegangen. Darüber hinaus wurden Präzisionsmessungen in Serie und Untersuchungen zur Blutprobenlagerungsfähigkeit durchgeführt.

Bei der Präzisionsmessung in Serie wurden für den CELL-DYN® 3500 und die Handmessungen jeweils fünf Katzen- und fünf Hundebloodproben herangezogen.

Alle hierbei überprüften Parameter (Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenzahl, Hämatokrit, Hämoglobinkonzentration, sowie die relativen Zahlen der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, der Lymphozyten und Monozyten) wurden zehnmal in unmittelbarer Folge sowohl vom Gerät als auch von Hand bestimmt.

Es wurden die relativen Zahlen des Differentialblutbildes herangezogen, da dies die sowohl vom Gerät als auch die mit der Referenzmethode direkt bestimmten Werte sind. Die Absolutzahlen der Leukozytensubpopulationen werden vom Gerät wie auch bei der mikroskopischen Blutzelldifferenzierung aus den Relativzahlen und der gemessenen Leukozytenzahl ermittelt:

$$\text{Relativzahl (in \%)} \times \text{Leukozytenzahl (pro } \mu\text{l Blut)} = \text{Absolutzahl (pro } \mu\text{l Blut)}$$

Auf die Überprüfung der basophilen Granulozyten wurde sowohl bei der Qualitätskontrolle als auch beim Methodenvergleich verzichtet. Diese Zellen kommen wenn überhaupt nur in minimaler Konzentration im Hunde- und Katzenblut vor. Um im Blutausschlag nicht übersehen zu werden, müssen sie zuverlässig zu ca. 3% bis 6% im Blut präsent sein, was sehr selten der Fall ist (LATIMER und TVEDTEN 1999).

Bei der Überprüfung der Lagerungsfähigkeit der Blutproben wurden die oben genannten Parameter sowohl mit dem CELL-DYN® 3500 als auch mit der jeweiligen Referenzmethode am Tag der Blutentnahme, nach 24 h, 48 h, 72 h und nach einer Woche bestimmt. Hierzu wurden ebenfalls je fünf Hunde- und fünf Katzenblutproben herangezogen.

3.2.2.2 Methodenvergleich

Der Vergleich der Ergebnisse, die vom CELL-DYN® 3500 und der jeweiligen Referenzmethode ermittelt wurden, stützt sich auf mindestens jeweils 100 Wertepaare bei Hund und Katze.

3.2.2.3 Statistische Methoden

Für die Auswertung der Daten wurde das Datenverarbeitungspaket SPSS („Statistical Package for the Social Sciences“) für Windows 95 in der Version 7,5 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) verwendet.

3.2.2.3.1 Deskriptive Statistik

Die Auswertung der Daten aus den Präzisionsmessungen und dem Methodenvergleich wurden mittels deskriptiver Statistik durchgeführt. Die Höchst- und Tiefstwerte, die errechneten Mittelwerte und die Streuungsmaße (Standardabweichung und Variationskoeffizienten) wurden tabellarisch dargestellt.

3.2.2.3.2 Liniendiagramme

Die Untersuchungen zur Blutprobenlagerungsfähigkeit wurden mittels Liniendiagrammen graphisch dargestellt. Jede Linie beschreibt den zeitlichen Verlauf der Messwerte eines bestimmten Parameters vom Beginn der Untersuchung am Tag der Blutentnahme über 24 h, 48 h, 72 h bis zum Ende der Untersuchung nach einer Woche.

3.2.2.3.3 Lineare Regressionsanalyse und Pearsonscher Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient

Als Auswertungsverfahren für den Methodenvergleich wurde die lineare Regressionsanalyse herangezogen. Mit ihr ist es möglich, Abhängigkeiten zwischen metrischen skalierten, quantitativen Merkmalen zu untersuchen. Nach der Methode der kleinsten Quadrate werden Regressionsgeraden bestimmt, um den linearen Zusammenhang der beobachteten Werte graphisch darstellen zu können. Als Zusammenhangsmaß dient der dazugehörige Pearsonsche Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient. Sowohl tabellarische als auch graphische Darstellungen der Daten sollen eine bessere Übersicht vermitteln.

3.2.2.3.4 Bland-Altman Plots

Die Daten des Methodenvergleiches wurden zusätzlich der Untersuchungsmethode nach BLAND und ALTMAN (1986) unterzogen. Diese Methode ist speziell für die Vergleichsuntersuchungen geeignet, bei denen der „wahre Wert“ nicht bekannt ist, wie z.B. bei einem Vergleich eines neuen Gerätes mit einem Standardgerät oder einer Standardmessmethode. Sie ermöglicht, die Unterschiede zweier Messmethoden (Y-Achse) in Bezug auf den absoluten Wertebereich (X-Achse) graphisch darzustellen. Dazu wird in einem Streudiagramm die Differenz der Wertepaare gegen ihren Mittelwert aufgetragen. Zusätzlich findet eine Berechnung und tabellarische Auflistung der mittleren Differenz (mean) und der Standardabweichung der Differenzen statt. Die mittlere Differenz gibt den Wert an, in dem sich zwei Geräte oder Messmethoden durchschnittlich unterscheiden. Die Variabilität der Differenzen wird durch die Standardabweichung bestimmt. Als tolerierbare Streuung wurde die zweifache Standardabweichung graphisch in die Streudiagramme eingezeichnet.

3.2.2.3.5 T-Test für unabhängige Stichproben

Um die Signifikanz eventueller Veränderungen der Messwerte bei der Probenlagerung zu ermitteln, fand der t-Test für unabhängige Stichproben Anwendung. Der Test ist geeignet zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben bei metrischen Daten.

Konkret sollte hierbei überprüft werden, ob abhängig oder unabhängig von der Art der Probenlagerung die Messwerte des CELL-DYN[®] 3500 nach 48 Stunden (h) statistisch signifikante Unterschiede zu den Ausgangsmesswerten am Tag der Blutprobenentnahme aufweisen. Der Zeitpunkt 48 h wurde so gewählt, da angenommen wurde, dass bei postalischem Versand von Blutproben im Rahmen der Diagnostik eines niedergelassenen Tierarztes, dies die zu erwartende Zeitspanne bis zur Analyse im Einsendelabor darstellt.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Qualitätskontrolle

3.3.1.1 Präzision in der Serie

Bei der Präzision in Serie wurden für jeden Parameter von jeder Tierart fünf Blutproben zehnmal in direkter Folge im CELL-DYN[®] 3500 und mit der jeweiligen Referenzmethode analysiert. Aus den daraus resultierenden Ergebnissen wurden die Höchst-, Tiefst- und Mittelwerte bestimmt sowie die Standardabweichung und der Variationskoeffizient berechnet. Es wurden für jede Tierart und jeden Parameter die fünf Blutproben einzeln tabellarisch dargestellt (s. Tab. 3.1 bis 3.36). Hierbei war die Reihenfolge willkürlich gewählt, es wurden immer alle gemessenen Parameter aus derselben Probe bestimmt. Zusätzlich wurden die fünf Blutproben gemittelt und in jeweils einer Tabelle pro Tierart zusammengefasst (s. Tab. 3.37 und 3.38). Wie aus diesen Übersichtstabellen ersichtlich ist, erzielte der CELL-DYN[®] 3500 durchweg bessere Präzisionsergebnisse, die aber für die einzelnen Parameter und auch zum Teil in Abhängigkeit von der Tierart unterschiedlich gut waren.

3.3.1.1.1 CELL-DYN[®] 3500

Die Variationskoeffizienten des Gerätes lagen bei fast allen untersuchten Parameter beim Hund unter 5%. Bei den Monozyten und eosinophile Granulozyten lagen die Werte bei 11% bzw. 31% (s. Tab. 3.38).

Die Variationskoeffizienten des Gerätes lagen bei der Katze bei den Parametern Thrombozyten, Monozyten, Lymphozyten und eosinophile Granulozyten bei 10%, 15%, 7% bzw. 9%. Der Variationskoeffizient der restlichen Parameter war wie beim Hund unter 5% (s. Tab. 3.37).

3.3.1.1.2 Referenzmethoden

Mit Ausnahme der Parameter Hämatokrit und Hämoglobin waren die Variationskoeffizienten bei beiden Tierarten deutlich größer als 5%. Besonders hoch lagen die Werte bei den Parametern Thrombozyten (beim Hund 14% und bei der Katze 13%), Lymphozyten (46% bzw. 37%), Monozyten (33% bzw. 125%) und eosinophile Granulozyten (50% bzw. 93%) (s. Tab. 3.37 und 3.38).

Tab. 3.1: Präzision in der Serie (CELL-DYN® 3500): Leukozyten Hund in $10^3/\mu\text{l}$

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	Variations- koeffizient
1	8,36	8,63	8,51	8,53	0,07	0,87
2	10,10	10,70	10,31	10,25	0,21	2,02
3	11,10	12,30	11,84	12,00	0,44	3,67
4	10,70	11,20	10,95	10,95	0,18	1,63
5	6,37	7,09	6,72	6,72	0,19	2,72

Tab. 3.2: Präzision in der Serie (Referenzmethode): Leukozyten Hund in $10^3/\mu\text{l}$

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	Variations- koeffizient
1	9,70	11,25	10,40	10,35	0,58	5,57
2	6,00	7,30	6,60	6,60	0,39	5,90
3	23,70	26,80	25,21	25,08	1,04	4,12
4	14,00	18,95	15,89	15,68	1,57	9,89
5	5,40	7,15	6,14	6,03	0,50	8,17

Tab. 3.3: Präzision in der Serie (CELL-DYN® 3500): Leukozyten Katze in $10^3/\mu\text{l}$

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	Variations- koeffizient
1	8,17	8,50	8,40	8,42	0,11	1,28
2	4,18	4,63	4,48	4,52	0,15	3,39
3	3,48	3,92	3,76	3,80	0,16	4,31
4	19,80	20,90	20,45	20,60	0,41	2,02
5	5,93	6,62	6,24	6,15	0,28	4,45

Tab. 3.4: Präzision in der Serie (Referenzmethode): Leukozyten Katze in $10^3/\mu\text{l}$

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	Variations- koeffizient
1	9,95	11,80	10,87	10,78	0,55	5,03
2	14,80	16,95	15,79	15,63	0,72	4,58
3	8,30	9,45	8,93	8,95	0,34	3,84
4	33,00	38,70	35,37	35,55	1,79	5,05
5	9,20	12,55	10,48	10,60	1,01	9,69

Tab. 3.5: Präzision in der Serie (CELL-DYN® 3500): Erythrozyten Hund in $10^6/\mu\text{l}$

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standardabweichung	Variationskoeffizient
1	5,65	5,82	5,71	5,71	0,05	0,92
2	8,91	9,01	8,96	8,97	0,04	0,42
3	6,37	6,53	6,43	6,43	0,05	0,75
4	7,98	8,25	8,09	8,08	0,07	0,88
5	6,87	7,07	7,00	7,00	0,06	0,82

Tab. 3.6: Präzision in der Serie (Referenzmethode): Erythrozyten Hund in $10^6/\mu\text{l}$

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standardabweichung	Variationskoeffizient
1	6,23	8,06	7,18	7,21	0,55	7,73
2	6,31	8,16	7,33	7,35	0,61	8,26
3	1,13	1,54	1,32	1,29	0,15	11,57
4	2,85	3,78	3,40	3,46	0,31	9,11
5	6,18	8,53	7,18	7,22	0,78	10,91

Tab. 3.7: Präzision in der Serie (CELL-DYN® 3500): Erythrozyten Katze in $10^6/\mu\text{l}$

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standardabweichung	Variationskoeffizient
1	10,60	10,90	10,71	10,70	0,10	0,93
2	6,98	7,25	7,14	7,16	0,08	1,13
3	7,47	7,64	7,55	7,55	0,06	0,79
4	7,60	7,94	7,75	7,77	0,12	1,55
5	4,56	4,67	4,61	4,61	0,05	1,01

Tab. 3.8: Präzision in der Serie (Referenzmethode): Erythrozyten Katze in $10^6/\mu\text{l}$

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standardabweichung	Variationskoeffizient
1	7,71	8,50	8,27	8,35	0,25	3,00
2	5,75	7,27	6,44	6,34	0,48	7,49
3	8,97	10,55	9,79	9,77	0,48	4,93
4	3,87	4,90	4,35	4,45	0,31	7,21
5	9,15	10,32	9,79	9,90	0,39	4,00

Tab. 3.9: Präzision in der Serie (CELL-DYN® 3500): Thrombozyten Hund in $10^3/\mu\text{l}$

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standardabweichung	Variationskoeffizient
1	276,00	303,00	292,40	293,50	8,49	2,90
2	203,00	220,00	214,20	214,00	5,22	2,44
3	382,00	437,00	405,90	405,00	13,64	3,36
4	202,00	225,00	216,80	221,50	9,17	4,23
5	262,00	286,00	274,20	275,50	6,81	2,48

Tab. 3.10: Präzision in der Serie (Referenzmethode): Thrombozyten Hund in $10^3/\mu\text{l}$

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standardabweichung	Variationskoeffizient
1	280,00	335,00	296,50	292,50	19,30	6,51
2	245,00	340,00	287,00	280,00	25,08	8,74
3	75,00	140,00	100,00	97,50	20,95	20,95
4	25,00	60,00	35,50	32,50	9,85	27,74
5	300,00	405,00	334,50	325,00	31,92	9,54

Tab. 3.11: Präzision in der Serie (CELL-DYN® 3500): Thrombozyten Katze in $10^3/\mu\text{l}$

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standardabweichung	Variationskoeffizient
1	293,00	379,00	326,40	320,00	27,15	8,32
2	162,00	237,00	194,56	192,00	25,73	13,22
3	241,00	386,00	286,88	262,50	52,34	18,24
4	389,00	441,00	413,88	409,00	17,48	4,22
5	37,50	45,00	40,98	40,05	3,05	7,45

Tab. 3.12: Präzision in der Serie (Referenzmethode): Thrombozyten Katze in $10^3/\mu\text{l}$

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standardabweichung	Variationskoeffizient
1	450,00	530,00	483,50	480,00	23,81	4,92
2	495,00	550,00	523,00	530,00	19,03	3,64
3	150,00	380,00	268,50	275,00	63,77	23,75
4	230,00	315,00	285,00	287,50	25,82	9,06
5	150,00	330,00	217,50	205,00	52,61	24,19

Tab. 3.13: Präzision in der Serie (CELL-DYN® 3500): Hämoglobin Hund in g/dl

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	Variations- koeffizient
1	13,20	13,50	13,39	13,40	0,11	0,82
2	21,40	21,70	21,54	21,50	0,08	0,39
3	15,50	16,10	15,72	15,70	0,17	1,07
4	19,00	19,40	19,14	19,10	0,14	0,75
5	17,30	17,80	17,56	17,60	0,18	1,01

Tab. 3.14: Präzision in der Serie (Referenzmethode): Hämoglobin Hund in g/dl

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	Variations- koeffizient
1	16,17	17,01	16,50	16,52	0,29	1,73
2	16,50	18,20	17,25	17,40	0,50	2,88
3	7,17	8,26	7,61	7,44	0,41	5,36
4	9,44	10,14	9,76	9,74	0,22	2,27
5	15,70	17,02	16,30	16,21	0,40	2,46

Tab. 3.15: Präzision in der Serie (CELL-DYN® 3500): Hämoglobin Katze in g/dl

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	Variations- koeffizient
1	16,80	17,10	16,95	16,90	0,10	0,57
2	10,30	10,50	10,46	10,50	0,07	0,69
3	10,70	10,90	10,83	10,80	0,07	0,65
4	10,50	10,80	10,63	10,60	0,10	0,97
5	8,89	9,07	8,95	8,91	0,07	0,74

Tab. 3.16: Präzision in der Serie (Referenzmethode): Hämoglobin Katze in g/dl

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	Variations- koeffizient
1	12,50	12,91	12,73	12,76	0,13	1,02
2	10,11	11,02	10,53	10,42	0,36	3,42
3	14,18	14,62	14,39	14,40	0,17	1,19
4	6,43	6,99	6,66	6,61	0,20	2,96
5	13,45	13,78	13,61	13,62	0,10	0,75

Tab. 3.17: Präzision in der Serie (CELL-DYN® 3500): Hämatokrit Hund in %

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standardabweichung	Variationskoeffizient
1	38,00	39,60	38,75	38,65	0,46	1,17
2	61,00	62,00	61,35	61,30	0,32	0,52
3	44,60	45,90	45,16	45,10	0,35	0,77
4	54,20	56,00	54,72	54,60	0,52	0,96
5	48,70	50,40	49,83	49,90	0,49	0,98

Tab. 3.18: Präzision in der Serie (Referenzmethode): Hämatokrit Hund in %

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standardabweichung	Variationskoeffizient
1	48,00	50,00	48,70	49,00	0,67	1,39
2	48,00	50,00	49,00	49,00	0,82	1,67
3	19,00	20,00	19,90	20,00	0,32	1,59
4	28,00	29,00	28,20	28,00	0,42	1,50
5	48,00	49,00	48,10	48,00	0,32	0,66

Tab. 3.19: Präzision in der Serie (CELL-DYN® 3500): Hämatokrit Katze in %

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standardabweichung	Variationskoeffizient
1	49,10	50,60	49,80	49,85	0,50	1,00
2	30,80	32,00	31,63	31,80	0,42	1,32
3	32,70	33,80	33,25	33,25	0,35	1,07
4	30,50	31,80	31,15	31,15	0,40	1,28
5	28,80	29,70	29,16	29,10	0,29	0,99

Tab. 3.20: Präzision in der Serie (Referenzmethode): Hämatokrit Katze in %

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standardabweichung	Variationskoeffizient
1	36,00	37,00	36,20	36,00	0,42	1,16
2	27,00	28,00	27,60	28,00	0,52	1,87
3	42,00	44,00	43,20	43,00	0,63	1,46
4	20,00	21,00	20,30	20,00	0,48	2,38
5	42,00	44,00	42,90	43,00	0,57	1,32

Tab. 3.21: Präzision in der Serie (CELL-DYN® 3500): Neutrophile Granulozyten Hund in %

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard-abweichung	Variations-koeffizient
1	61,40	64,80	63,46	63,60	0,94	1,48
2	75,80	77,90	76,95	76,90	0,74	0,97
3	49,70	52,20	50,82	50,85	0,67	1,31
4	71,30	74,60	72,35	71,95	1,18	1,64
5	60,30	64,30	62,57	62,75	1,39	2,23

Tab. 3.22: Präzision in der Serie (Referenzmethode): Neutrophile Granulozyten Hund in %

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard-abweichung	Variations-koeffizient
1	90,00	98,00	93,60	93,00	2,84	3,03
2	39,00	59,00	51,90	52,00	6,61	12,73
3	55,00	76,00	64,60	61,00	7,18	11,12
4	65,00	79,00	71,10	71,00	4,79	6,74
5	58,00	70,00	62,60	61,00	3,41	5,44

Tab. 3.23: Präzision in der Serie (CELL-DYN® 3500): Neutrophile Granulozyten Katze in %

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard-abweichung	Variations-koeffizient
1	65,00	67,40	66,30	66,40	0,73	1,09
2	57,30	59,60	58,31	58,15	0,74	1,26
3	57,20	62,40	59,86	60,00	1,70	2,83
4	86,50	88,70	87,67	87,40	0,87	0,99
5	64,50	67,50	65,68	65,60	1,16	1,76

Tab. 3.24: Präzision in der Serie (Referenzmethode): Neutrophile Granulozyten Katze in %

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard-abweichung	Variations-koeffizient
1	38,00	57,00	49,00	48,00	6,93	14,14
2	90,00	98,00	94,60	94,00	2,32	2,45
3	84,00	96,00	90,40	91,00	3,63	4,00
4	71,00	86,00	76,60	75,00	4,06	5,30
5	59,00	81,00	72,80	74,00	6,29	8,63

Tab. 3.25: Präzision in der Serie (CELL-DYN® 3500): Lymphozyten Hund in %

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	Variations- koeffizient
1	13,30	15,00	14,28	14,50	0,55	3,88
2	15,50	17,30	16,44	16,50	0,63	3,85
3	37,80	39,50	38,52	38,55	0,48	1,25
4	9,01	11,40	10,30	10,40	0,69	6,73
5	20,70	24,50	22,72	23,05	1,37	6,01

Tab. 3.26: Präzision in der Serie (Referenzmethode): Lymphozyten Hund in %

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	Variations- koeffizient
1	0,00	2,00	0,50	0,00	0,71	141,42
2	26,00	51,00	37,70	36,00	6,96	18,46
3	7,00	25,00	15,50	15,00	5,62	36,27
4	12,00	26,00	18,00	16,00	4,52	25,12
5	24,00	31,00	27,00	26,00	2,36	8,73

Tab. 3.27: Präzision in der Serie (CELL-DYN® 3500): Lymphozyten Katze in %

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	Variations- koeffizient
1	22,10	23,80	23,00	22,95	0,57	2,48
2	16,80	19,30	18,14	18,00	0,92	5,06
3	22,50	26,80	24,19	23,50	1,51	6,26
4	7,11	8,35	7,79	7,70	0,44	5,66
5	19,90	26,50	23,66	24,20	2,71	11,46

Tab. 3.28: Präzision in der Serie (Referenzmethode): Lymphozyten Katze in %

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	Variations- koeffizient
1	38,00	59,00	48,10	48,00	6,66	13,84
2	0,00	5,00	2,20	2,00	1,75	79,60
3	2,00	15,00	7,30	7,00	3,83	52,48
4	11,00	27,00	20,40	22,00	4,38	21,45
5	19,00	41,00	26,80	26,00	6,00	22,37

Tab. 3.29: Präzision in der Serie (CELL-DYN® 3500): Monozyten Hund in %

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	Variations- koeffizient
1	19,80	21,20	20,72	20,80	0,49	2,36
2	0,37	1,12	0,69	0,72	0,25	35,70
3	8,56	10,30	9,63	9,76	0,57	5,95
4	9,01	11,80	10,09	9,95	0,73	7,26
5	9,19	10,90	9,91	9,91	0,56	5,66

Tab. 3.30: Präzision in der Serie (Referenzmethode): Monozyten Hund in %

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	Variations- koeffizient
1	2,00	9,00	5,90	6,00	2,60	44,09
2	2,00	13,00	6,50	6,00	3,37	51,92
3	12,00	24,00	17,60	15,00	3,89	22,12
4	8,00	14,00	9,90	9,00	1,97	19,89
5	3,00	10,00	6,90	7,00	2,08	30,13

Tab. 3.31: Präzision in der Serie (CELL-DYN® 3500): Monozyten Katze in %

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	Variations- koeffizient
1	4,23	5,66	4,80	4,77	0,42	8,82
2	17,50	20,00	18,44	18,05	0,84	4,57
3	4,88	10,30	7,11	7,02	1,78	24,97
4	2,47	4,19	3,36	3,31	0,70	20,82
5	7,14	10,20	8,65	8,07	1,41	16,25

Tab. 3.32: Präzision in der Serie (Referenzmethode): Monozyten Katze in %

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	Variations- koeffizient
1	0,00	3,00	0,80	0,00	1,03	129,10
2	1,00	4,00	2,50	2,00	0,85	33,99
3	0,00	5,00	1,70	1,00	1,83	107,58
4	1,00	5,00	2,90	3,00	1,20	41,28
5	0,00	4,00	0,40	0,00	1,26	316,23

Tab. 3.33: Präzision in der Serie (CELL-DYN® 3500): Eosinophile Granulozyten Hund in %

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard-abweichung	Variations-koeffizient
1	0,03	1,35	0,67	0,69	0,43	65,00
2	5,42	6,66	5,90	5,84	0,40	6,73
3	0,09	1,31	0,75	0,84	0,50	66,39
4	5,50	8,10	7,09	7,21	0,75	10,56
5	3,79	4,99	4,37	4,47	0,38	8,66

Tab. 3.34: Präzision in der Serie (Referenzmethode): Eosinophile Granulozyten Hund in %

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard-abweichung	Variations-koeffizient
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	2,00	9,00	3,90	3,00	2,02	51,92
3	0,00	4,00	2,30	2,00	1,49	64,97
4	0,00	3,00	1,00	1,00	0,94	94,28
5	1,00	6,00	3,50	3,00	1,43	40,96

Tab. 3.35: Präzision in der Serie (CELL-DYN® 3500): Eosinophile Granulozyten Katze in %

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard-abweichung	Variations-koeffizient
1	4,29	5,04	4,62	4,60	0,25	5,36
2	4,18	5,30	4,92	5,00	0,35	7,10
3	8,01	9,30	8,74	8,92	0,47	5,33
4	0,63	0,85	0,74	0,74	0,08	11,44
5	1,31	1,91	1,63	1,68	0,23	13,81

Tab. 3.36: Präzision in der Serie (Referenzmethode): Eosinophile Granulozyten Katze in %

Probennummer	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standard-abweichung	Variations-koeffizient
1	1,00	6,00	2,40	2,00	1,35	56,25
2	0,00	2,00	0,70	1,00	0,67	96,41
3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	1,00	0,10	0,00	0,32	316,20
5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tab. 3.37: Zusammenfassung Präzision in der Serie (Katze)

Parameter	Methode	n	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standardab- weichung	Variations- koeffizient
Leukozyten (10 ³ /µl)	CD	5	8,31	8,91	8,67	8,70	0,22	3,09
	M	5	15,05	17,89	16,29	16,30	0,88	5,64
Erythrozyten (10 ⁶ /µl)	CD	5	7,44	7,68	7,55	7,56	0,08	1,08
	M	5	7,09	8,31	7,73	7,76	0,38	5,33
Thrombozyten (10 ³ /µl)	CD	5	224,50	297,60	252,35	244,71	25,15	10,29
	M	5	295,00	421,00	355,50	355,50	37,01	13,11
Hämoglobin (g/dl)	CD	5	11,44	11,67	11,56	11,54	0,08	0,72
	M	5	11,33	11,86	11,58	11,56	0,19	1,87
Hämatokrit (%)	CD	5	34,38	35,58	35,00	35,03	0,39	1,13
	M	5	34,00	34,80	34,04	34,00	0,52	1,64
Neutrophile Granulozyten (%)	CD	5	66,10	69,12	67,56	67,51	1,04	1,59
	M	5	68,40	83,60	76,68	76,40	4,65	6,90
Lymphozyten (%)	CD	5	17,68	20,95	19,36	19,27	1,23	6,18
	M	5	14,00	29,40	20,96	21,00	4,52	37,95
Monozyten (%)	CD	5	7,24	10,07	8,47	8,24	1,03	15,09
	M	5	0,40	4,20	1,66	1,20	1,23	125,64
Eosinophile Granulozyten (%)	CD	5	3,68	4,48	4,13	4,19	0,28	8,61
	M	5	0,20	1,80	0,64	0,60	0,47	93,77

n = Anzahl der Blutproben, die jeweils zehnmal in Folge gemessen wurden, CD = CELL-DYN® 3500,
M = jeweilige Referenzmethode

Tab. 3.38: Zusammenfassung Präzision in der Serie (Hund)

Parameter	Methode	n	Tiefstwert	Höchstwert	Mittelwert	Median	Standardab- weichung	Variations- koeffizient
Leukozyten (10 ³ /µl)	CD	5	9,33	9,98	9,67	9,69	0,22	2,18
	M	5	11,76	14,29	12,85	12,75	0,82	6,73
Erythrozyten (10 ⁶ /µl)	CD	5	7,16	7,34	7,24	7,24	0,05	0,76
	M	5	4,54	6,01	5,28	5,31	0,48	9,52
Thrombozyten (10 ³ /µl)	CD	5	265,00	294,20	280,70	281,90	8,67	3,08
	M	5	185,00	256,00	210,70	205,50	21,42	14,70
Hämoglobin (g/dl)	CD	5	17,28	17,70	17,47	17,46	0,14	0,81
	M	5	13,00	14,13	13,43	13,46	0,36	2,94
Hämatokrit (%)	CD	5	49,30	50,78	49,96	49,91	0,43	0,88
	M	5	38,20	39,60	38,78	38,80	0,51	1,36
Neutrophile Granulozyten (%)	CD	5	63,70	66,76	65,23	65,21	0,98	1,53
	M	5	61,40	76,40	68,76	67,60	4,97	7,81
Lymphozyten (%)	CD	5	19,26	21,54	20,45	20,60	0,74	4,34
	M	5	13,80	27,00	19,74	18,60	4,03	46,00
Monozyten (%)	CD	5	9,39	11,06	10,21	10,23	0,52	11,39
	M	5	5,40	14,00	9,36	8,60	2,78	33,63
Eosinophile Granulozyten (%)	CD	5	2,97	4,48	3,76	3,81	0,49	31,47
	M	5	0,60	4,40	2,14	1,80	1,18	50,43

n = Anzahl der Blutproben, die jeweils zehnmal in Folge gemessen wurden, CD = CELL-DYN® 3500,
M = jeweilige Referenzmethode

3.3.1.2 Blutprobenlagerung

Die Auswirkungen der Probenlagerung auf die Messergebnisse der automatischen Blutanalyse sollte überprüft werden. Hierbei wurden dieselben fünf Blutproben zum einen bei Raumtemperatur und Dunkelheit und zum anderen im Kühlschrank aufbewahrt. Sie wurden am Tag der Blutentnahme sowie nach 24 h, 48 h, 72 h und einer Woche mit dem CELL-DYN® 3500 analysiert.

Die Ergebnisse sind für ausgewählte Parameter in Form von Liniendiagrammen dargestellt (s. Abb. 3.12 bis 3.35). Es wurde sowohl der WIC-Wert als auch der WOC-Wert der Leukozytenzählung einzeln aufgeführt, da überprüft werden sollte, ob sich im Laufe der Lagerung eventuell auftretende morphologische Veränderungen der Zellen unterschiedlich auf die verschiedenen Messtechniken (Laser- und Widerstandsmessmethode) auswirken würden. Für die Ergebnisse der Leukozytendifferenzierung wurde hier jeweils der vom Gerät errechnete Absolutwert der einzelnen Leukozytensubpopulation übernommen, wobei die Leukozytenzahl zum Teil von Tag zu Tag unterschiedlich mal als WIC- oder mal als WOC-Wert ausgegeben wurde.

Zusätzlich wurde, für die beiden Lagermethoden getrennt, bei beiden Tierarten überprüft, ob sich signifikante Unterschiede zum Ausgangswert nach einer bestimmten Lagerungszeit ergaben. Als Zeitpunkt wurde 48 h gewählt (s. Kap. 3.2.2.3.5). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.39 abgebildet.

Bei Kühlschranktemperatur gelagerte Blutproben zeigen bis auf die Thrombozytenzahl bei der Katze und den Hämatokrit bei beiden Tierarten keine signifikanten Veränderungen.

Bei Zimmertemperatur gelagerte Blutproben wiesen dagegen bei der optischen Leukozytenzählung, den neutrophilen Granulozyten und dem Hämatokrit beider Tierarten, sowie den Hundelymphozyten und Katzenthrombozyten signifikante Veränderung auf.

Tab. 3.39: Signifikante Veränderungen (< 0,05, fett) nach 48 h Lagerung

Parameter	Signifikanz der Veränderung nach 48 Stunden			
	Katze		Hund	
	z	k	z	k
Leukozyten WOC	0,018	0,058	0,015	0,067
Leukozyten WIC	0,251	0,648	0,593	0,858
Neutrophile Granulozyten	0,039	0,781	0,028	0,136
Lymphozyten	0,357	0,821	0,033	0,773
Monozyten	0,555	0,417	0,121	0,429
Eosinophile Granulozyten	0,177	0,242	0,862	0,874
Erythrozyten	0,161	0,194	0,156	0,379
Thrombozyten	0,006	0,026	0,305	0,275
Hämoglobin	1,000	0,099	0,326	0,270
Hämatokrit	0,000	0,005	0,000	0,003

WOC = White Cell Optical Count, WIC = White Cell Impedance Count, z = Lagerung bei Zimmertemperatur, k = Lagerung im Kühlschrank

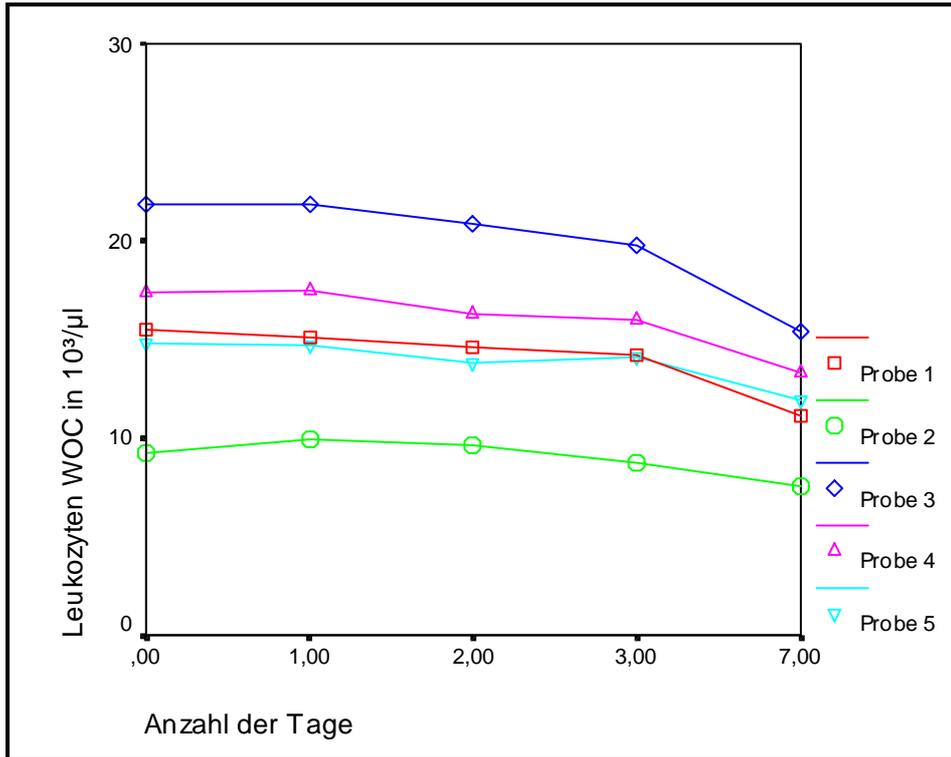


Abbildung 3.12: Blutprobenlagerung im Kühlschrank: WOC Hund
 WOC = White Cell Optical Count, optische Leukozytenzählung

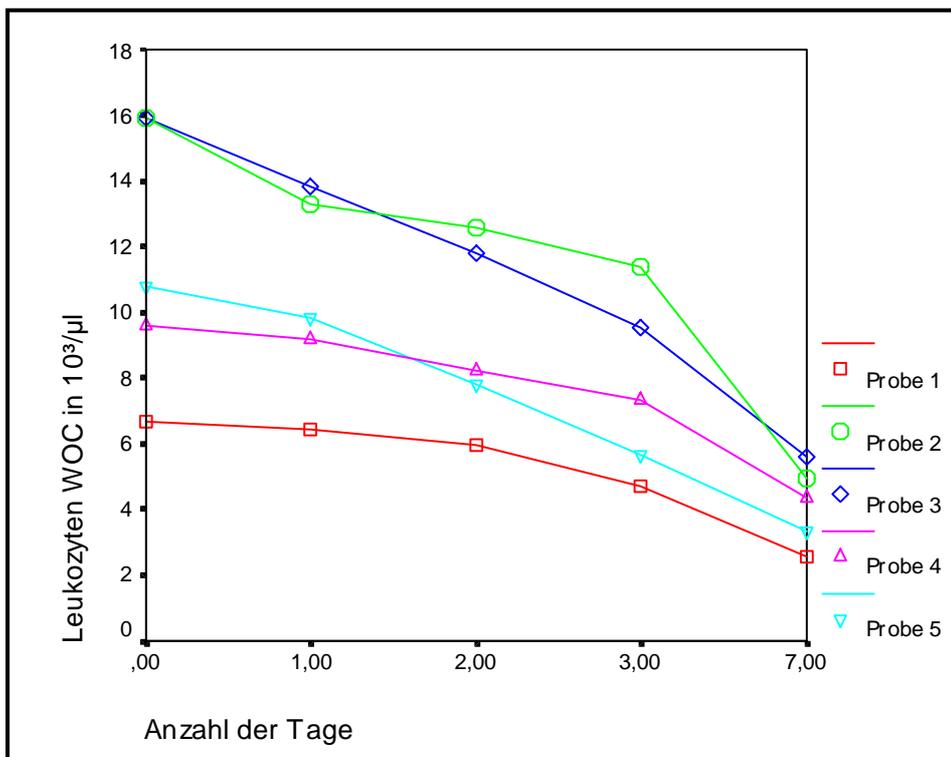


Abbildung 3.13: Blutprobenlagerung bei Raumtemperatur: WOC Hund
 WOC = White Cell Optical Count, optische Leukozytenzählung

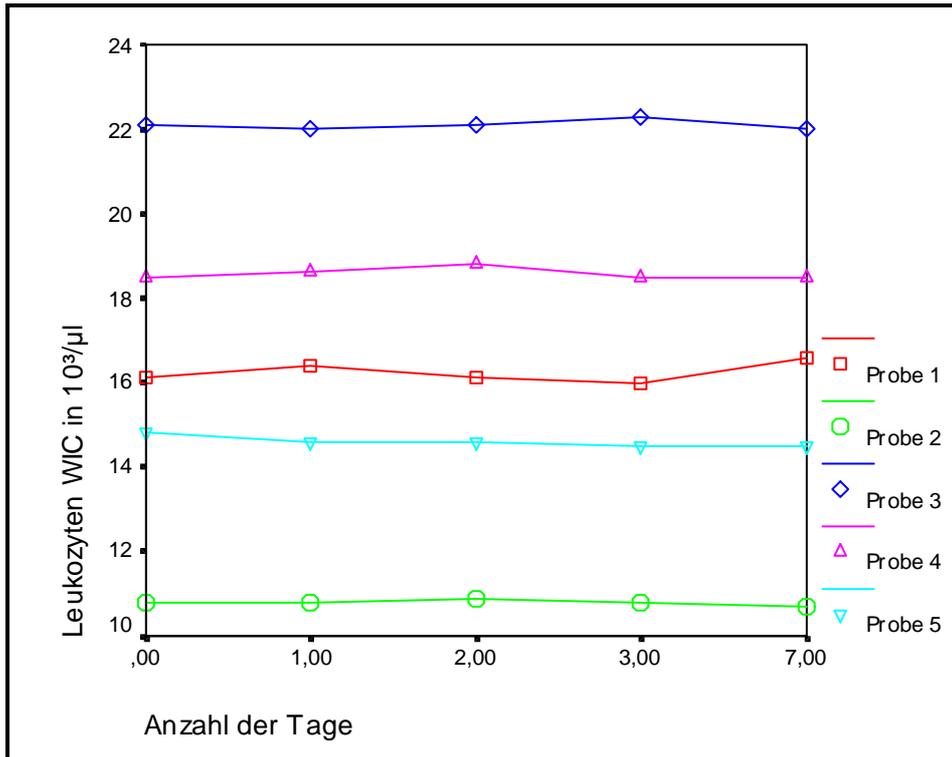


Abbildung 3.14: Blutprobenlagerung im Kühlschrank: WIC Hund
 WIC = White Cell Impedance Count, Leukozytenzählung nach der Widerstandsmessmethode

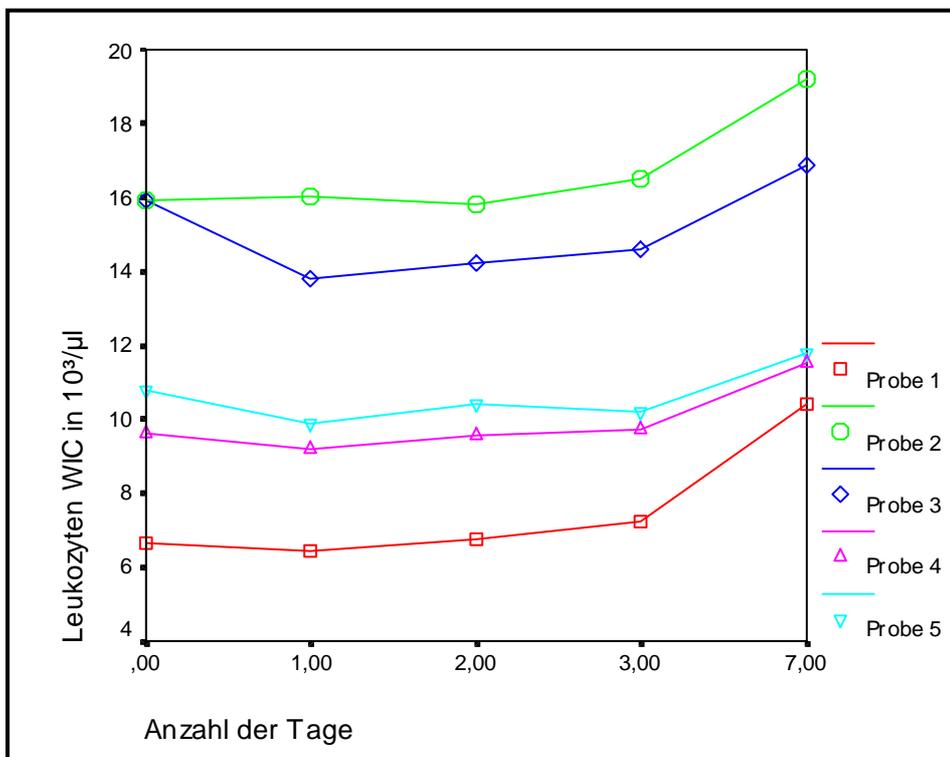


Abbildung 3.15: Blutprobenlagerung bei Raumtemperatur: WIC Hund
 WIC = White Cell Impedance Count, Leukozytenzählung nach der Widerstandsmessmethode

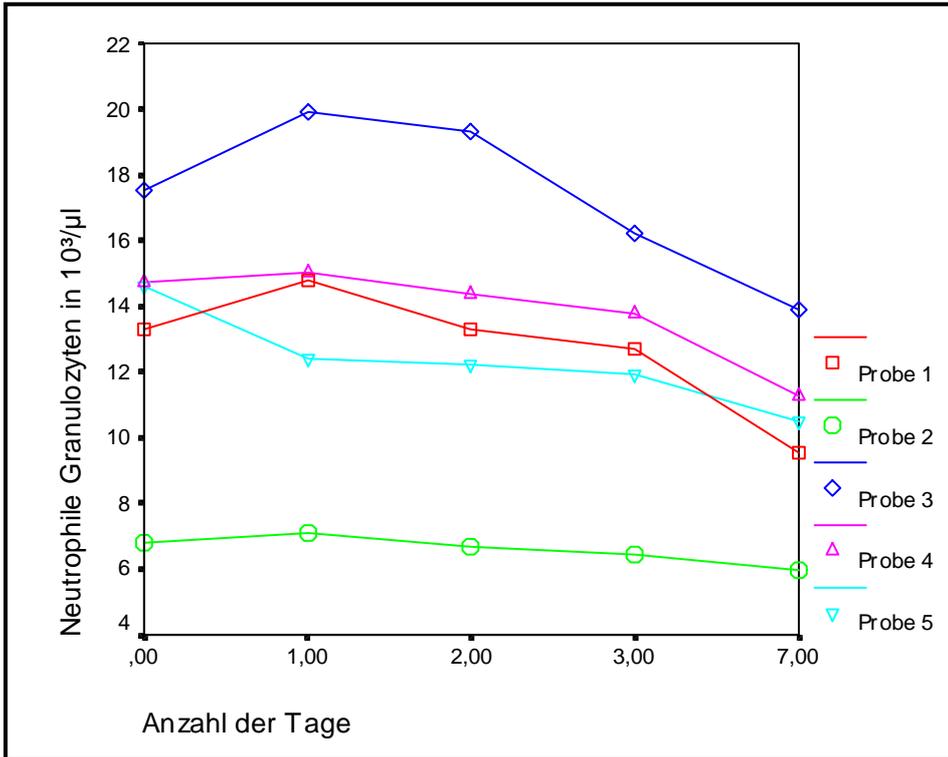


Abbildung 3.16: Blutprobenlagerung im Kühlschrank: Neutrophile Granulozyten Hund

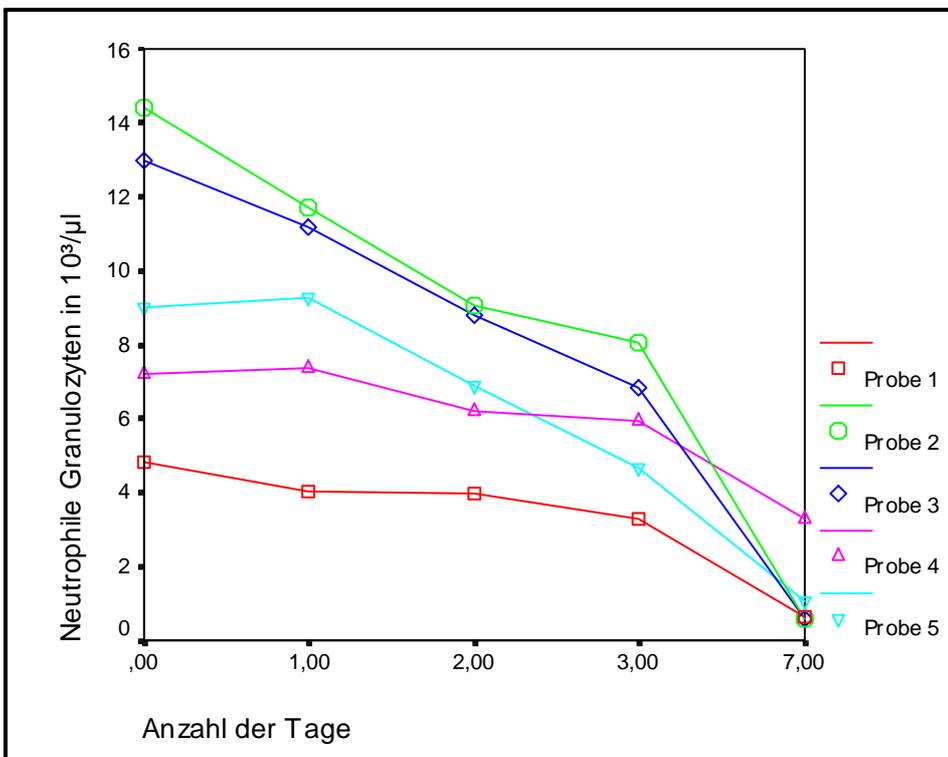


Abbildung 3.17: Blutprobenlagerung bei Raumtemperatur: Neutrophile Granulozyten Hund

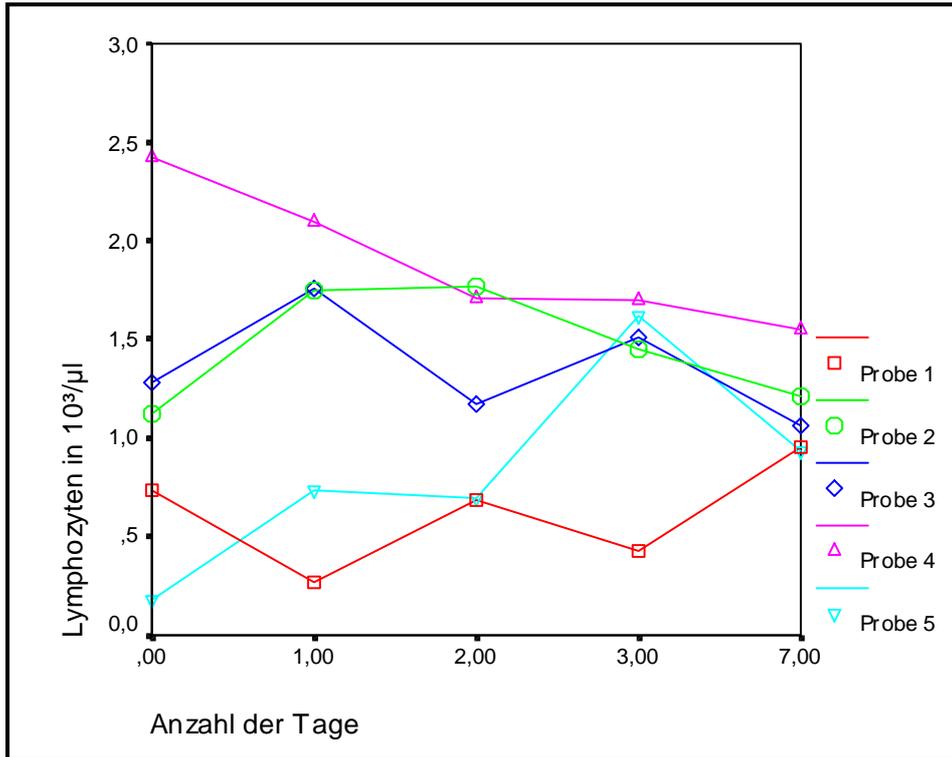


Abbildung 3.18: Blutprobenlagerung im Kühlschrank: Lymphozyten Hund

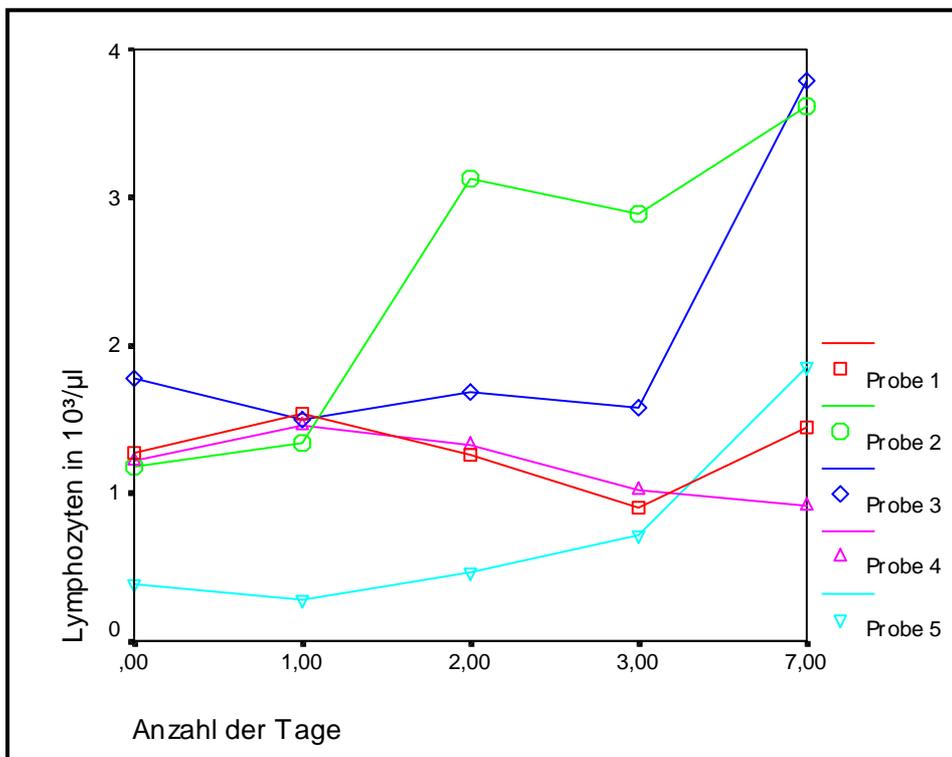


Abbildung 3.19: Blutprobenlagerung bei Raumtemperatur: Lymphozyten Hund

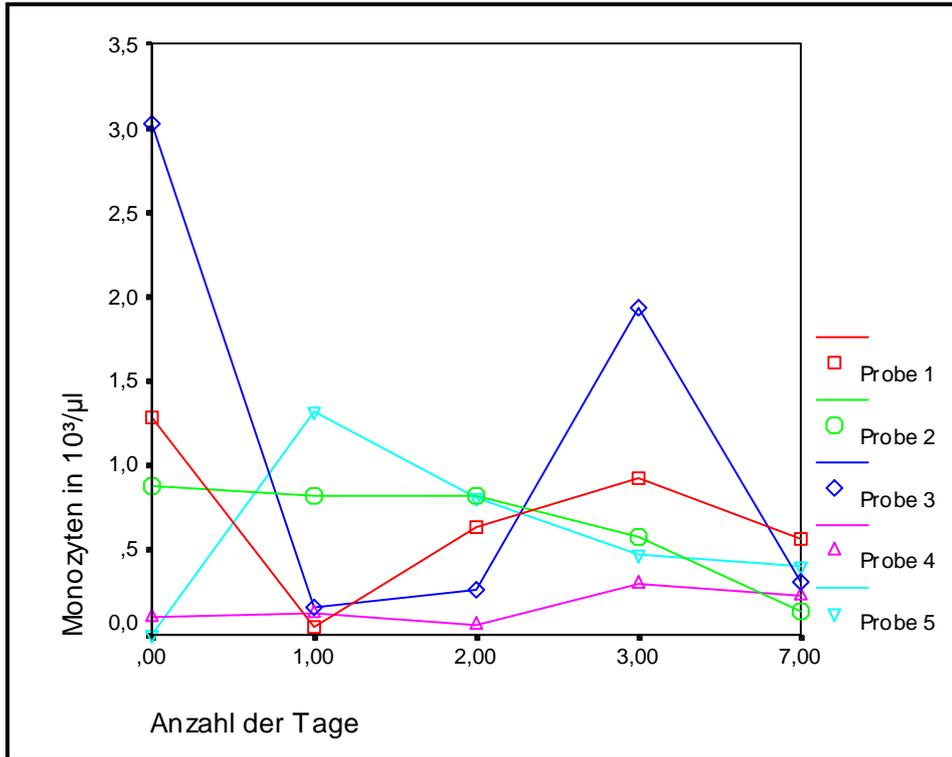


Abbildung 3.20: Blutprobenlagerung im Kühlschrank: Monozyten Hund

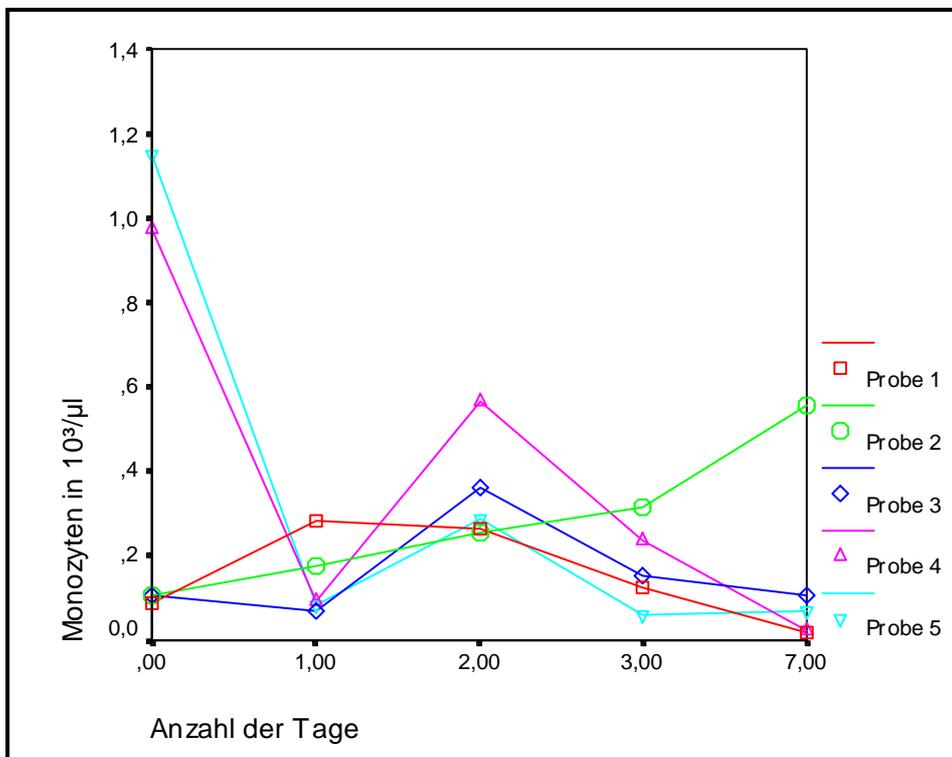


Abbildung 3.21: Blutprobenlagerung bei Raumtemperatur: Monozyten Hund

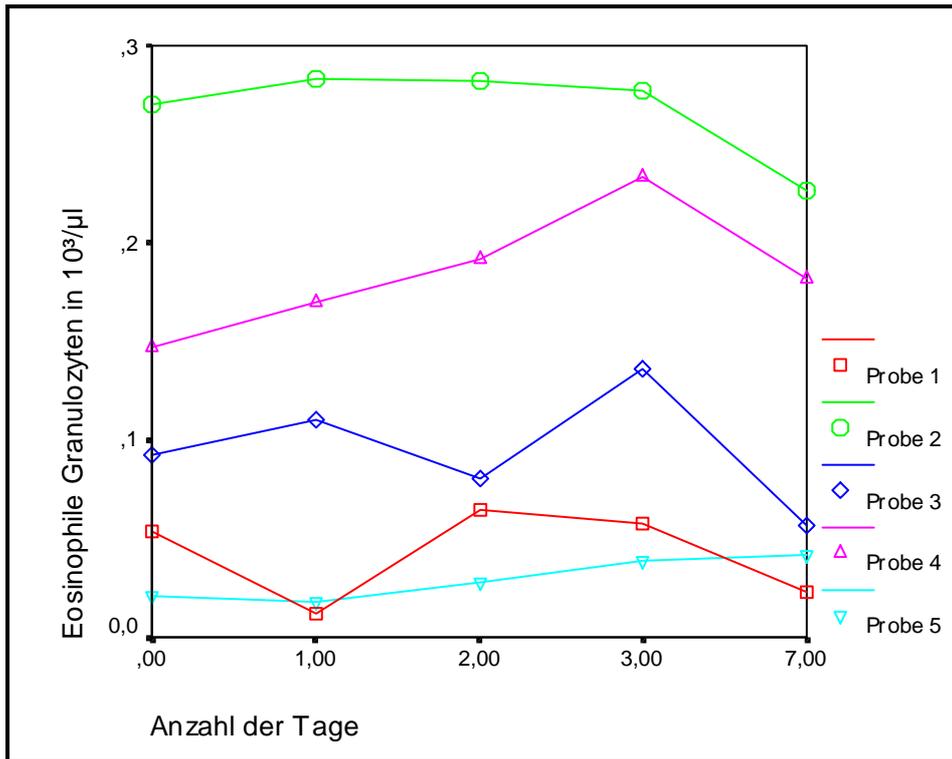


Abbildung 3.22: Blutprobenlagerung im Kühlschrank: Eosinophile Granulozyten Hund

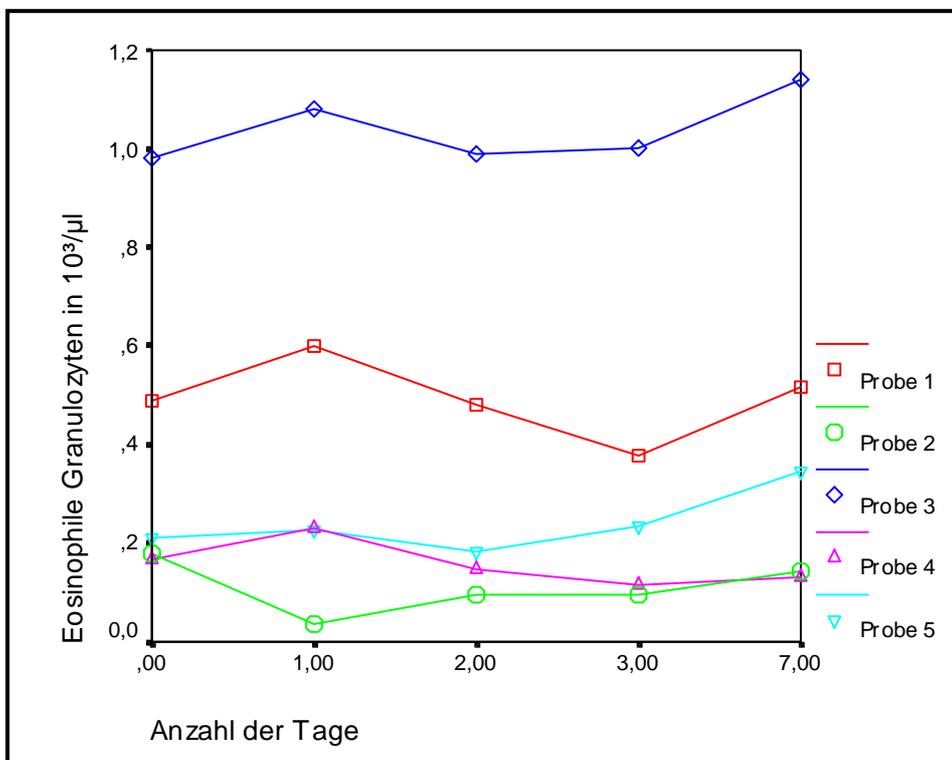


Abbildung 3.23: Blutprobenlagerung bei Raumtemperatur: Eosinophile Granulozyten Hund

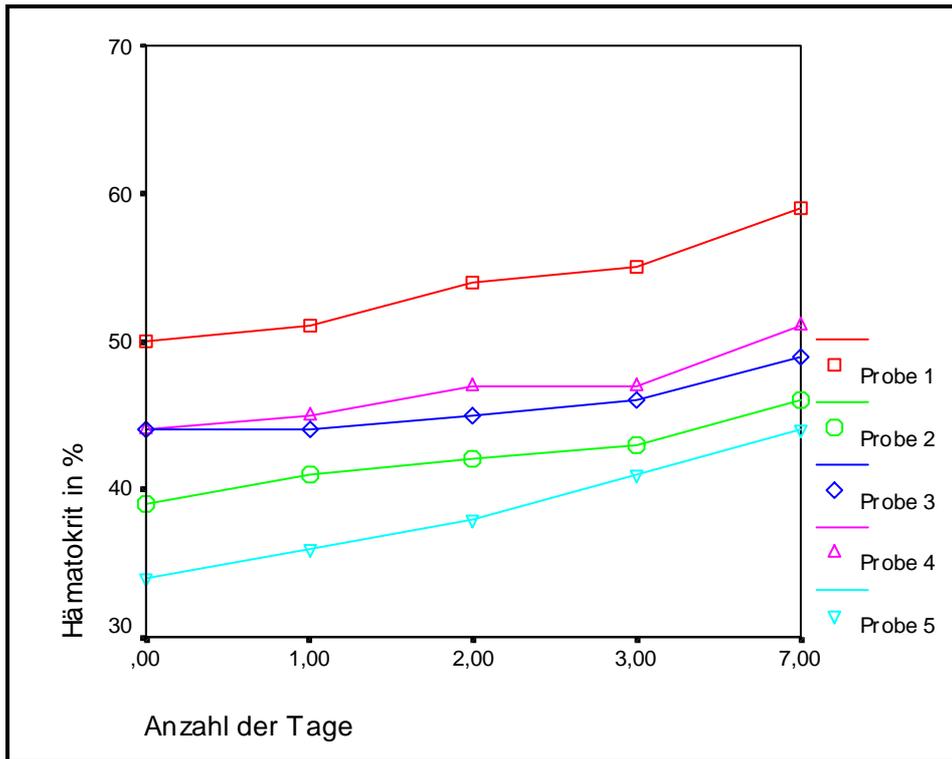


Abbildung 3.24: Blutprobenlagerung im Kühlschrank: Hämatokrit Hund

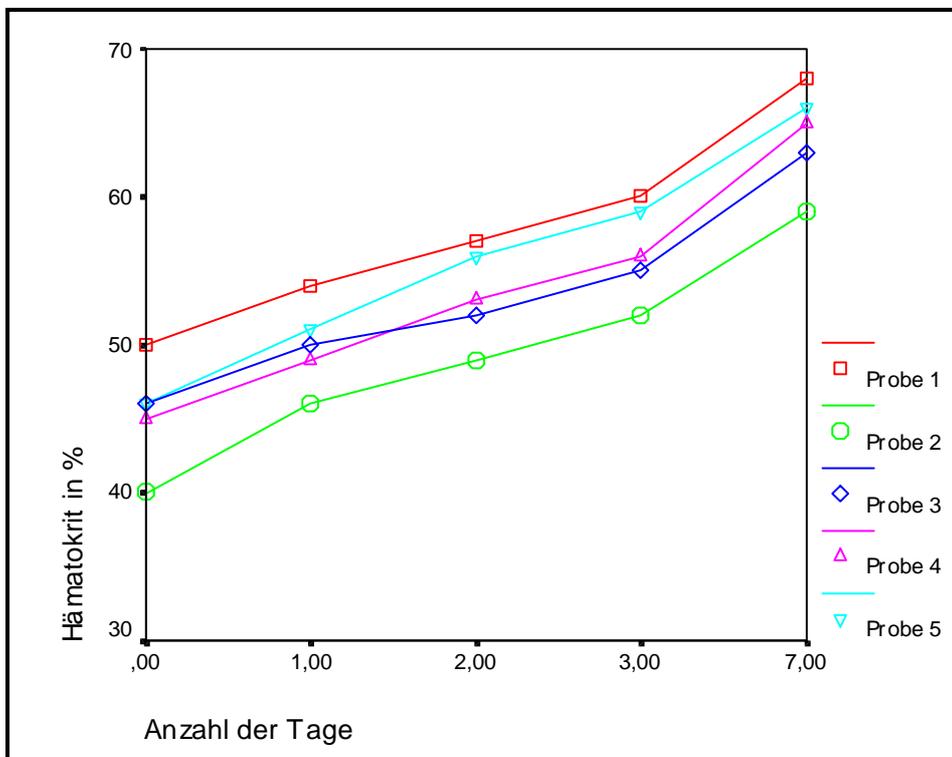


Abbildung 3.25: Blutprobenlagerung bei Raumtemperatur: Hämatokrit Hund

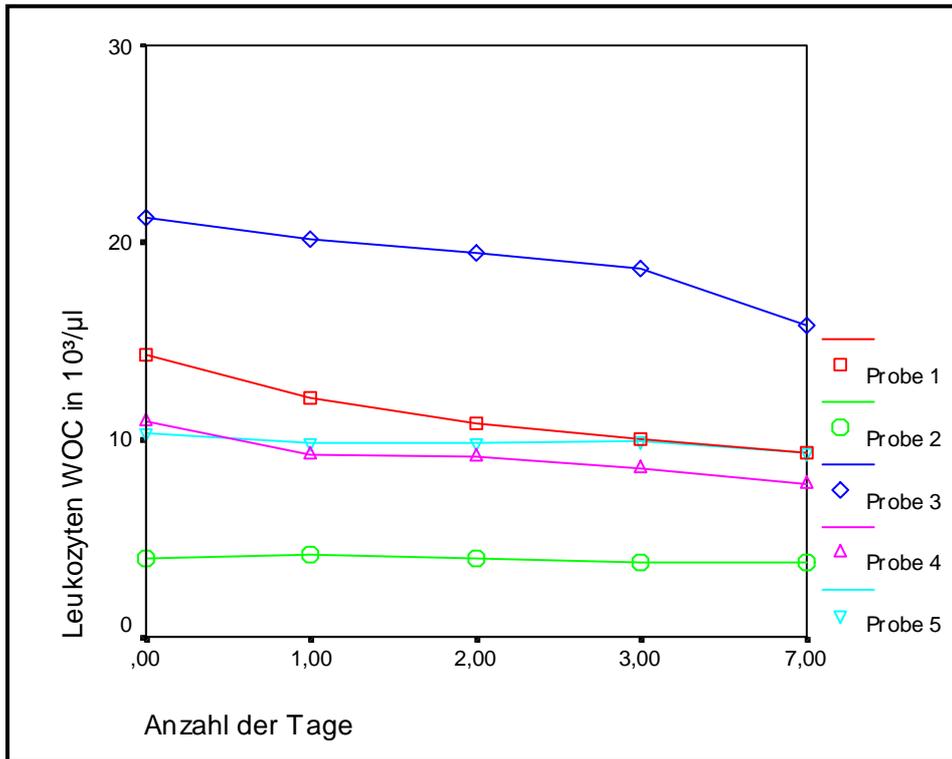


Abbildung 3.26: Blutprobenlagerung im Kühlschrank: WOC Katze
 WOC = White Cell Optical Count, optische Leukozytenzählung

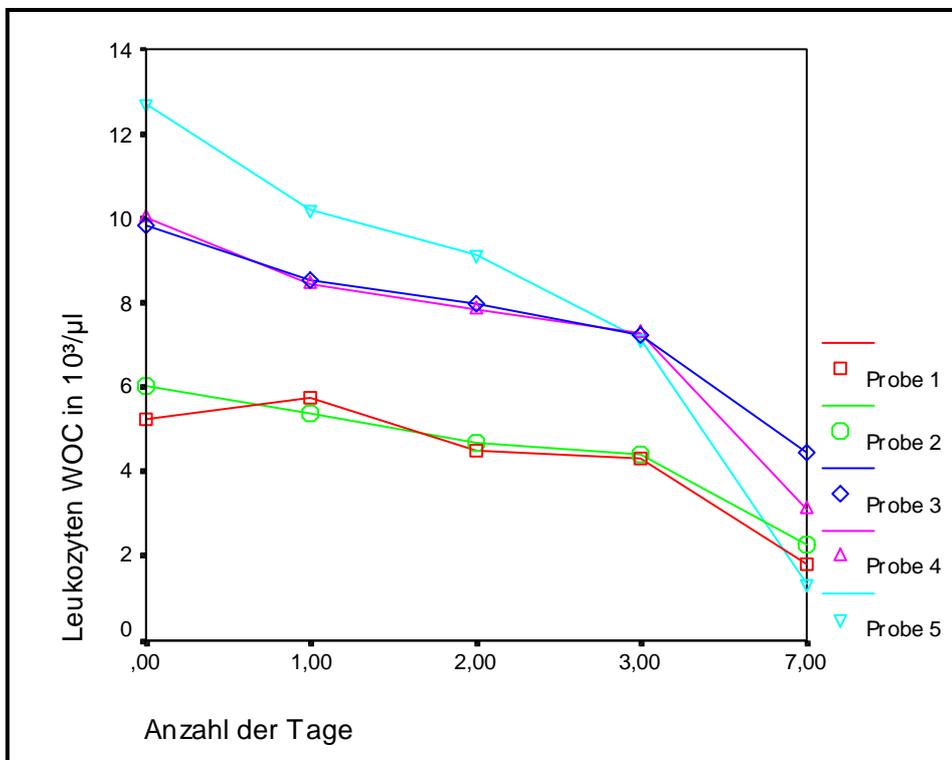


Abbildung 3.27: Blutprobenlagerung bei Raumtemperatur: WOC Katze
 WOC = White Cell Optical Count, optische Leukozytenzählung

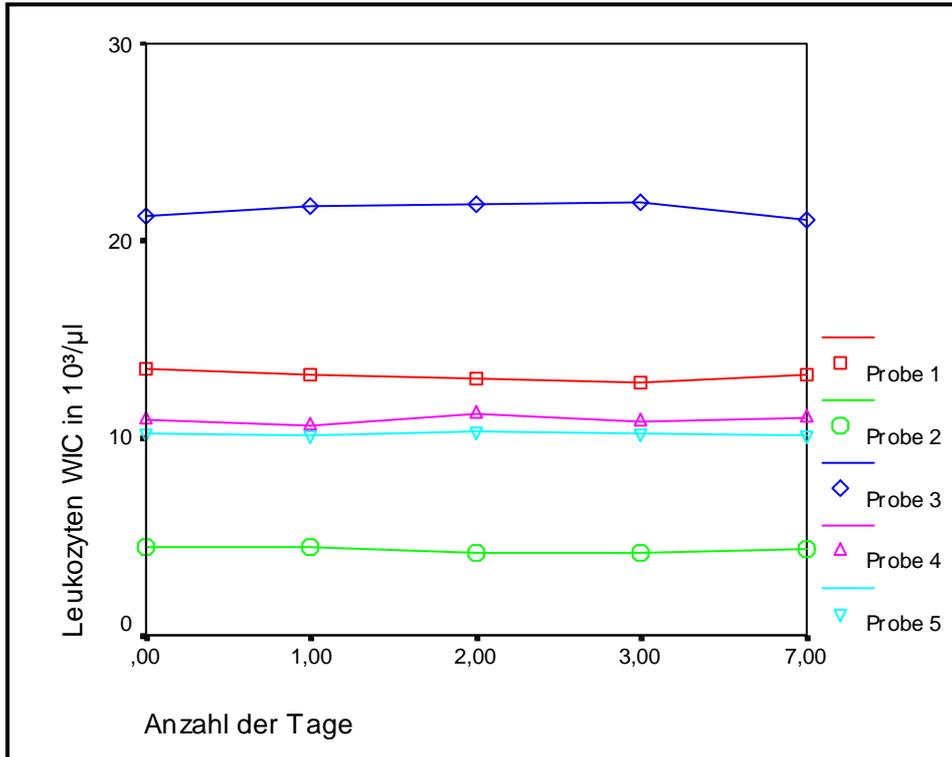


Abbildung 3.28: Blutprobenlagerung im Kühlschrank: WIC Katze
 WIC = White Cell Impedance Count, Leukozytenzählung nach der Widerstandsmessmethode

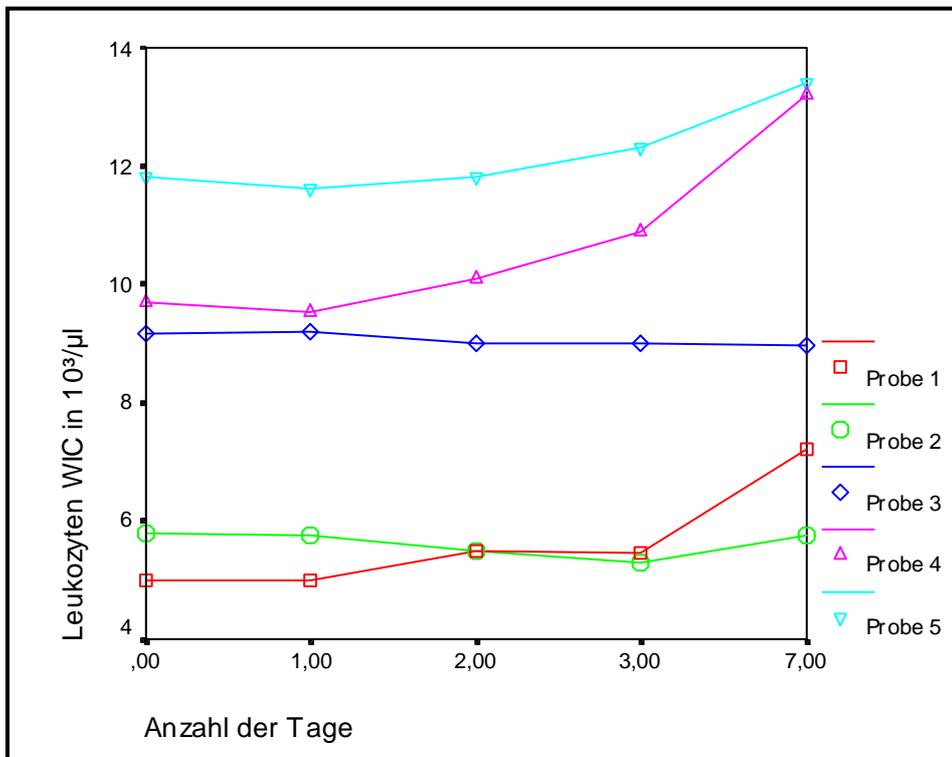


Abbildung 3.29: Blutprobenlagerung bei Raumtemperatur: WIC Katze
 WIC = White Cell Impedance Count, Leukozytenzählung nach der Widerstandsmessmethode

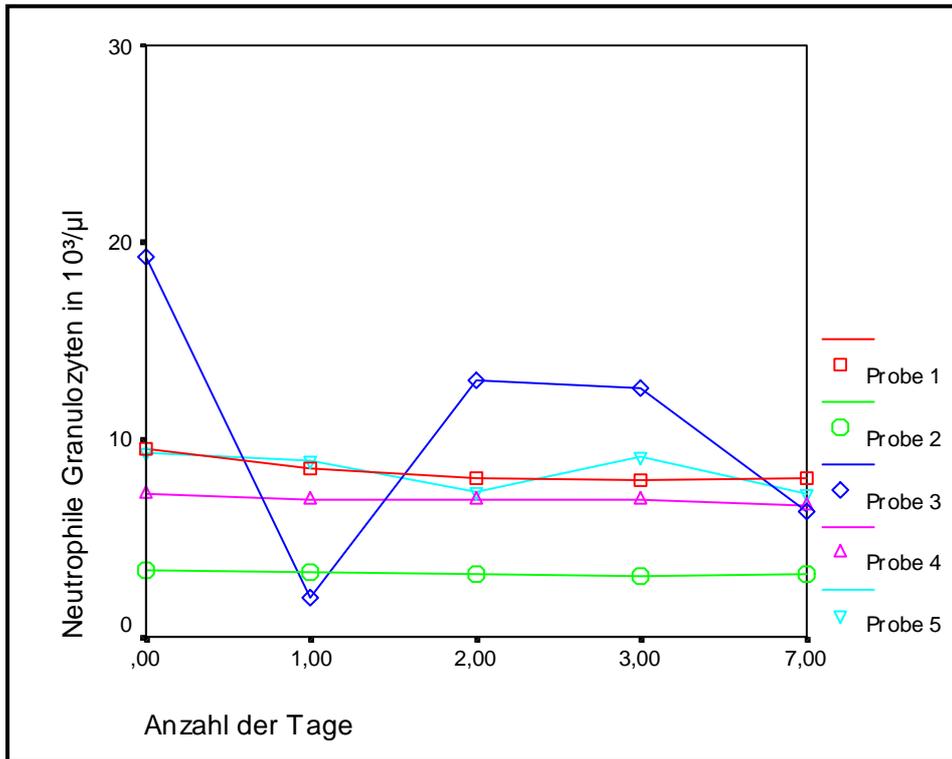


Abbildung 3.30: Blutprobenlagerung im Kühlschrank: Neutrophile Granulozyten Katze

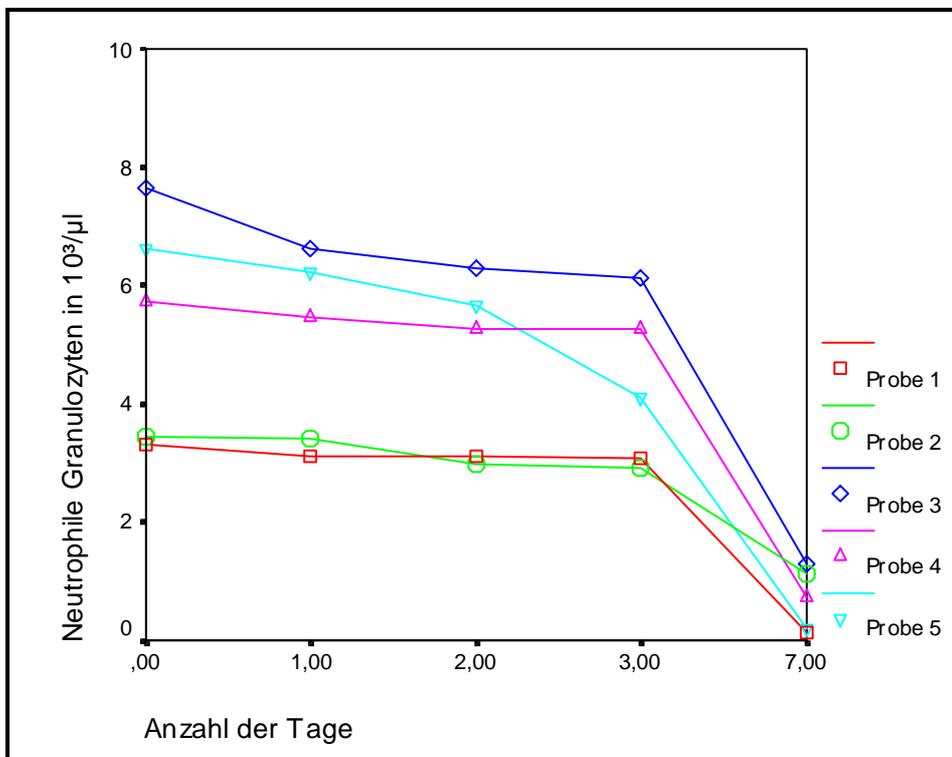


Abbildung 3.31: Blutprobenlagerung bei Raumtemperatur: Neutrophile Granulozyten Katze

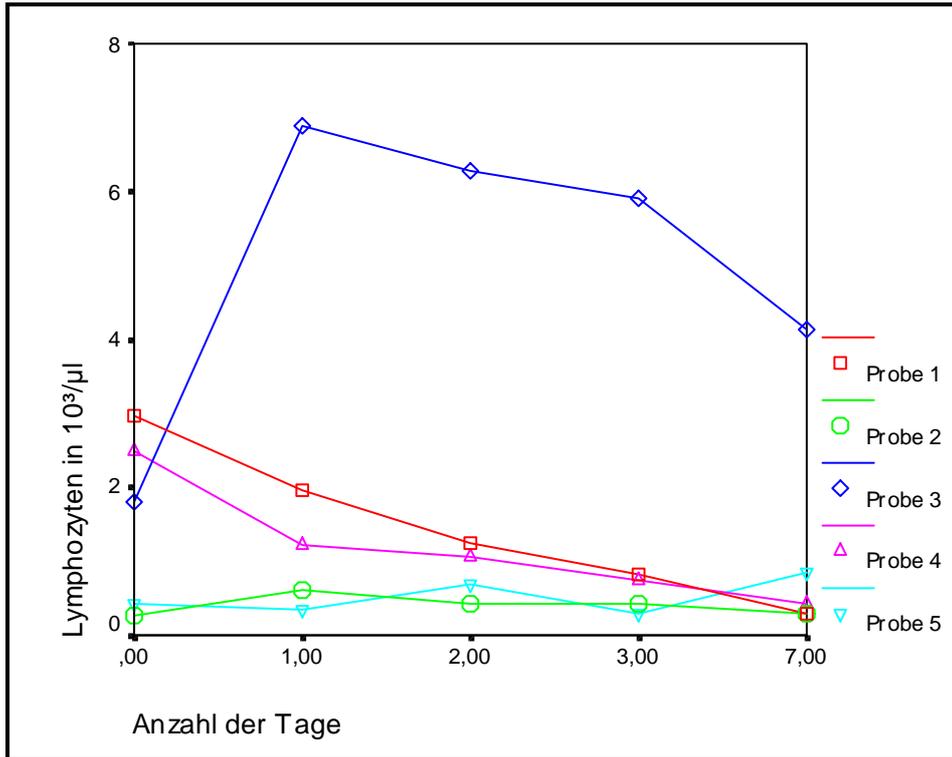


Abbildung 3.32: Blutprobenlagerung im Kühlschrank: Lymphozyten Katze

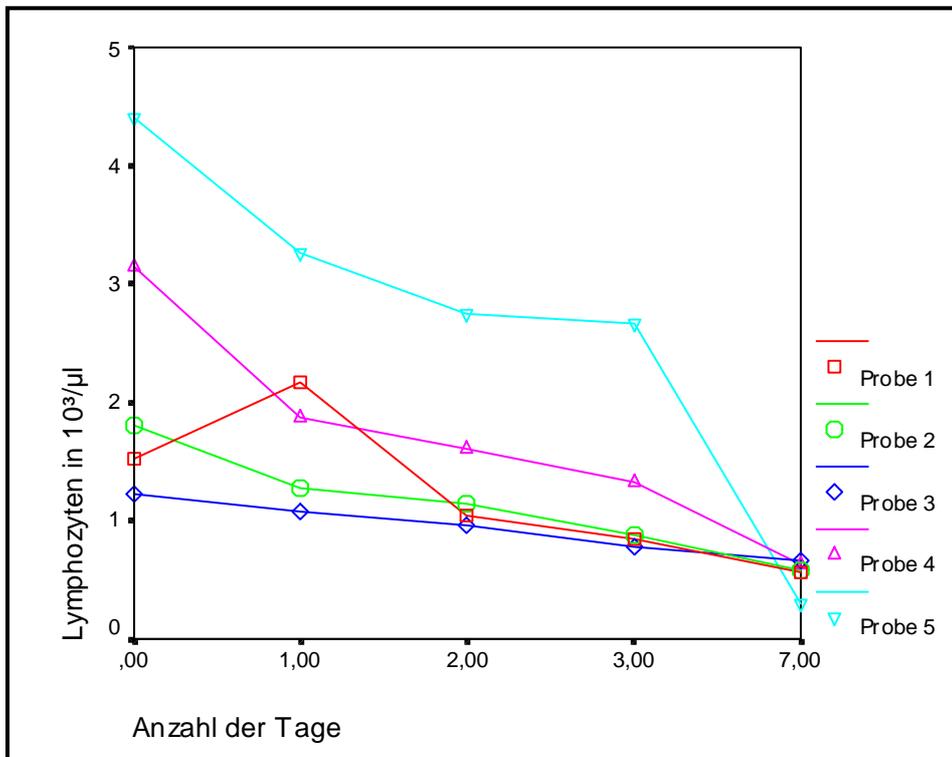


Abbildung 3.33: Blutprobenlagerung bei Raumtemperatur: Lymphozyten Katze

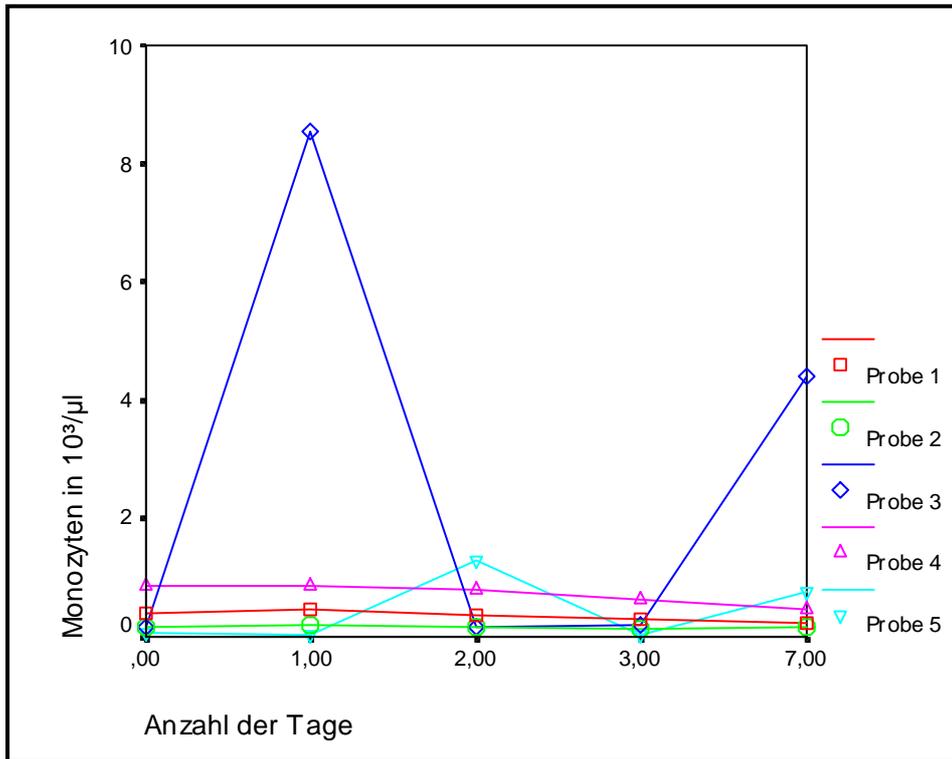


Abbildung 3.34: Blutprobenlagerung im Kühlschrank: Monozyten Katze

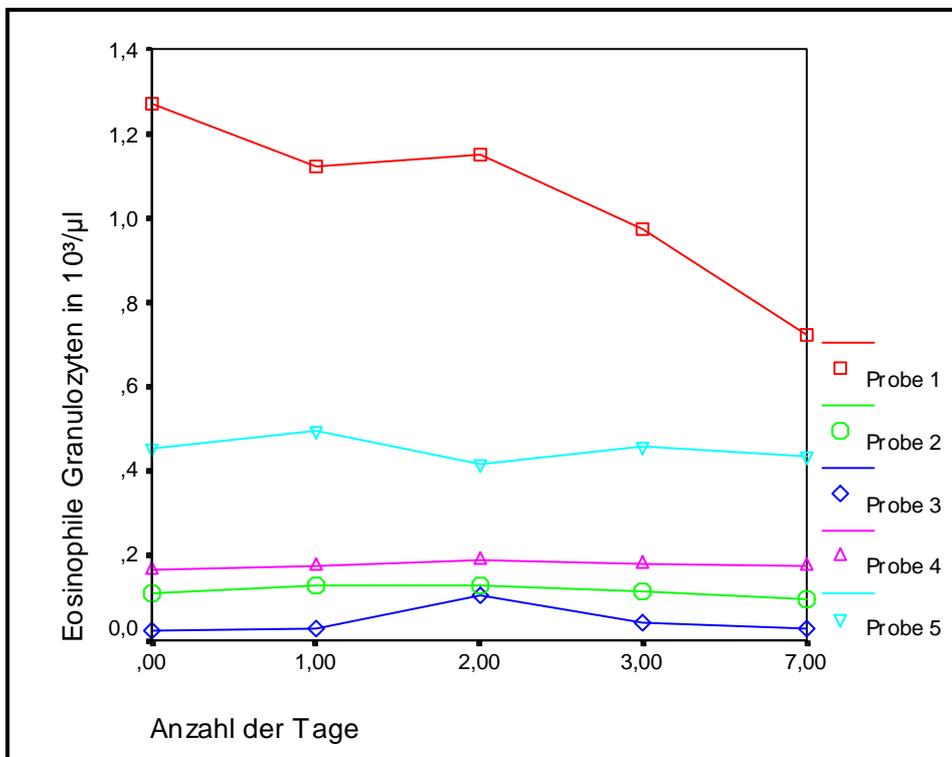


Abbildung 3.35: Blutprobenlagerung im Kühlschrank: Eosinophile Granulozyten Katze

3.3.2 Methodenvergleich

Die Messdaten des CELL-DYN[®] 3500 und der für die jeweiligen Parameter herangezogenen Referenzmethoden wurden mittels linearer Regressionsanalyse verglichen. Die Anzahl der zugrunde liegenden Wertepaare betrug mindestens 100 pro überprüfem Parameter.

Der Berechnung der absoluten Zahlen der Leukozytensubpopulationen lag immer die im CELL-DYN[®] 3500 gemessene Gesamtleukozytenzahl zugrunde. Auf eine zusätzliche manuelle Leukozytenzählung musste aus Mangel an Probenmaterial verzichtet werden.

Für sämtliche Parameter beider Tierarten wurden die Ergebnisse der Regressionsanalyse, zusammen mit den Regressionsgraden und den zugehörigen Korrelationskoeffizienten, in Streudiagrammen (Abb. 3.36a bis 3.53a) dargestellt.

Die Bestimmung der absoluten Differenzen der zu vergleichenden Messmethoden erfolgte für jede Tierart und für jeden Parameter. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse dienen Punktwolkendiagramme nach BLAND und ALTMAN (Abb. 3.36b bis 3.53b). Dabei wurde die Differenz der Wertepaare gegen ihren Mittelwert aufgetragen. Von den Differenzen der Wertepaare erfolgte wiederum die Berechnung des Mittelwertes (mean) und der Standardabweichung. Der Mittelwert der Differenzen (mean) ermöglicht dem Beobachter festzustellen, um wie viel der CELL-DYN[®] 3500 im Durchschnitt höher oder niedriger misst als die Referenzmethode und in welchem absoluten Wertebereich dies der Fall ist. Die Standardabweichung gibt die durchschnittliche Streuung um diesen Mittelwert (mean) an.

Die Daten der Regressionsanalyse, die Korrelationskoeffizienten sowie die mittlere Differenz (mean) und die Standardabweichung der absoluten Differenzen sind in den Tabellen 3.40 bis 3.43 nach Tierarten getrennt aufgelistet.

Tab. 3.40:

Methodenvergleich für Zellzahlen, Hämatokrit und Hämoglobin (Hund)

n = Anzahl der Wertepaare CD = CELL-DYN® 3500 M = manuelle Referenzmethode
 r = Korrelationskoeffizient a, b = Steigung bzw. Y-Achsenabstand der Regressionsgeraden
 SD = Standardabweichung der mittleren Differenzen

Parameter	n	Mittelwerte		Minimum/Maximum		Regressionsgerade		r	Mittlere Differenz (mean)	SD
		Methoden		Methoden		y = ax + b				
		CD	M	CD	M	a	b			
Leukozyten in 10 ³ /µl	104	12,17	11,77	0,28-50,40	0,35-49,10	1,030	0,040	0,988	0,390	1,290
Erythrozyten in 10 ⁶ /µl	104	6,67	6,45	2,20-11,30	2,07-11,09	0,897	0,880	0,927	0,220	0,610
Thrombozyten in 10 ³ /µl	104	310,97	307,99	0,06-1259,00	27,00-1210,00	0,977	10,186	0,949	2,980	55,050
Hämoglobin in g/dl	104	15,98	14,33	5,79-23,70	5,00-20,03	1,081	0,483	0,971	1,650	0,880
Hämatokrit in %	104	45,09	45,11	17,00-67,00	18,00-69,00	1,021	-0,964	0,979	-0,020	1,980

Tab. 3.41:

Methodenvergleich für das Differentialblutbild (Hund)

n = Anzahl der Wertepaare CD = CELL-DYN® 3500 M = manuelle Referenzmethode
 r = Korrelationskoeffizient a, b = Steigung bzw. Y-Achsenabstand der Regressionsgeraden
 SD = Standardabweichung der mittleren Differenzen

Parameter (pro µl)	n	Mittelwerte		Minimum/Maximum		Regressionsgerade		r	Mittlere Differenz (mean)	SD
		Methoden		Methoden		y = ax + b				
		CD	M	CD	M	a	b			
Neutrophile Granulozyten	200	9962,65	10078,29	337,40-41931,60	345,60-40837,00	1,035	-470,984	0,974	-115,640	1501,410
Lymphozyten	200	1301,31	1406,01	63,42-5016,00	0,00-10179,00	0,454	662,546	0,701	-104,690	836,470
Monozyten	200	596,15	531,01	15,16-12015,60	0,00-5542,00	0,468	347,716	0,268	65,140	1066,230
Eosinophile Granulozyten	200	351,21	241,91	0,00-2357,50	0,00-2185,00	1,147	73,754	0,835	109,300	230,510

Tab. 3.42:

Methodenvergleich für Zellzahlen, Hämatokrit und Hämoglobin (Katze)

n = Anzahl der Wertepaare CD = CELL-DYN® 3500 M = manuelle Referenzmethode
 r = Korrelationskoeffizient a, b = Steigung bzw. Y-Achsenabstand der Regressionsgeraden
 SD = Standardabweichung der mittleren Differenzen

Parameter	n	Mittelwerte		Minimum/Maximum		Regressionsgerade		r	Mittlere Differenz (mean)	SD
		Methoden		Methoden		y = ax + b				
		CD	M	CD	M	a	b			
Leukozyten in 10 ³ /µl	100	13,31	13,23	2,23-63,00	2,35-63,00	0,982	0,323	0,977	0,080	2,040
Erythrozyten in 10 ⁶ /µl	100	8,13	8,04	1,83-13,40	1,16-12,90	0,886	1,007	0,960	0,090	0,650
Thrombozyten in 10 ³ /µl	100	242,58	386,00	29,70-723,00	18,00-790,00	0,619	3,558	0,598	-143,420	152,870
Hämoglobin in g/dl	100	12,25	11,49	3,91-17,80	4,12-18,27	1,062	0,042	0,957	0,760	0,860
Hämatokrit in %	100	35,39	35,81	11,00-51,00	9,00-52,00	0,956	1,160	0,969	-0,420	2,150

Tab. 3.43:

Methodenvergleich für das Differentialblutbild (Katze)

n = Anzahl der Wertepaare CD = CELL-DYN® 3500 M = manuelle Referenzmethode
 r = Korrelationskoeffizient a, b = Steigung bzw. Y-Achsenabstand der Regressionsgeraden
 SD = Standardabweichung der mittleren Differenzen

Parameter (pro µl)	n	Mittelwerte		Minimum/Maximum		Regressionsgerade		r	Mittlere Differenz (mean)	SD
		Methoden		Methoden		y = ax + b				
		CD	M	CD	M	a	b			
Neutrophile Granulozyten	200	10492,61	11259,77	599,00-87889,40	817,20-89664,00	0,994	-695,747	0,984	-767,160	1680,780
Lymphozyten	200	2682,04	2458,40	54,00-22800,00	0,00-25896,00	0,967	304,245	0,891	223,640	1393,230
Monozyten	200	683,61	366,02	9,29-6470,00	0,00-3744,00	0,790	394,281	0,478	317,600	671,970
Eosinophile Granulozyten	200	555,66	449,72	3,00-6880,00	0,00-7425,00	0,909	146,800	0,928	105,940	292,400

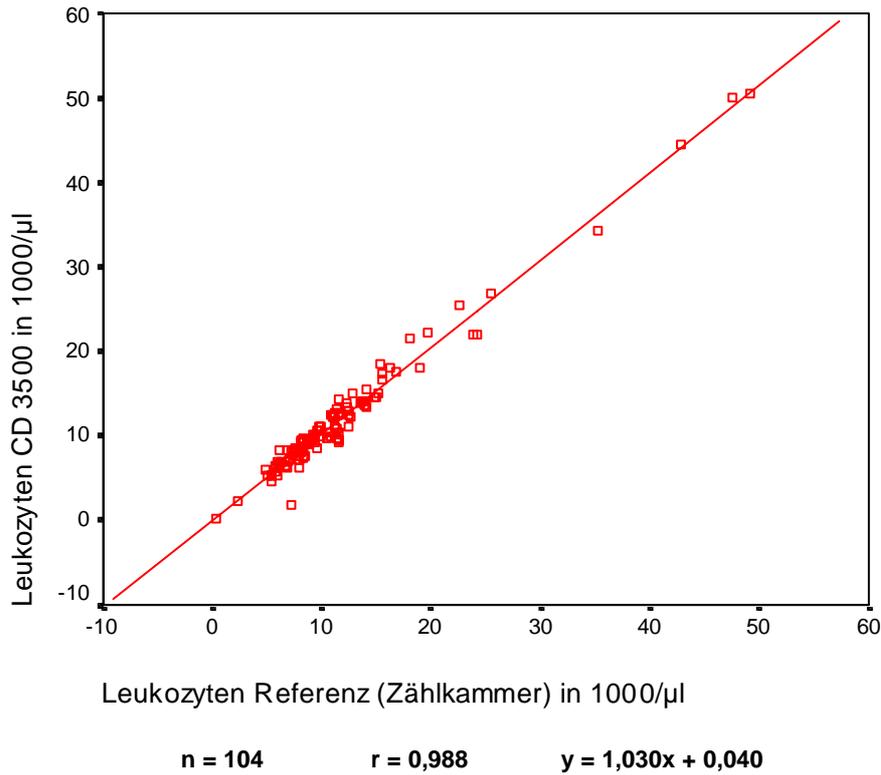


Abbildung 3.36a: Leukozyten-Bestimmung beim Hund, Regressionsanalyse von CELL-DYN® 3500 (CD) und Zählkammer

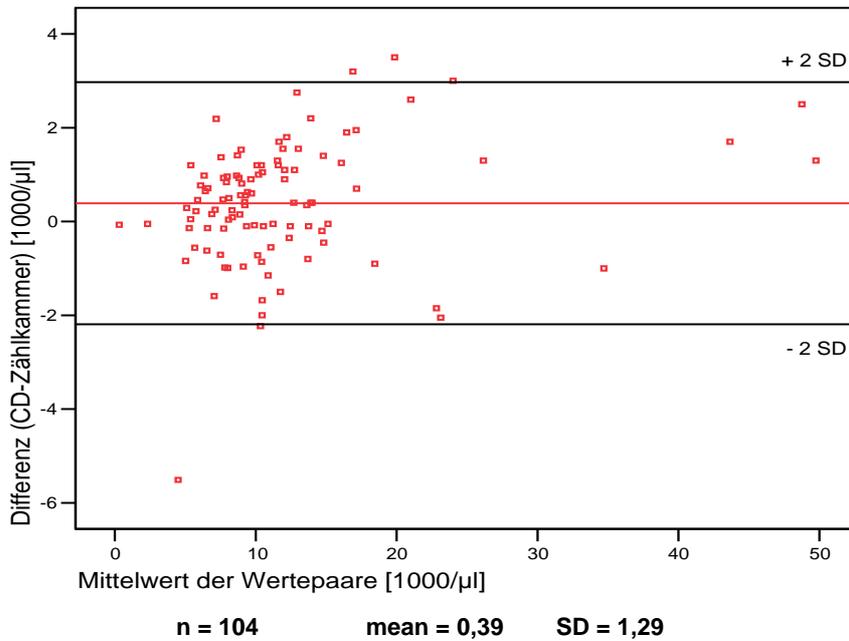


Abbildung 3.36b: Leukozyten-Bestimmung beim Hund, absolute Differenzen von CELL-DYN® 3500 (CD) und Zählkammer

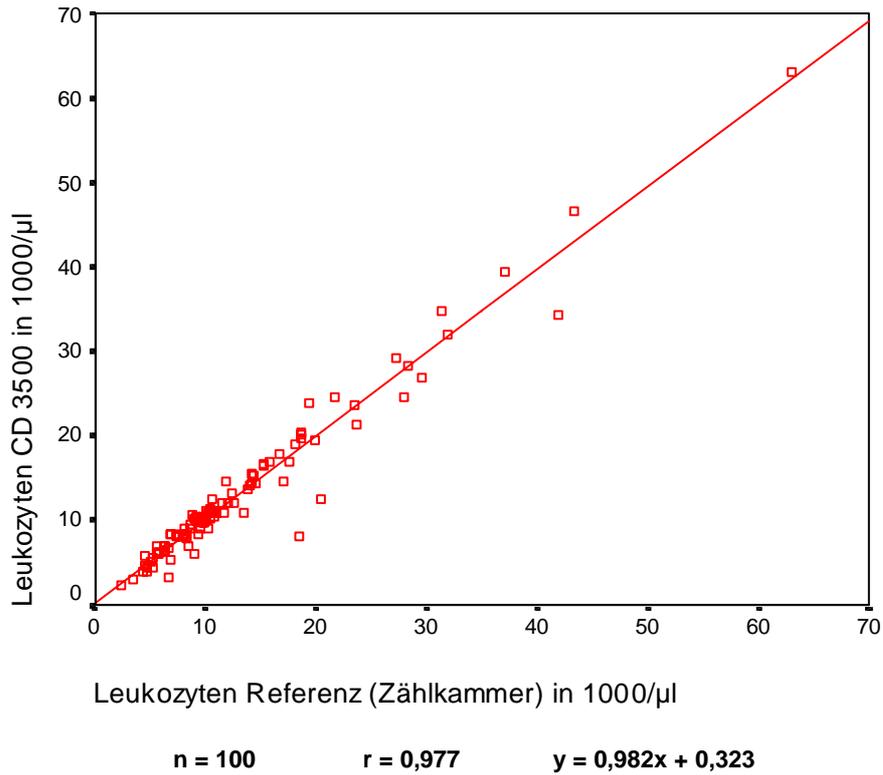


Abbildung 3.37a: Leukozyten-Bestimmung bei der Katze, Regressionsanalyse von CELL-DYN® 3500 (CD) und Zählkammer

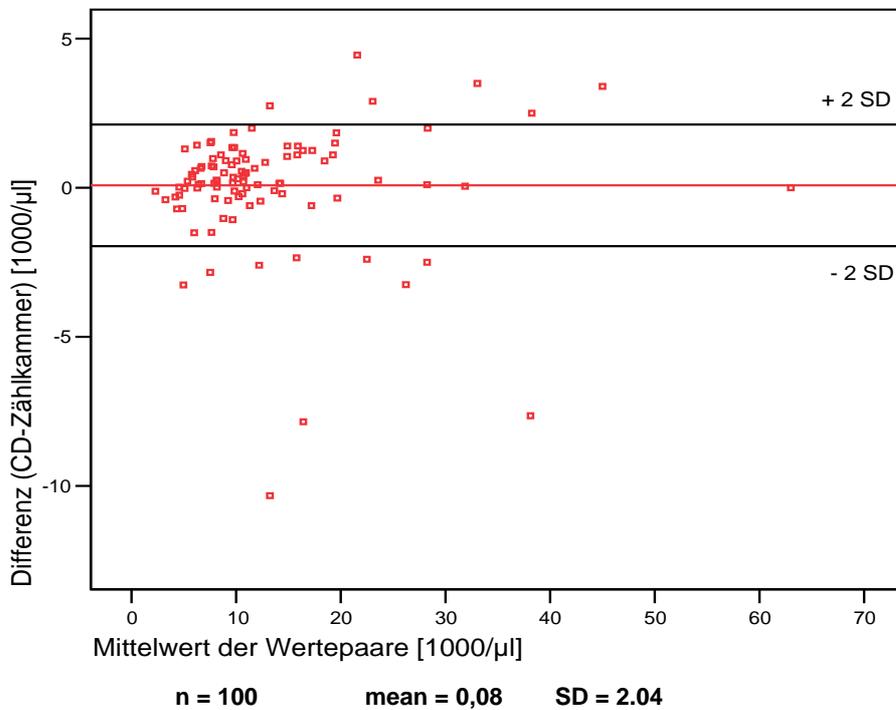


Abbildung 3.37b: Leukozyten-Bestimmung bei der Katze, absolute Differenzen von CELL-DYN® 3500 (CD) und Zählkammer

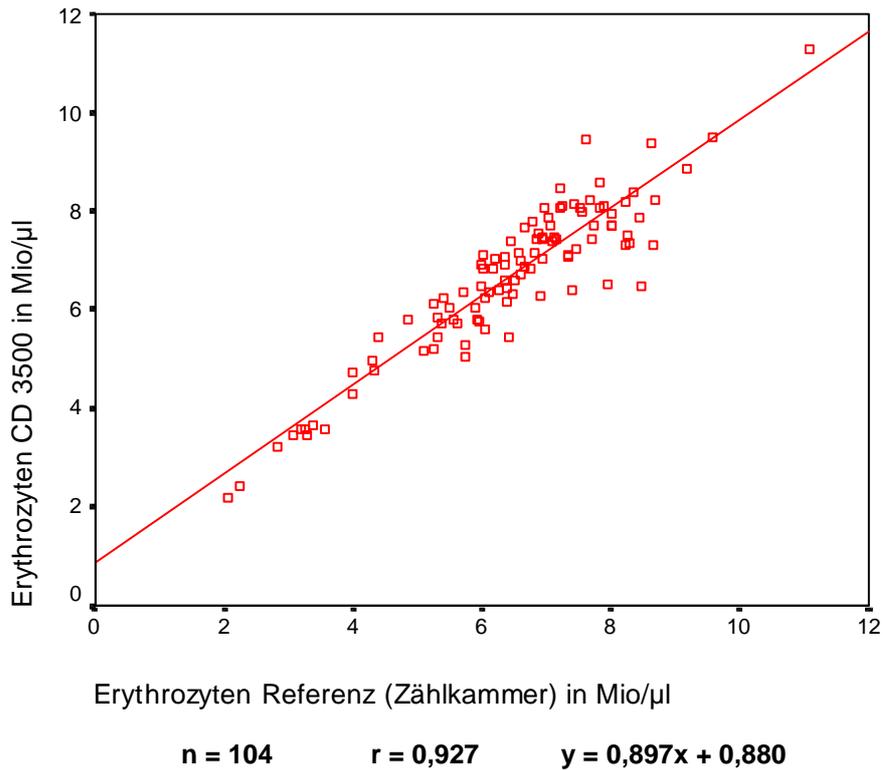


Abbildung 3.38a: Erythrozyten-Bestimmung beim Hund, Regressionsanalyse von CELL-DYN[®] 3500 (CD) und Zählkammer
Mio = Millionen

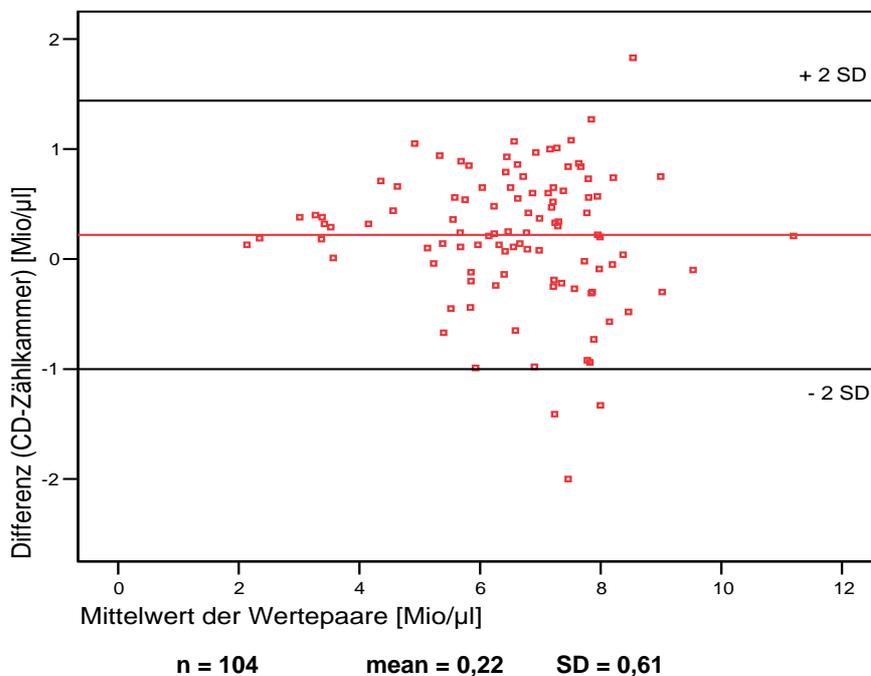


Abbildung 3.38b: Erythrozyten-Bestimmung beim Hund, absolute Differenzen von CELL-DYN[®] 3500 (CD) und Zählkammer
Mio = Millionen

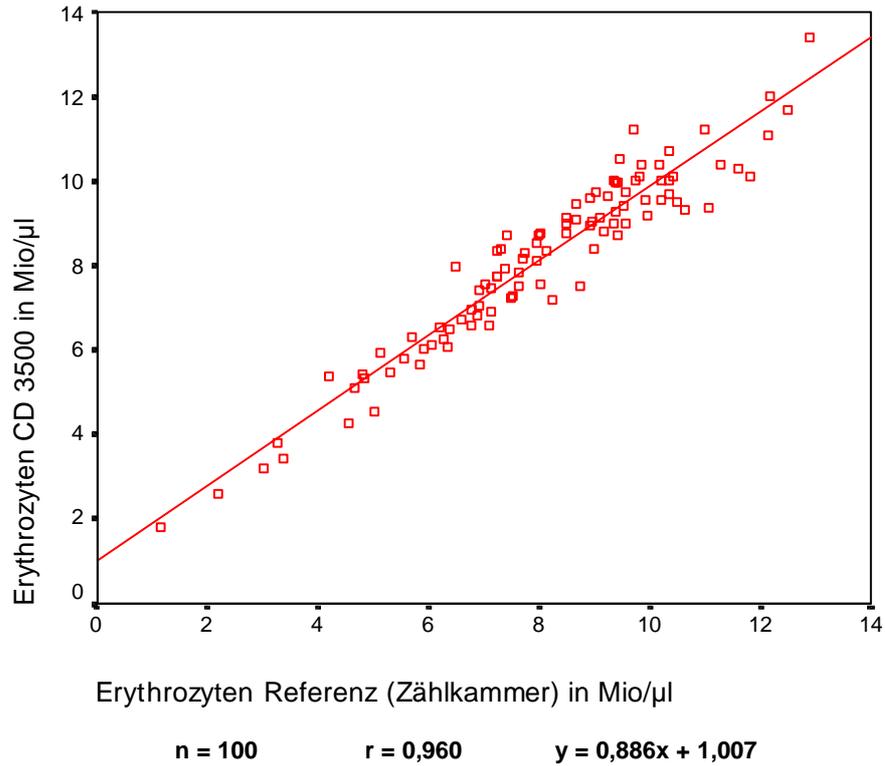


Abbildung 3.39a: Erythrozyten-Bestimmung bei der Katze, Regressionsanalyse von CELL-DYN[®] 3500 (CD) und Zählkammer
Mio = Millionen

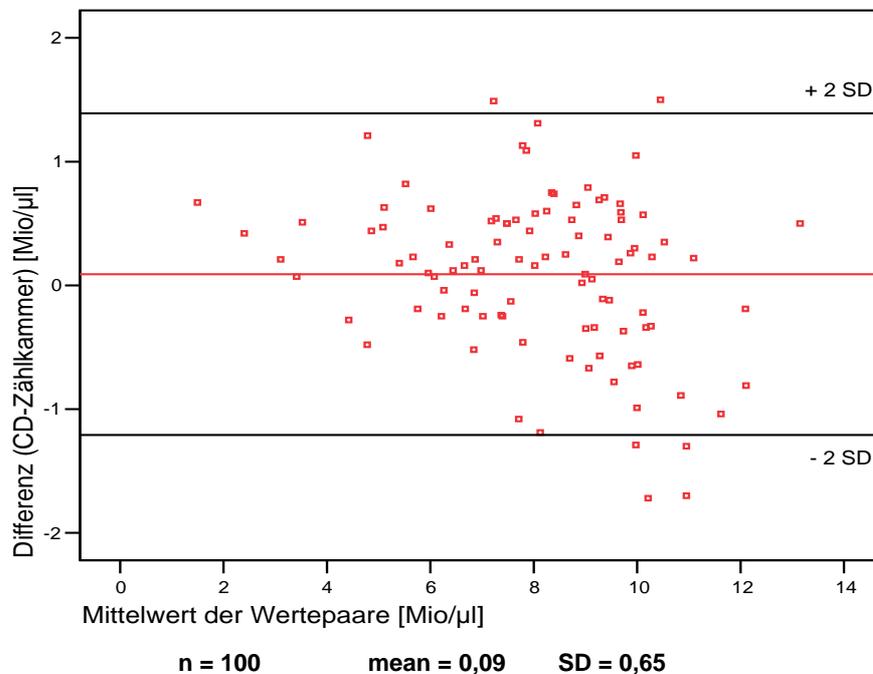


Abbildung 3.39b: Erythrozyten-Bestimmung bei der Katze, absolute Differenzen von CELL-DYN[®] 3500 (CD) und Zählkammer
Mio = Millionen

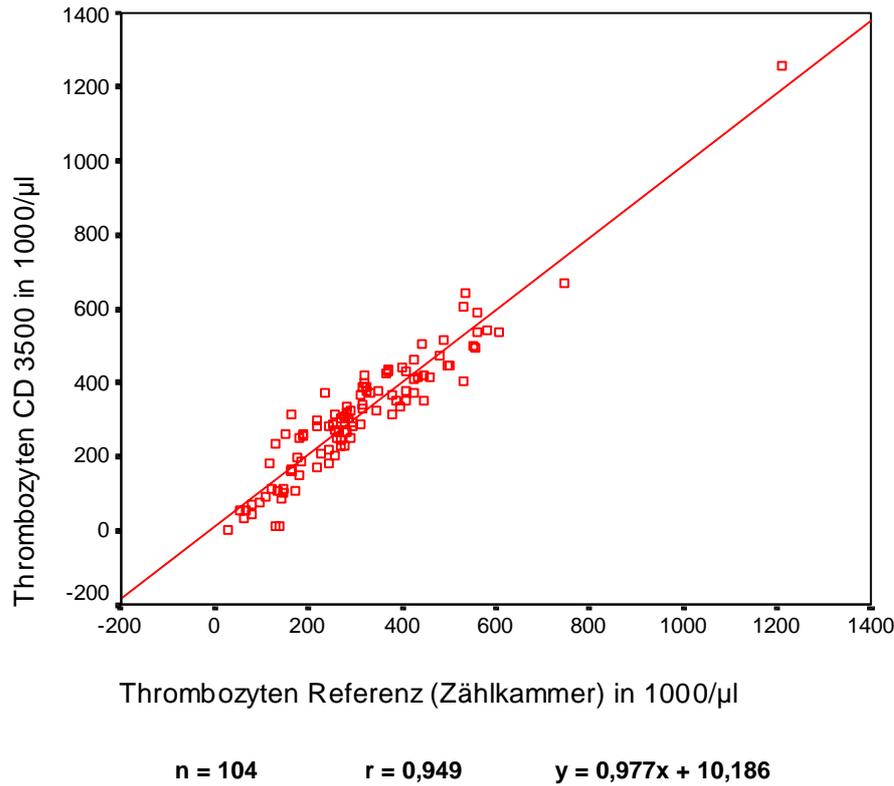


Abbildung 3.40a: Thrombozyten-Bestimmung beim Hund, Regressionsanalyse von CELL-DYN® 3500 (CD) und Zählkammer

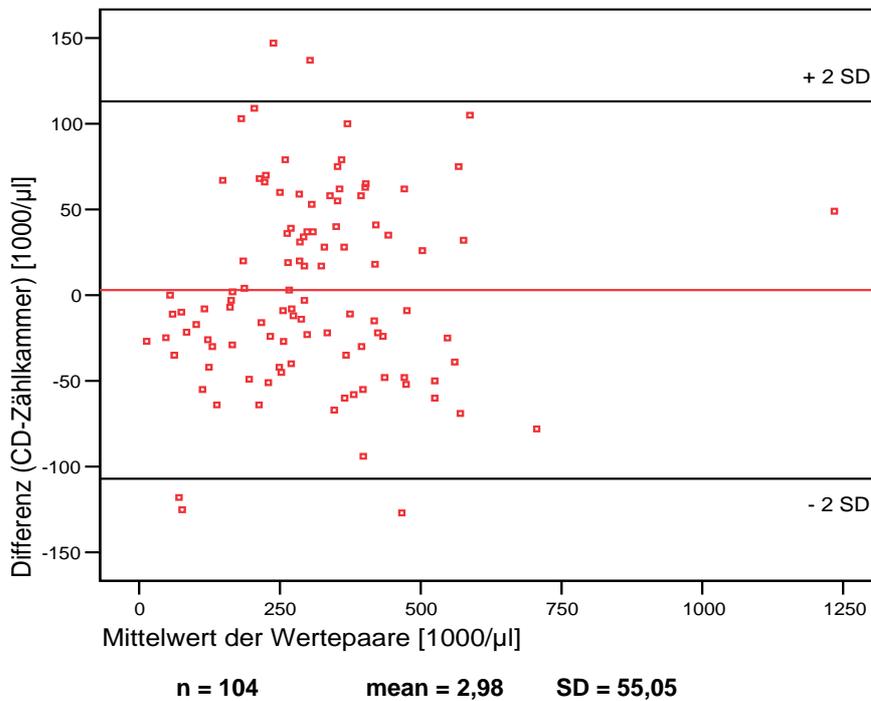


Abbildung 3.40b: Thrombozyten-Bestimmung beim Hund, absolute Differenzen von CELL-DYN® 3500 (CD) und Zählkammer

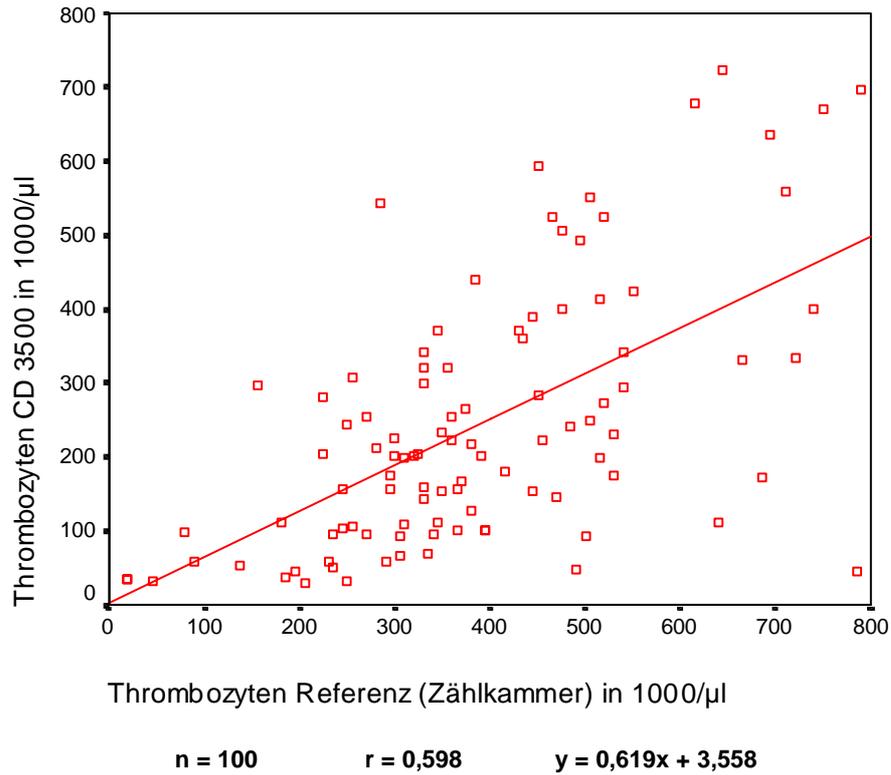


Abbildung 3.41a: Thrombozyten-Bestimmung bei der Katze, Regressionsanalyse von CELL-DYN® 3500 (CD) und Zählkammer

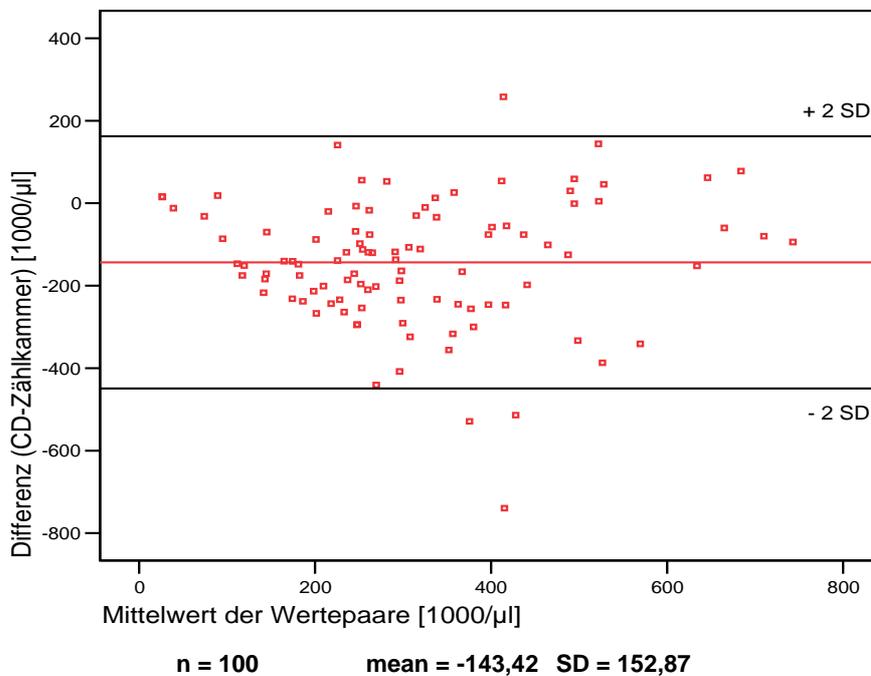


Abbildung 3.41b: Thrombozyten-Bestimmung bei der Katze, absolute Differenzen von CELL-DYN® 3500 (CD) und Zählkammer

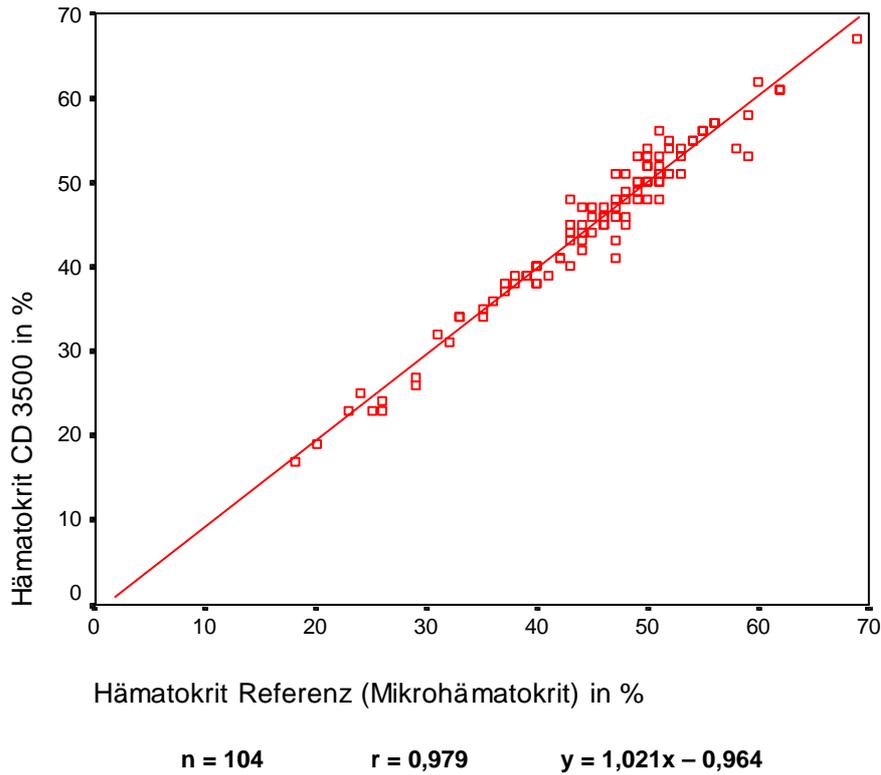


Abbildung 3.42a: Hämatokrit-Bestimmung beim Hund, Regressionsanalyse von CELL-DYN® 3500 (CD) und Mikrohämatokritmethode

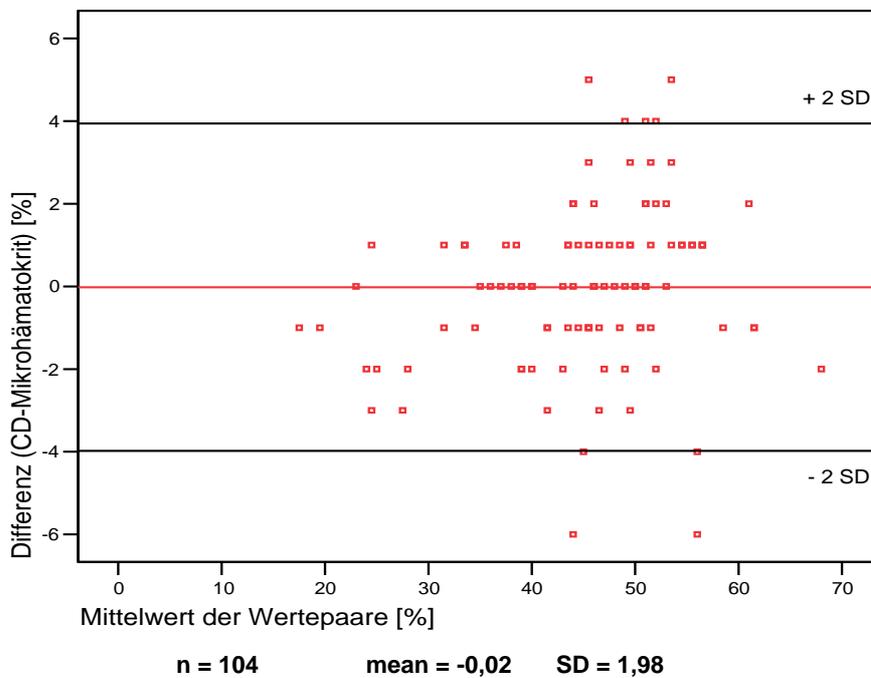


Abbildung 3.42b: Hämatokrit-Bestimmung beim Hund, absolute Differenzen von CELL-DYN® 3500 (CD) und Mikrohämatokritmethode

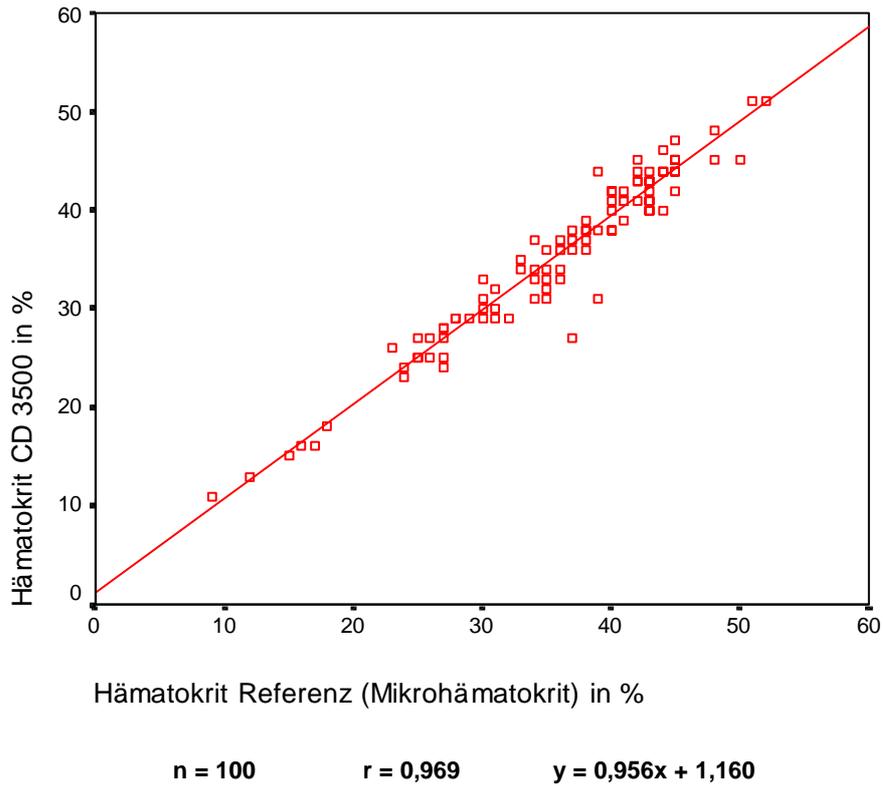


Abbildung 3.43a: Hämatokrit-Bestimmung bei der Katze, Regressionsanalyse von CELL-DYN® 3500 (CD) und Mikrohämatokritmethode

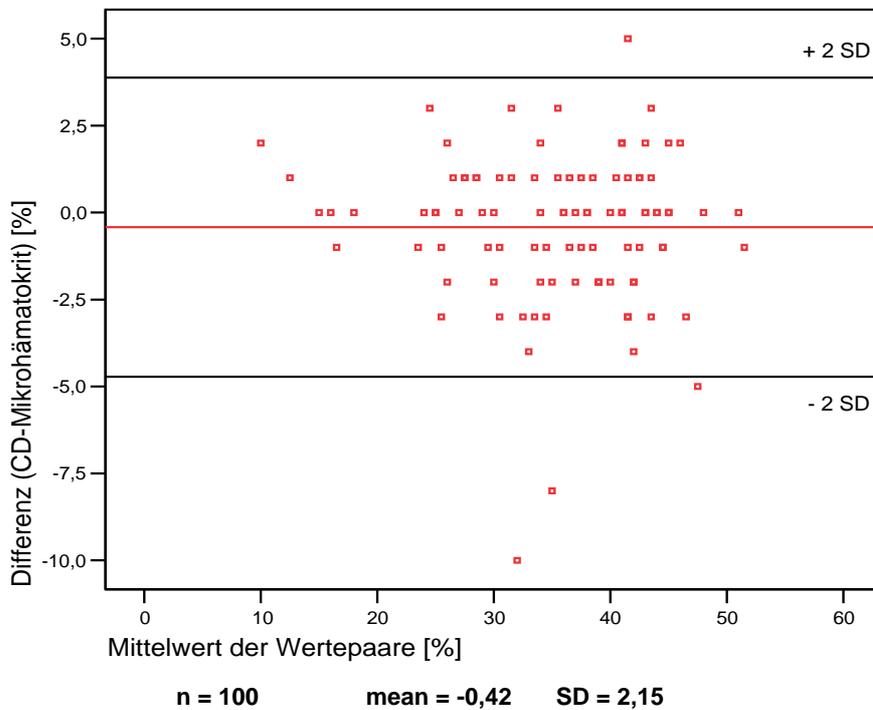


Abbildung 3.43b: Hämatokrit-Bestimmung bei der Katze, absolute Differenzen von CELL-DYN® 3500 (CD) und Mikrohämatokritmethode

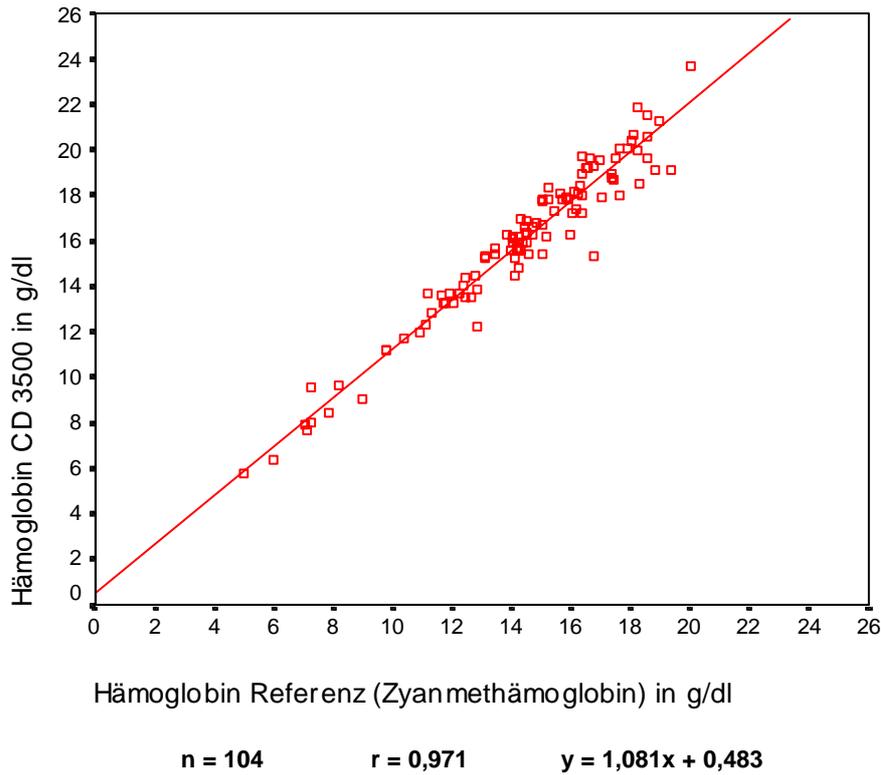


Abbildung 3.44a: Hämoglobin-Bestimmung beim Hund, Regressionsanalyse von CELL-DYN[®] 3500 (CD) und Zyanmethämoglobinmethode

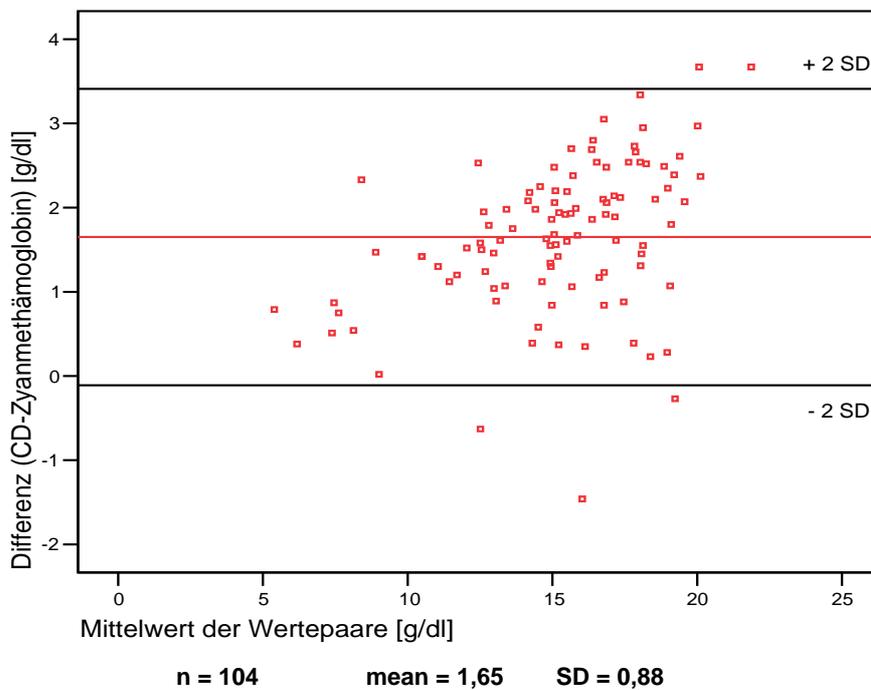


Abbildung 3.44b: Hämoglobin-Bestimmung beim Hund, absolute Differenzen von CELL-DYN[®] 3500 (CD) und Zyanmethämoglobinmethode

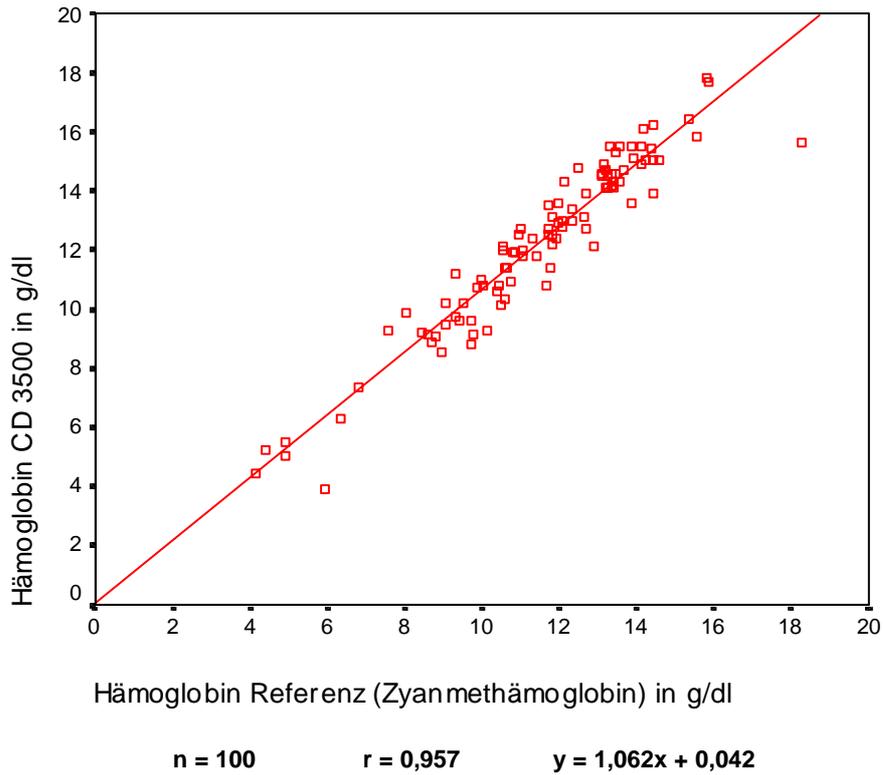


Abbildung 3.45a: Hämoglobin-Bestimmung bei der Katze, Regressionsanalyse von CELL-DYN® 3500 (CD) und Zyanmethämoglobinmethode

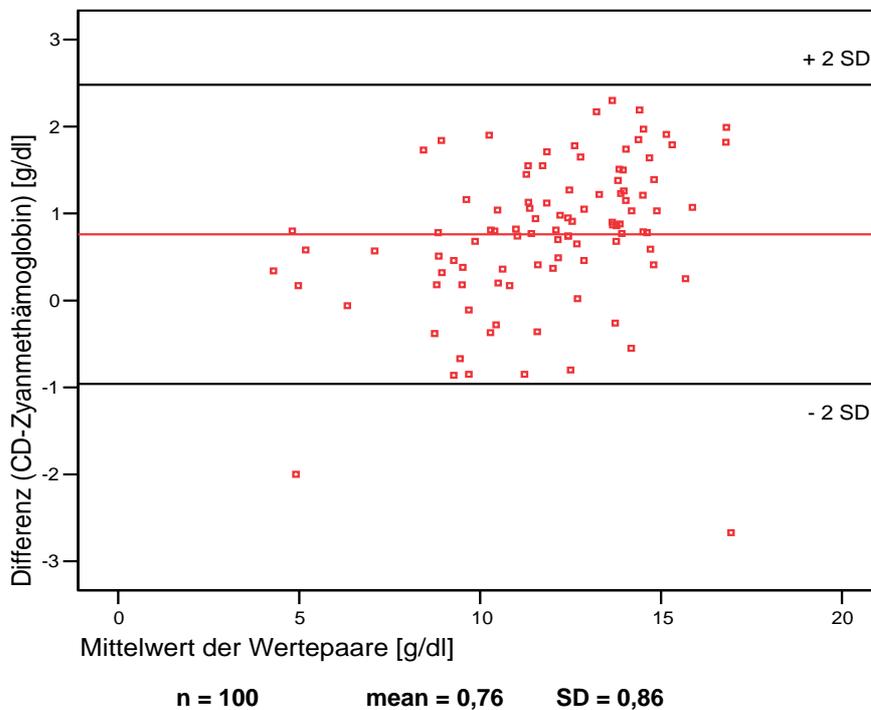


Abbildung 3.45b: Hämoglobin-Bestimmung bei der Katze, absolute Differenzen von CELL-DYN® 3500 (CD) und Zyanmethämoglobinmethode

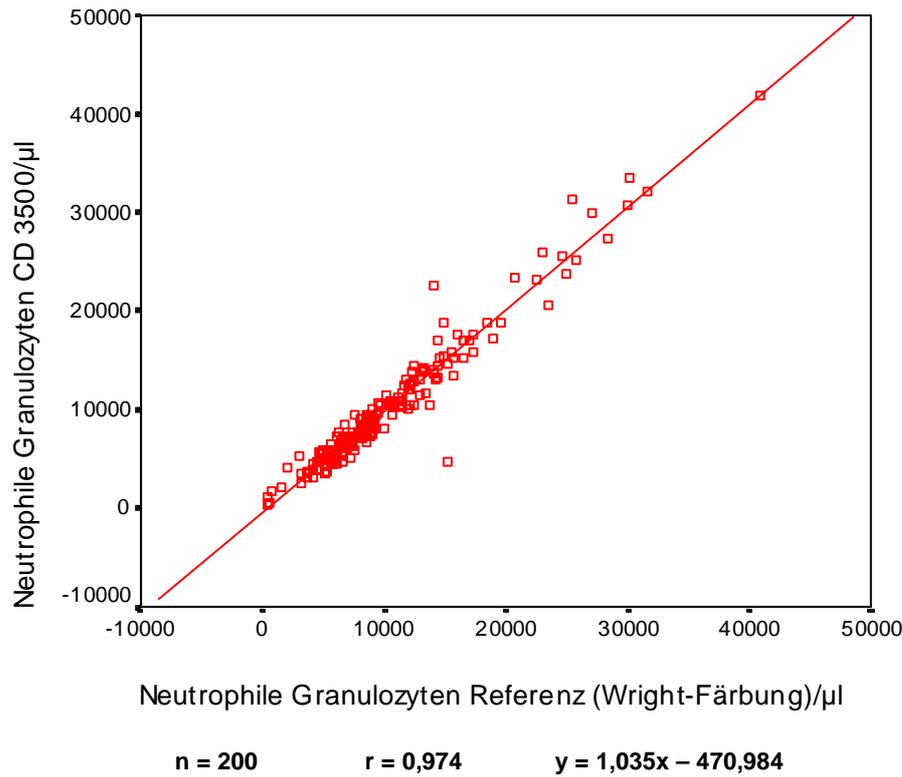


Abbildung 3.46a: Bestimmung der neutrophilen Granulozyten beim Hund, Regressionsanalyse von CELL-DYN® 3500 (CD) und Wright-Färbung

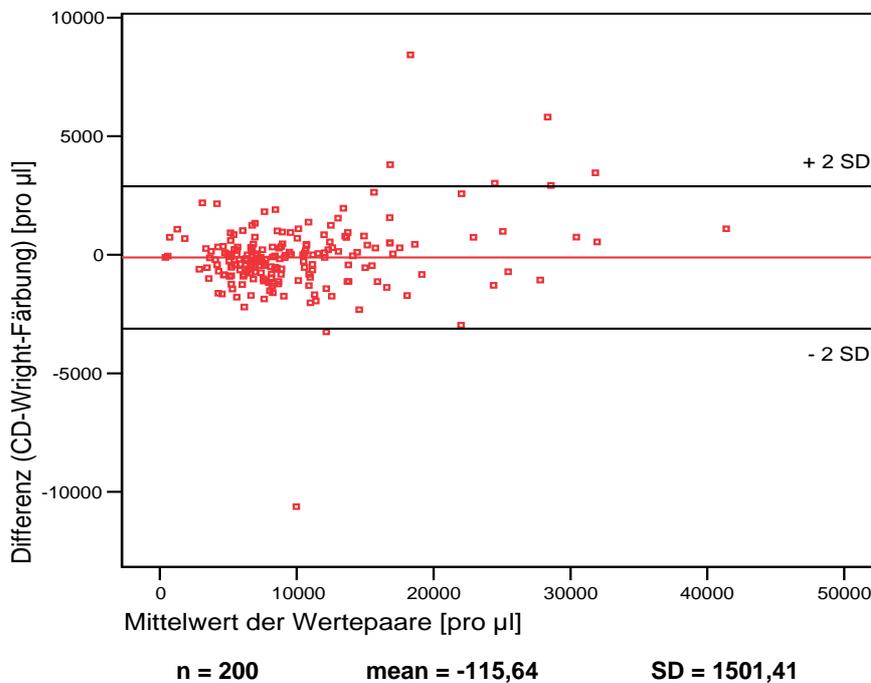


Abbildung 3.46b: Bestimmung der neutrophilen Granulozyten beim Hund, absolute Differenzen von CELL-DYN® 3500 (CD) und Wright-Färbung

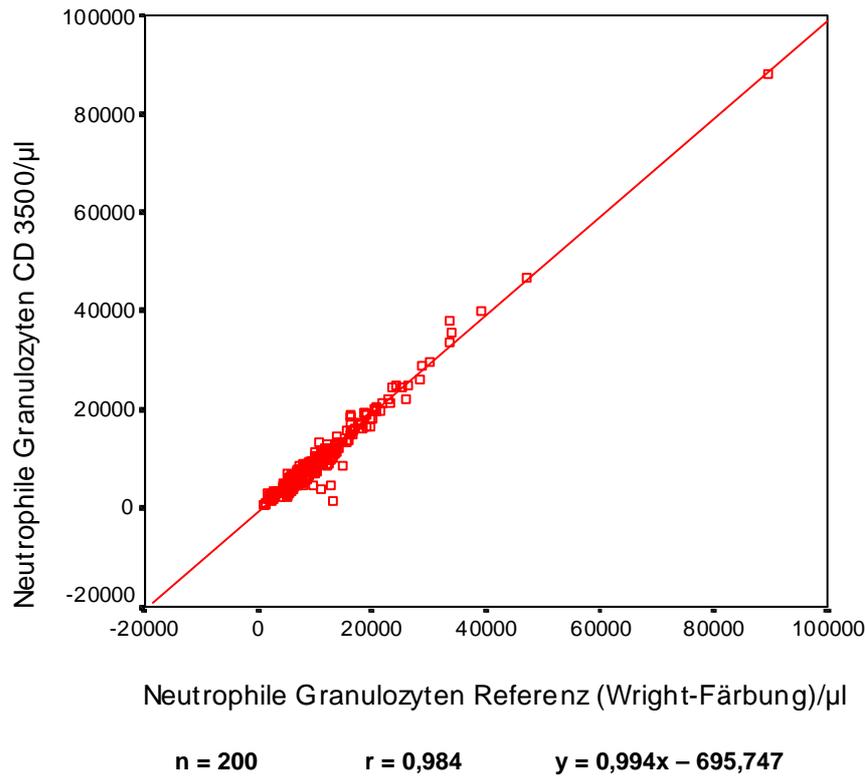


Abbildung 3.47a: Bestimmung der neutrophilen Granulozyten bei der Katze, Regressionsanalyse von CELL-DYN[®] 3500 (CD) und Wright-Färbung

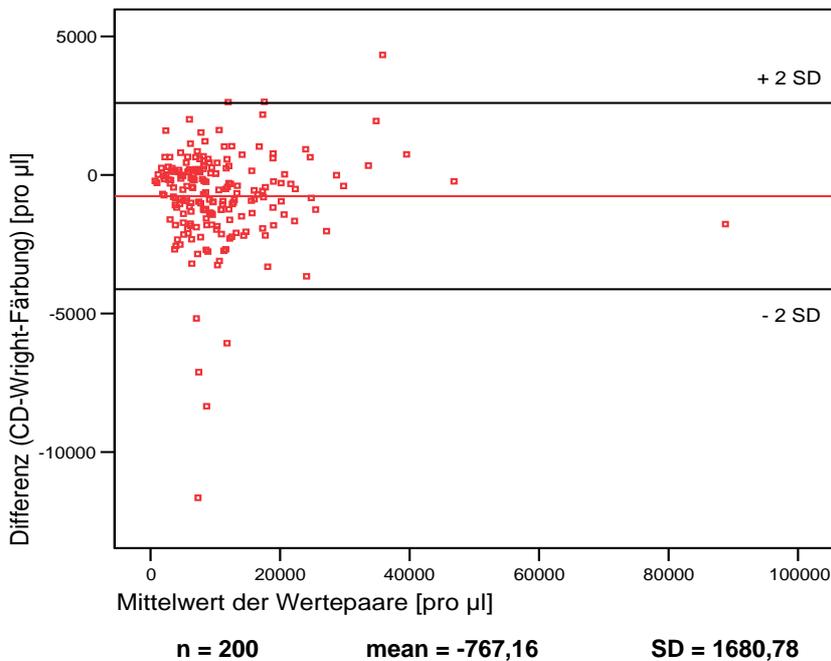


Abbildung 3.47b: Bestimmung der neutrophilen Granulozyten bei der Katze, absolute Differenzen von CELL-DYN[®] 3500 (CD) und Wright-Färbung

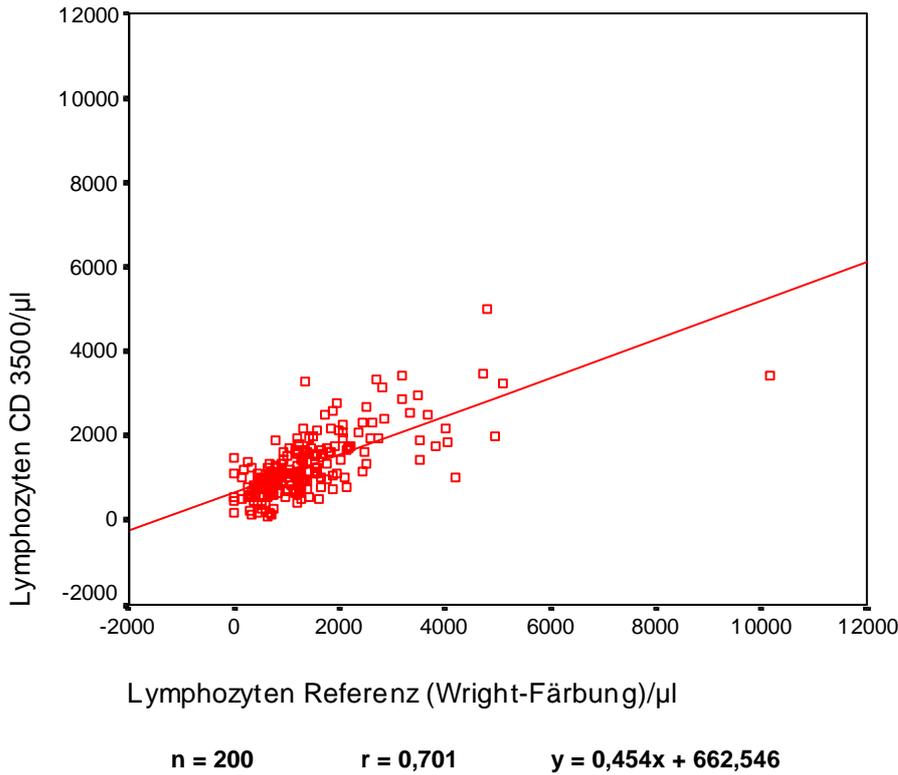


Abbildung 3.48a: Bestimmung der Lymphozyten beim Hund, Regressionsanalyse von CELL-DYN® 3500 (CD) und Wright-Färbung

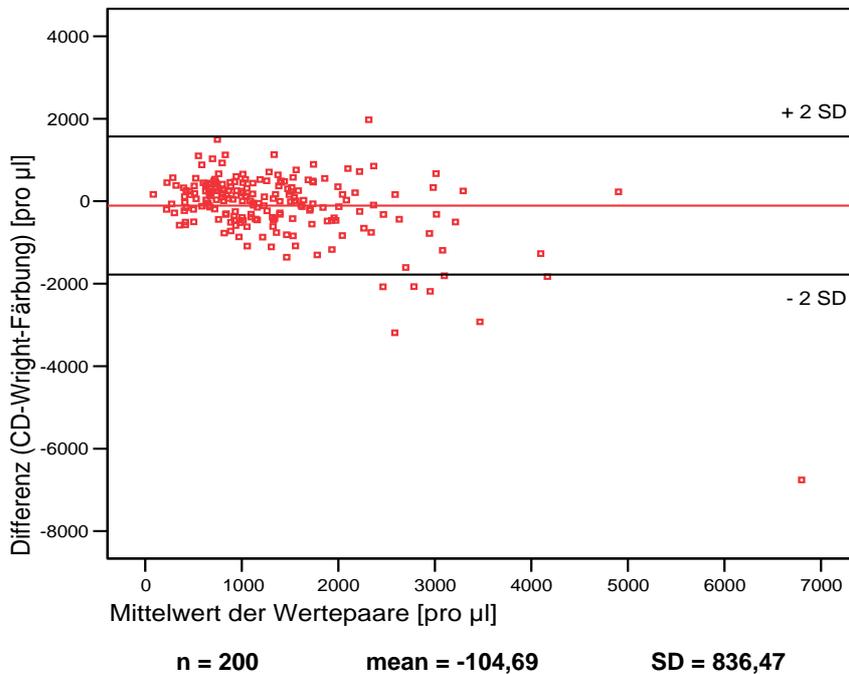


Abbildung 3.48b: Bestimmung der Lymphozyten beim Hund, absolute Differenzen von CELL-DYN® 3500 (CD) und Wright-Färbung

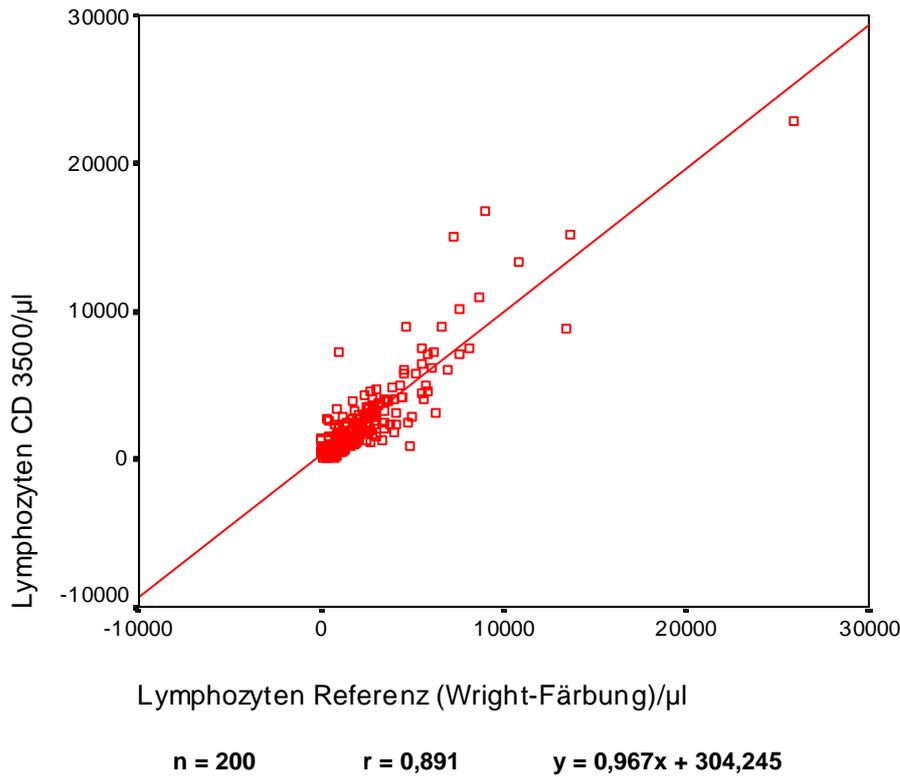


Abbildung 3.49a: Bestimmung der Lymphozyten bei der Katze, Regressionsanalyse von CELL-DYN[®] 3500 (CD) und Wright-Färbung

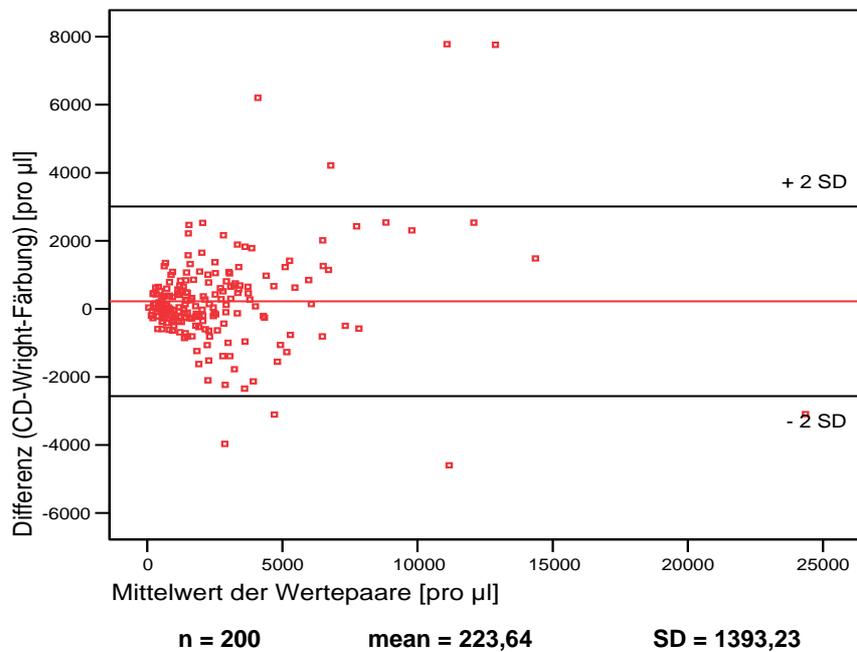


Abbildung 3.49b: Bestimmung der Lymphozyten bei der Katze, absolute Differenzen von CELL-DYN[®] 3500 (CD) und Wright-Färbung

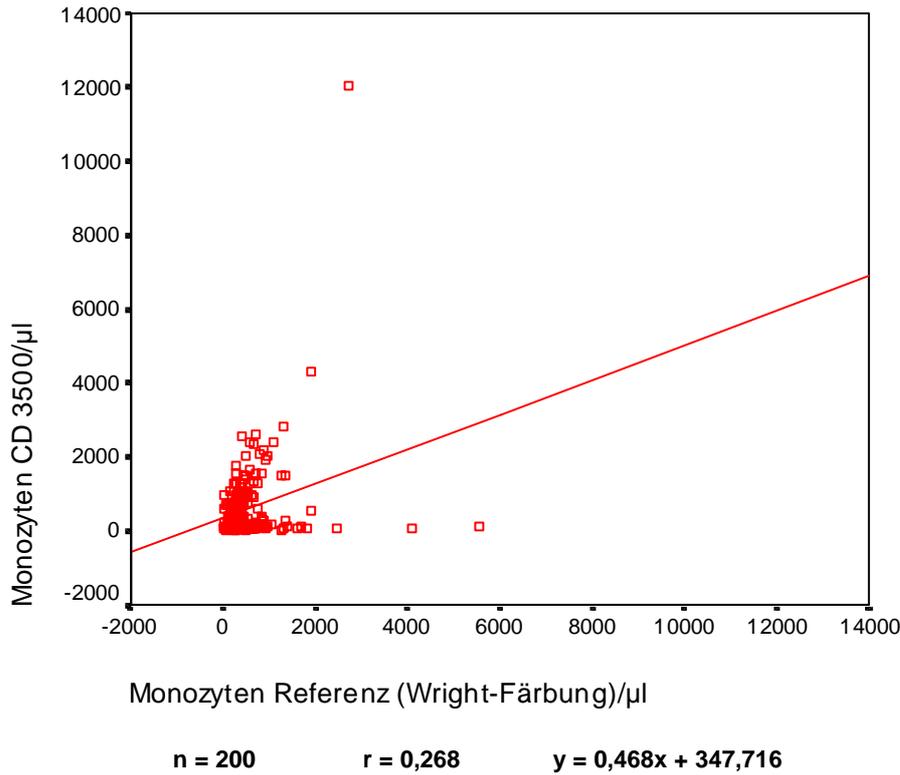


Abbildung 3.50a: Bestimmung der Monozyten beim Hund, Regressionsanalyse von CELL-DYN[®] 3500 (CD) und Wright-Färbung

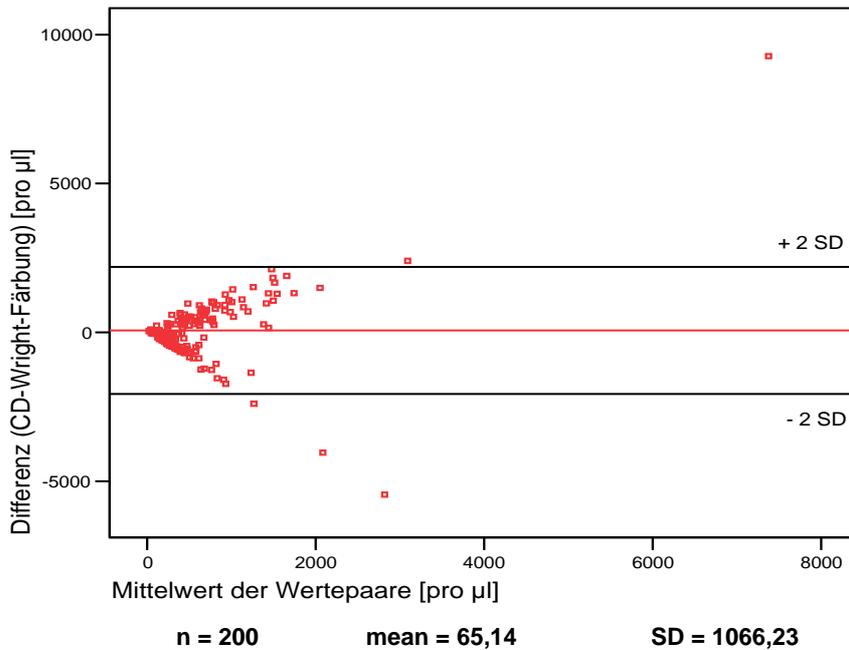


Abbildung 3.50b: Bestimmung der Monozyten beim Hund, absolute Differenzen von CELL-DYN[®] 3500 (CD) und Wright-Färbung

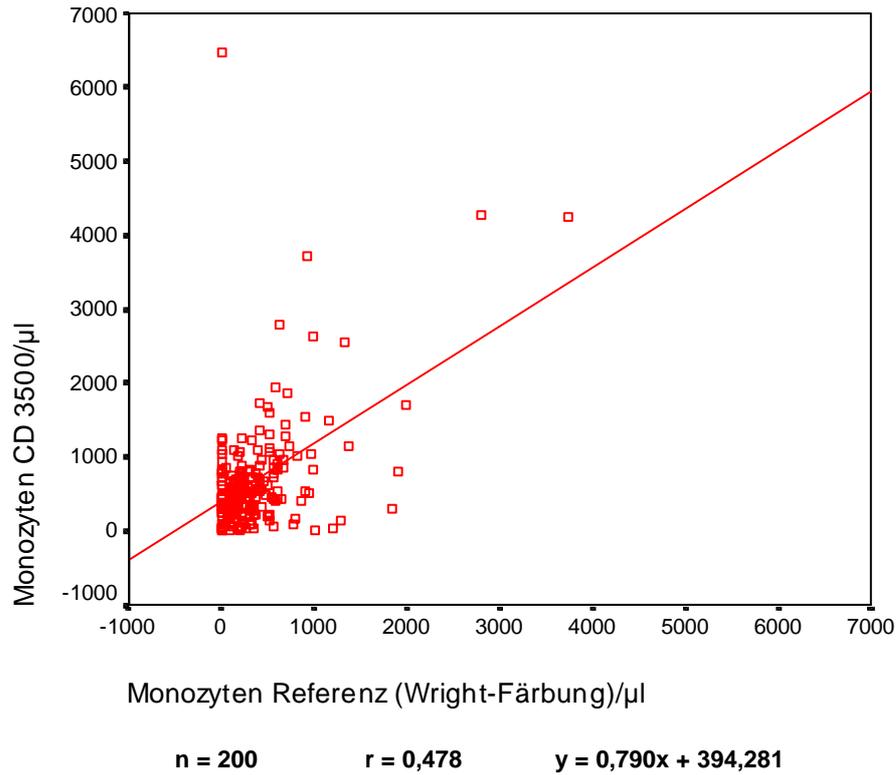


Abbildung 3.51a: Bestimmung der Monozyten bei der Katze, Regressionsanalyse von CELL-DYN[®] 3500 (CD) und Wright-Färbung

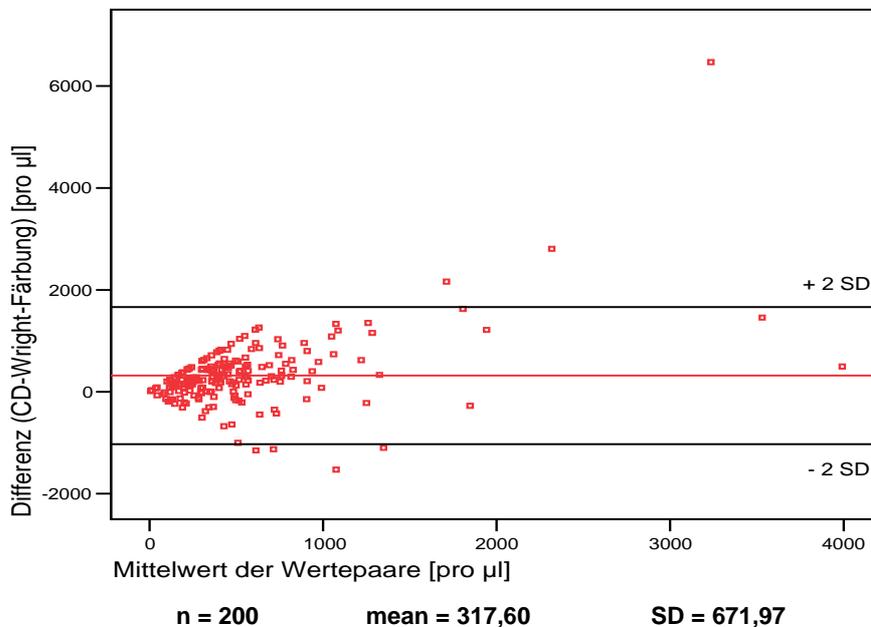


Abbildung 3.51b: Bestimmung der Monozyten bei der Katze, absolute Differenzen von CELL-DYN[®] 3500 (CD) und Wright-Färbung

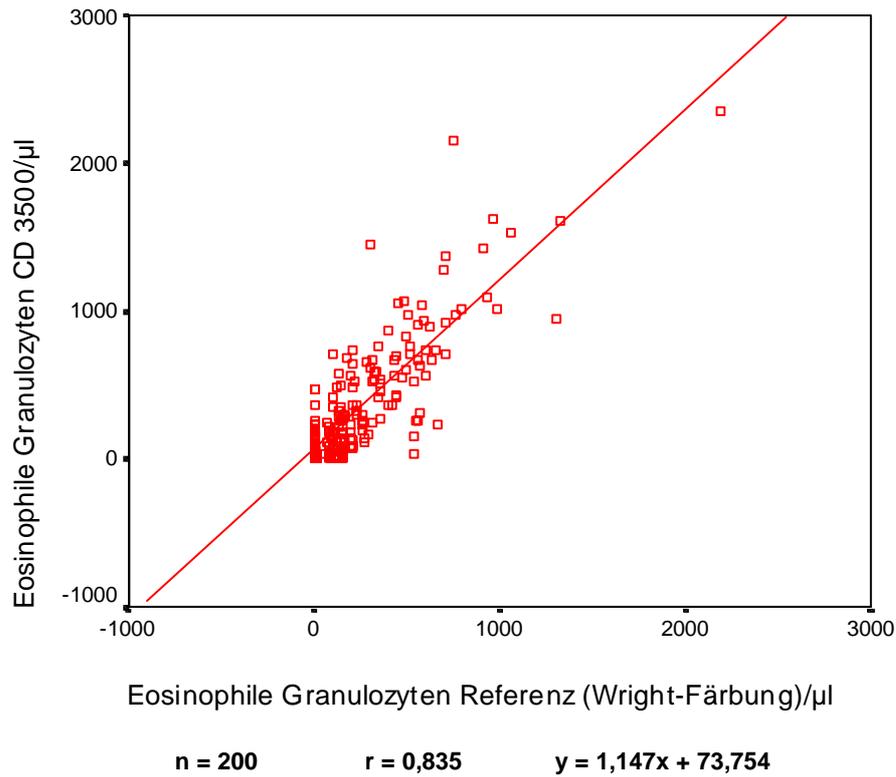


Abbildung 3.52a: Bestimmung der eosinophilen Granulozyten beim Hund, Regressionsanalyse von CELL-DYN[®] 3500 (CD) und Wright-Färbung

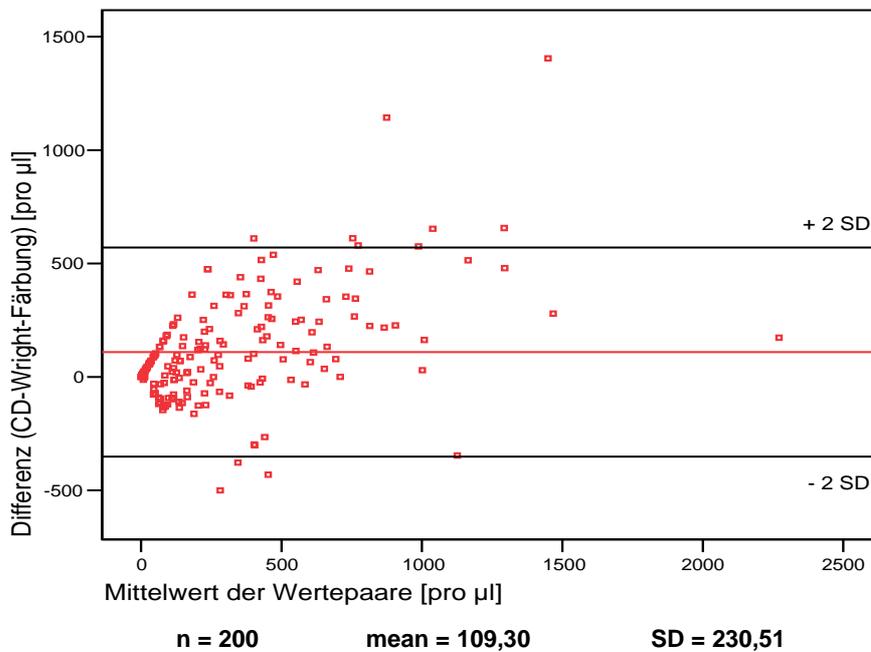


Abbildung 3.52b: Bestimmung der eosinophilen Granulozyten beim Hund, absolute Differenzen von CELL-DYN[®] 3500 (CD) und Wright-Färbung

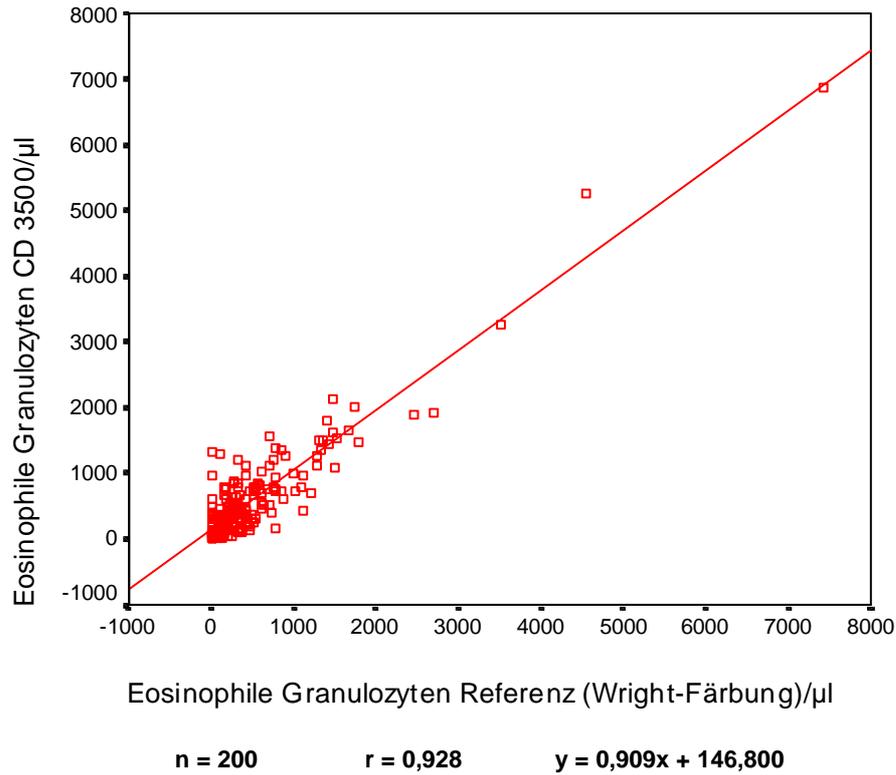


Abbildung 3.53a: Bestimmung der Eosinophilen Granulozyten bei der Katze, Regressionsanalyse von CELL-DYN[®] 3500 (CD) und Wright-Färbung

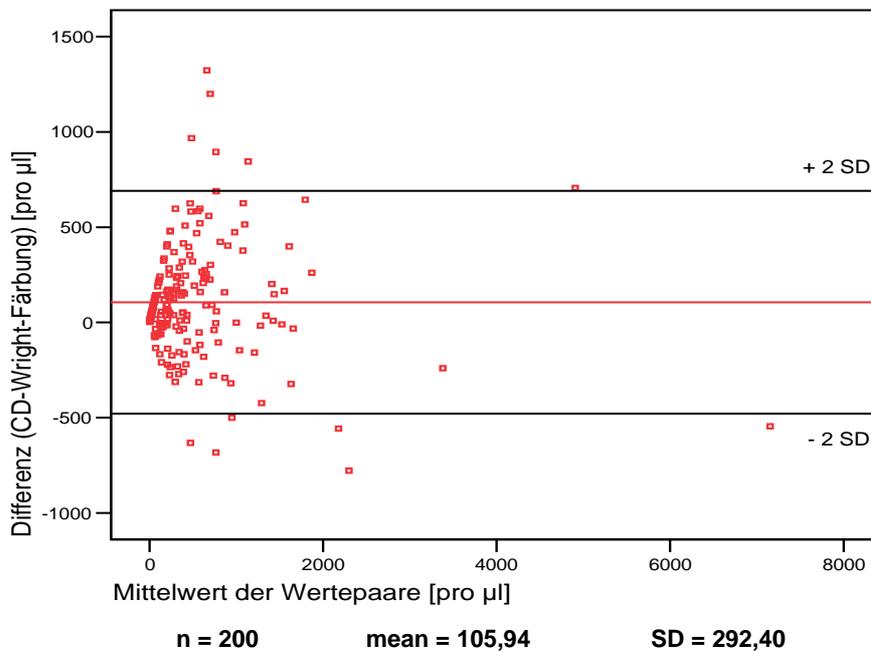


Abbildung 3.53b: Bestimmung der eosinophilen Granulozyten bei der Katze, absolute Differenzen von CELL-DYN[®] 3500 (CD) und Wright-Färbung

4 DISKUSSION

Das vollautomatische Hämatologiesystem CELL-DYN[®] 3500 ist für die Analyse von Humanblut konzipiert worden und mit einer vom Werk nicht fest kalibrierten Veterinärsoftware ausgestattet. Diese ermöglicht die Analyse von mehr als 60 verschiedenen Tierspezies, wobei die Kalibrierung individuell für jede einzelne Tierart vom jeweiligen Labor vorzunehmen ist (ABBOTT 1996). In der Humanmedizin ist das Gerät für zahlreiche unterschiedliche Einsatzmöglichkeiten evaluiert worden (DÖRNER et al. 1993, WARD et al. 1996, JOYNER und BROOKS 1995, FOURNIER et al. 1996, CHOW und LEUNG 1996, VIVES-CORRONS et al. 1996, BURCHERT-GRAEVE und KOCK 1996, MÜLLER et al. 1997, ILES-MANN und HENNIKER 1997). In der Veterinärmedizin beschränkt sich die Anzahl der Untersuchungen auf wenige Arbeiten bei einzelnen Tierarten. So haben BLEUL et al. (2002) das Gerät im Einsatz mit Rinderblut getestet. J. KIEFFER hat im Rahmen Ihrer Dissertation den CELL-DYN[®] 3500 anhand von Ratten- und Mäuseblut untersucht (1995). Eine Arbeit befasst sich mit der Evaluation des Gerätes bei Hunden, Katzen, Pferden, Rindern und Schafen. Für diese schwedische Arbeit ist nur eine englische Zusammenfassung verfügbar, aus der nicht eindeutig hervorgeht, wie groß die Probenmenge war und welche Untersuchungen genau durchgeführt wurden (LILLIEHOOK und LARRSON 1998). Darüber hinaus existieren unveröffentlichte Angaben aus tierexperimentellen Forschungsarbeiten für den Hund und auch für die Katze (SCHWENDENWEIN; BLEUEL 1995) und eine Arbeit über den Einsatz des CELL-DYN[®] 3500 für die Diagnose leukämischer Zellen im peripheren Blut von Hunden und Katzen (FERNANDES et al. 2002).

Die vorliegende Studie hatte das Ziel, die vom CELL-DYN[®] 3500 ermittelten Messwerte für Hunde- und Katzenblutproben auf Zuverlässigkeit zu untersuchen. Hierfür wurde einerseits die Präzision des Gerätes mit der der Referenzmethoden verglichen und in einem Methodenvergleich die Ergebnisse beider Messmethoden gegenübergestellt. Zudem sollen im Rahmen der Diskussion die Ergebnisse aus Präzision und Methodenvergleich anhand der Angaben aus der Literatur mit denen anderer Geräte bei den Tierarten Hund und Katze, sowie mit denen aus der Humanmedizin verglichen werden.

4.1 Qualitätskontrolle

Die Präzision ist ein wichtiges Kriterium, um die Leistungsfähigkeit eines Gerätes zu beurteilen. Sie erfasst die Streuung der Einzelwerte einer Stichprobe um den Mittelwert und steht für die Reproduzierbarkeit der Messungen (EDER und FRITSCH 1986). Je kleiner diese Streuung ist, desto höher ist die Präzision (DÜRR und KRAFT 1995).

4.1.1 Präzision in der Serie

Fünf Blutproben jeder Tierart (Hund und Katze) wurden vom CELL-DYN[®] 3500 und den jeweiligen Referenzmethoden zehnmal in Folge analysiert. Anhand der resultierenden Variationskoeffizienten (VK) erfolgte die Beurteilung der Präzision. Nach DÖRNER et al (1993) darf man bei vollautomatischen Zählgeräten heute Präzisionsdaten wie in der Klinischen Chemie erwarten. Als Richtwert für die Beurteilung einer sehr guten Präzision wurde demnach ein Variationskoeffizient von bis zu 3 % herangezogen.

4.1.1.1 Hund (CELL-DYN[®] 3500)

Die Variationskoeffizienten der untersuchten Parameter (Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, Hämatokrit, Hämoglobin, neutrophile und eosinophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten) lagen mit Ausnahme der Lymphozyten (4,34%), Monozyten (11,39%) und eosinophilen Granulozyten (31,47%) bei 3 % oder darunter und zeigten somit eine sehr gute Präzision. Die von BLEUEL (1995) ermittelten Werte des CELL-DYN[®] 3500 beim Hund liegen für Lymphozyten bei $VK < 3,7\%$, für Monozyten bei $VK < 7,7\%$ und für eosinophile Granulozyten bei $< 83,3\%$. Sie sind denen dieser Untersuchung sehr ähnlich, wurden aber nur anhand von drei Blutproben ermittelt. Beim Menschen ermittelte Präzisionswerte für die oben genannten Parameter werden wie folgt angegeben: VK Lymphozyten $< 4\%$ bis $< 14\%$, VK Monozyten $< 7\%$ bis $< 93\%$ und VK eosinophile Granulozyten $< 9\%$ bis $< 12\%$ (BLEUEL 1995). Lediglich die humanen eosinophilen Granulozyten werden

vom Gerät zuverlässiger gemessen, wobei die Werte anderer vollautomatischer Blutanalysegeräte (Technicon H*1, Bayer) für diesen Parameter mit 8% bis 34% beim Menschen angegeben werden und damit gut mit den hier ermittelten Werten übereinstimmen (WENZ et al. 1987, THOMAS et al. 1989, SWAIM 1991).

Alle drei diskutierten Parameter liegen beim Hund physiologischer Weise in niedrigen bis sehr niedrigen Konzentrationsbereichen vor, was zur statistischen Unpräzision maßgeblich beiträgt, sodass die angegebenen Werte noch als durchaus akzeptabel zu interpretieren sind (SWAIM 1991)

4.1.1.2 Katze (CELL-DYN® 3500)

Für die Katze liegen keine Präzisionsdaten aus der Literatur vor. Legt man denselben Maßstab wie beim Hund an, ist die Präzision der Parameter Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit und neutrophile Granulozyten als sehr gut zu bezeichnen. Lymphozyten und Monozyten werden mit VK 6,18% bzw. 15,09% ähnlich präzise gemessen wie die des Hundes. Eosinophile Granulozyten der Katze werden mit VK 8,61% sogar deutlich präziser bestimmt als beim Hund.

Eine Ausnahme bildet die Präzision der Katzenthrombozyten, die mit einem VK von 10,29% schlechter ausfiel. Die Präzision beim Menschen wird von DÖRNER (1993) mit VK 3,3% bis 7,8%, bei sehr niedrigen Thrombozytenzahlen sogar nur mit VK 31,8% angegeben und liegt damit nicht deutlich besser als bei der Katze. Auch BLEUEL (1995) ermittelte für Menschenthrombozyten ähnliche Präzisionen (VK < 3% bis < 9%).

Vergleicht man die Werte mit denen des Technicon H*1, wie sie von LIEDL (1996) ermittelt wurden, sind die Ergebnisse ähnlich bis deutlich besser. In dieser Studie wurden Werte für Thrombozyten mit VK 1,46% bis 37,98%, für Lymphozyten mit VK 3,37% bis 25,65%, für Monozyten mit VK 9,11% bis 34% und für eosinophile Granulozyten mit VK 5,99% bis 21,46% angegeben.

Der Unterschied der in dieser Untersuchung ermittelten Daten der Leukozytendifferenzierung der Katze im Vergleich zur Humanblutuntersuchung fällt deutlich geringer aus, als dies beim Technicon H*1 der Fall ist. Dies begründet sich höchwahrscheinlich in der unterschiedlichen Technik der Blutzellendifferenzierung. Im Fall vom Technicon H*1 wird die Peroxidaseaktivität der Leukozyten zu deren

Unterteilung herangezogen, die bei der Katze nur sehr unzuverlässig vorzukommen scheint (TVEDTEN 1993; LIEDL 1996).

4.1.1.3 Referenzmethoden

Alle Referenzmethoden lieferten bei allen untersuchten Parametern höhere Variationskoeffizienten und damit schlechtere Präzisionsergebnisse als der CELL-DYN® 3500. Besonders die Kammerzählung zeichnet sich durch eine hohe Impräzision aus und wird von manchen Autoren daher als Referenzmethode abgelehnt (DÖRNER 1993). Dennoch ist sie die einzig relevante, unabhängige Messmethode und wird von anderen Autoren aus diesem Grund als geeignet angesehen. THOMAS (1992) hält sie als Referenzmethode für die Leukozytenzählung bei Evaluierung eines neuen Gerätes für unersetzbar.

Alle Messungen der Parameter Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, Hämatokrit und Hämoglobin lagen bei beiden Tierarten im Bereich vergleichbarer Arbeiten (LIEDL 1996).

Dies gilt auch für die Variationskoeffizienten der einzelnen Leukozytensubpopulationen bei der Blutzelldifferenzierung beider Tierarten. Auch hierbei zeigte sich, dass die Präzision umso schlechter war, je geringer der Anteil der speziellen Zellgruppe am Gesamtblutbild war. So waren die VK der neutrophilen Granulozyten beim Hund mit 7,81% und bei der Katze mit 6,90% akzeptabel und nicht viel schlechter als die der Gerätemessungen. Bei den eosinophilen Granulozyten, die im Blut absolut und prozentual in sehr geringer Menge vorkommen lagen die VK dagegen bei 50,43% bzw. 93,77%. In diesen Bereichen geringer Häufigkeit führen bereits geringfügige Variationen (von 1% bis 3%), die klinisch nicht relevant wären, statistisch zu großen Abweichungen (TVEDTEN und WILKINS 1988).

Auch in der Humanmedizin ist die Präzision der mikroskopischen Blutzelldifferenzierung wesentlich niedriger als die der Blutanalysegeräte. Trotzdem ist sie als Referenzmethode unersetzbar (THOMAS 1992, DÖRNER 1993, FOURNIER et al. 1996).

4.1.2 Blutprobenlagerung

Hier sollten die Auswirkungen der Probenlagerung auf die Ergebnisse automatischer Blutanalyse überprüft werden.

Die Hauptaussage dieser Überprüfung findet sich in der Tabelle 3.39 wieder. Darin sind die statistisch signifikanten Änderungen einzelner Parameter zum Zeitpunkt 48 Stunden fett markiert. Der Zeitpunkt wurde, wie oben erwähnt so gewählt, da dies eine realistische Zeitspanne von Blutentnahme bis zur Analyse im Einsendelabor für den praktizierenden Tierarzt darstellt.

Hierbei stellte sich heraus, dass die Lagerung bei Kühlschranktemperatur deutliche Vorteile gegenüber der Raumtemperaturlagerung bietet. Lediglich die Thrombozyten der Katze, die schon in der seriellen Präzision ungenügende Werte aufwies und die auch im Methodenvergleich kaum mit der Referenzmethode übereinstimmen, zeigen auch bei der Überprüfung der Blutprobenlagerung signifikante Abweichungen. Als zweiter Parameter, der auch unter Kühlschranktemperaturbedingungen deutliche Impräzision nach 48 Stunden aufwies, konnte der Hämatokrit herausgestellt werden. Der Hämatokrit berechnet sich aus den vom Gerät gemessenen Parametern Erythrozytenzahl und MCV. Da die Erythrozytenzahl bei allen Tierarten und Lagerungsbedingungen stabil war, ergibt sich die Abweichung im Hämatokrit aus der Abweichung im MCV. Dieser nimmt mit zunehmender Lagerungsdauer signifikant zu. Dieses Phänomen ergibt sich als Resultat einer Erythrozytenmembranschädigung, bei der es zu erhöhter Durchlässigkeit mit Flüssigkeitseinstrom in die Zellen kommt (KNOLL 2000). KIEFFER (1995) beschreibt diese Impräzision bei Ratten- und Mäuseblut bereits nach 16 Stunden und THOMAS (1992) gibt als Stabilitätsgrenze für MCV und Hämatokrit bei automatischer Blutanalyse 24 Stunden an.

Demgegenüber zeigt bei Raumtemperatur gelagertes Blut signifikante Abweichungen zusätzlich der bereits erwähnten Parameter auch bei der optischen Leukozytenzählung und der Differenzierung der neutrophilen Granulozyten beider Tierarten und der Lymphozyten des Hundes. Wie MÄDE und WUJANZ (1995) publizierten, kommt es bereits nach wenigen Stunden zu deutlichen Veränderungen des Blutes durch die metabolische Aktivität der Erythrozyten, durch den Zerfall der Leukozyten und den Metabolismus der Plasmaproteine. Diese Veränderungen scheinen größeren Einfluss auf die optischen Eigenschaften der Zellen zu nehmen, als auf deren elektrische Leitfähigkeit.

Betrachtet man die Liniendiagramme, so fällt bei den Parametern des Differentialblutbildes auf, dass diese von Tag zu Tag teilweise starken Schwankungen ausgesetzt sind (s. Abb. 3.16 bis 3.23 und 3.30 bis 3.35). Diese wurden dadurch ausgelöst, dass der CELL-DYN[®] 3500 an einem Tag mal den WIC-Wert als Leukozytenzahl herangezogen hat und am anderen Tag den WOC-Wert. Da beide Werte z.T. deutlich voneinander abweichen (s. Abb. 3.12 bis 3.15 und 3.26 bis 3.29), kommt es bei den abhängigen Parametern der Leukozytensubpopulationen ebenfalls zu deutlichen Abweichungen.

Die Empfehlungen für Blutproben, die erst nach 48 Stunden analysiert werden können lautet zusammenfassend: Kühlung der Blutproben, Bevorzugung des WIC-Wertes bei der Leukozytenzählung, Vorsicht bei der Interpretation des Hämatokrit-Wertes und des MCV (beide falsch hoch).

4.2 Methodenvergleich

Um die Messergebnisse auf Zuverlässigkeit zu überprüfen, werden sie in einem Methodenvergleich (CELL-DYN[®] 3500 / manuelle Referenzmethode) gegenüber gestellt.

Zur statistischen Auswertung wurden eine Regressionsanalyse angewendet sowie Korrelationen zwischen den zu vergleichenden Methoden aufgestellt und der dazugehörige PEARSONSCHE Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient berechnet. Da dieses Verfahren aber nur den Grad eines linearen Zusammenhanges wiedergibt ohne Berücksichtigung der klinischen Relevanz, wurde zusätzlich die von BLAND und ALTMANN (1986) beschriebene Darstellung gewählt. Um die Übereinstimmung von zwei Geräten oder Messmethoden, die beide nicht den goldenen Standard liefern, ermitteln zu können, wird die absolute Differenz eines Wertepaares mit dessen Mittelwert verglichen und graphisch dargestellt (BLAND und ALTMANN 1986). Das Ergebnis dieser graphischen Methode lässt sofort erkennen, wie weit sich die Werte voneinander unterscheiden und ob diese Differenzen für die klinische Interpretation von Bedeutung sind (BLAND und ALTMANN 1986). Eine Bedeutung erlangen diese Differenzen immer dann, wenn durch sie die klinische Diagnose geändert werden würde. Wenn beispielsweise das Gerät die Lymphozyten einer Blutprobe noch im Referenzbereich [nach KRAFT und DÜRR (1995)] misst, das

Ergebnis der Referenzmethode aber über diesem Bereich läge, hätte der Untersucher den Konflikt zu beurteilen, ob es sich um eine Lymphozytose handelt oder nicht. Somit entsteht eine klinische Relevanz der Differenz.

Parameter des „kleinen Blutbildes“ (Leukozyten-, Erythrozyten-, Thrombozyten- und Hämoglobinkonzentration, Hämatokrit)

Sämtliche Parameter des „kleinen Blutbildes“ beider Tierarten mit Ausnahme der feline Thrombozyten zeigen eine gute bis sehr gute Korrelation mit Koeffizienten von 0,93 bis 0,99 (s. Tab. 3.40 und 3.42; Abb. 3.36a bis 3.45a). Eine sehr gute Übereinstimmung beider Messmethoden wird auch durch die nur sehr geringen mittleren Differenzen dokumentiert (z.B. 80 Leukozyten pro μl Blut, 90.000 Erythrozyten pro μl Blut bei der Katze und 2980 Thrombozyten pro μl Blut, 0,02 % Hämatokrit beim Hund). Diese mittleren Abweichungen sind klinisch nicht relevant, unabhängig von dem absoluten Wertebereich, in dem sie auftreten.

Darüber hinaus zeigt der Methodenvergleich, dass die mittleren Differenzen auch über einen weiten Messbereich (s. Tab. 3.40 und 3.42 „Minimum/Maximum“) klein waren und sich nahezu alle Werte im Toleranzbereich der doppelten Standardabweichung (2 SD) befanden (s. Abb. 3.36b bis 3.45b). Die wenigen Ausreißer lagen sowohl über als auch unter 2 SD bzw. -2 SD, sodass kein Trend festzustellen war. Auch traten sie unabhängig vom Wertebereich auf. Trotzdem muss festgehalten werden, dass diese Ausreißer z.T. klinische Relevanz besaßen. Da keine dieser Ausreißer klinisch nachverfolgt wurden, muss in Einzelfällen offen bleiben, welches Ergebnis klinisch plausibler erschienen hätte und ob eine oder beide Methode teilweise unerklärliche Messfehler produzieren.

Als allgemeiner Trend ließ sich weiterhin feststellen, dass bei den Parametern Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten Hund und Hämoglobin die positive mittlere Abweichung anzeigt, dass das Gerät eher höhere Werte misst, als die manuelle Referenzmethode. Beim Parameter Hämatokrit misst der CELL-DYN[®] 3500 eher niedrigere Werte als die Referenzmethode, was durch die negative mittlere Differenz zum Ausdruck kommt. Insgesamt waren die Differenzen aber wie bereits erwähnt so gering, dass diesem allgemeinen Trend keine klinische Signifikanz zugesprochen werden kann.

Ganz anders war das Ergebnis des Methodenvergleiches bei den felines Thrombozyten. Hier lag der Korrelationskoeffizient bei ungenügenden 0,598 (s. Abb. 3.41a). Noch deutlicher wird die schlechte Übereinstimmung beider Untersuchungsmethoden bei der Betrachtung der mittleren Differenz der Absolutwerte. Diese lag bei minus 143420 Thrombozyten pro μl Blut (s. Tab. 3.42 und Abb. 3.41b). Bei einem Referenzbereich feliner Thrombozyten von 180000 bis 550000 pro μl Blut (KRAFT und DÜRR 1995) wird klar, dass eine derart große Differenz (Gerät misst deutlich niedrigere Werte als die Referenzmethode) fast immer eine klinische Relevanz besitzt. Ein nach der Zählkammermethode physiologischer Wert wird von der Maschine fast immer als Thrombozytopenie ausgegeben und eine Thrombozytose würde vom Gerät als Wert im Referenzbereich angegeben. In beiden Fällen wären weitere diagnostische und therapeutische Schritte einzuleiten.

Dass sich das vom CELL-DYN[®] 3500 verwendete Widerstandsmessprinzip als ungeeignet für die Zählung der Katzenthrombozyten herausstellt, haben bereits andere Autoren publiziert (LIEDL 1996, TVEDTEN und WILKINS 1988). TVEDTEN (1993) stellte in seinen Untersuchungen ähnliche Abweichungen fest und gab als Grund für die fälschlicherweise zu niedrigen Thrombozytenzahlen des Gerätes die speziell den Katzenthrombozyten eigene Neigung zur Verklumpung an. Die Ausprägung dieser Aggregationsfähigkeit unterscheidet sich deutlich von der anderer Spezies, wie beispielsweise der des Hundes und der des Menschen (HART und NOLTE 1991). Diese Verklumpungstendenz einerseits und die Tatsache andererseits, dass die Blutplättchen der Katze sich in ihrer Größe mit den Erythrozyten überlappen, machen eine elektronische Zählung von Katzenthrombozyten nach der hier verwendeten Methode unmöglich (TVEDTEN und WILKINS 1988).

Parameter des Differentialblutbildes (neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und eosinophile Granulozyten)

Anders als bei der Untersuchung der Präzision wurden beim Methodenvergleich die Absolutzahlen der Leukozytensubpopulationen miteinander verglichen, da diese im Unterschied zu den Relativzahlen einen Bezug zur Klinik zulassen. Hierbei diente die vom CELL-DYN[®] 3500 ausgegebene Leukozytenzahl als Berechnungsgrundlage

sowohl für die Absolutzahlen der Leukozytensubpopulationen des Gerätes als auch die der Referenzmethode.

Sehr hoch war die Korrelation der neutrophilen Granulozyten bei beiden Tierarten ($r = 0,984$ und $0,974$ bei der Katze bzw. beim Hund). Dies ist von besonderer Bedeutung, da diese Zellpopulation mit Abstand die größte im Blut darstellt, was der Interpretation der Korrelation mehr Gewicht verleiht. Auch hier wiederum unterstreichen die geringen mittleren Differenzen die gute Übereinstimmung beider Messmethoden (s. Abb. 3.46b und 3.47b). Eine mittlere Abweichung von 115 Zellen pro μl Blut beim Hund ist genauso wenig klinisch relevant wie 767 Zellen pro μl Blut bei der Katze, wenn man die üblichen Referenzbereiche zu Rate zieht (Referenz nach KRAFT und DÜRR 1995: 3000-9000 pro μl beim Hund und 3000-11000 pro μl bei der Katze).

Deutlich niedriger war die Korrelation für die Parameter Lymphozyten und Monozyten vor allem beim Hund aber auch bei der Katze (s. Tab. 3.41 und 3.43, Abb. 3.48a und 3.49a). Die geringe Vorkommenshäufigkeit, die zu der oben erwähnten Impräzision führt, beeinflusst gleichermaßen auch die Korrelation (WENZ et al. 1987). Andererseits sind Monozyten manchmal auch unter dem Mikroskop schwer von aktivierten Lymphozyten zu differenzieren, was zu deren Verwechslung führen kann. Versuche mit Spezialfärbemethoden für Monozyten (Alpha-Naphthylazetat-Esterase-Färbung) erbrachten nach LIEDL (1996) keine besseren Ergebnisse als die Standardmethode (Wright-Färbung).

Betrachtet man die mittleren Differenzen der Lymphozyten und Monozyten und berücksichtigt den jeweiligen Referenzbereich dieser Zellen, kann eine klinische Relevanz zumindest für die Lymphozyten beider Tierarten und die Monozyten des Hundes in Abrede gestellt werden. Bei Referenzbereichen nach KRAFT und DÜRR (1995) für Lymphozyten von 1000-3600/ μl und 1000-4000/ μl beim Hund bzw. bei der Katze lagen diese mittleren Abweichungen beim Hund bei minus 105 Zellen/ μl und bei der Katze bei 224 Zellen/ μl . Der Referenzbereich der Monozyten liegt nach selbigen Autoren bei 40-500 Zellen/ μl . Eine mittlere Differenz von 65 Zellen beim Hund wird demnach nie klinisch relevant sein. Die 318 Zellen/ μl bei der Katze könnte als eine Monozytose interpretiert werden (falsch positives Ergebnis), die in ihrer Höhe aber als sehr gering zu bewerten wäre. Bei der Auszählung von Leukozyten im Mikroskop wird ein mittlerer Bereich mäanderförmig durchmustert. Der Gehalt an Monozyten ist im Randbereich des Ausstrichs allerdings höher. Ein Counter

differenziert alle Zellen der Probe. Aus diesen technischen Unterschieden heraus sind die Abweichungen bei der Monozytendifferenzierung plausibel. Die Werte des Counters müssten von daher den tatsächlichen Werten theoretisch eher nahe kommen.

Trotz der geringen Vorkommenshäufigkeit der eosinophilen Granulozyten (Referenzbereich nach KRAFT und DÜRR 1995: 40-600 Zellen pro μl) war die Korrelation akzeptabel für den Hund ($r = 0,835$) und gut für die Katze ($r = 0,928$). Auch die mittleren Differenzen der Absolutwerte lagen mit gut 100 Zellen in einem klinisch irrelevanten Bereich. Dies unterscheidet die Fähigkeit des CELL-DYN[®] 3500, feline eosinophile Granulozyten zu erkennen, deutlich von der anderer Geräte. LIEDL (1996) gibt den Korrelationskoeffizienten für die eosinophilen Granulozyten beim Technicon H*1 mit $r = 0,09$ an. Sie beschreibt die von diesem Gerät verwendete Peroxidase-Färbung der Leukozyten in Übereinstimmung mit TVEDTEN (1993) als unzureichend. Dagegen scheint sich die Messmethode des CELL-DYN[®] 3500 für eosinophile Granulozyten, das 90° depolarisierte Laserlicht, gut für deren Differenzierung beim Hund und besonders bei der Katze zu eignen.

An dieser Stelle muss nochmals darauf hingewiesen werden, dass es auch bei den Parametern des Differentialblutbildes klinisch relevante Ausreißer gab (s. Abb. 3.46b bis 3.50b), die ebenso wie bei den übrigen Parametern nicht erklärt werden konnten. Wie bereits mehrfach erwähnt, wurde auf eine Auswertung der basophilen Granulozyten aufgrund ihrer äußerst geringen Vorkommenshäufigkeit ganz verzichtet (Referenzbereich nach KRAFT und DÜRR: selten, bis 40). Es sollte aber nicht unerwähnt bleiben, dass die seltenen Basophilien, die nach der Anschaffung des CELL-DYN[®] 3500 bis heute in unserem Labor diagnostiziert wurden, allesamt vom Gerät nicht als solche erkannt wurden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass von den 200 Hundebloodproben bei 156 (78%) das Differentialblutbild vom CELL-DYN[®] 3500 übernommen werden konnte. Von den 200 Differentialblutbildern bei der Katze konnten 131 (65,5%) akzeptiert werden.

Vergleich mit humanmedizinischen Untersuchungen und Untersuchungen bei anderen Tierarten

Die Parameter des „kleinen Blutbildes“ sind in Sachen Korrelation nicht mit der vorliegenden Arbeit zu vergleichen, da hier als Referenzmethode immer ein anderes Blutanalysegerät gewählt wurde (DÖRNER et al. 1993, WARD et al. 1996, CHOW und LEUNG 1996, VIVES-CORRONS 1996).

Auch von KIEFFER (1995) wurde ein anderes Gerät herangezogen.

BLEUL et al. (2002) benutzten dagegen manuelle Methoden, um die Zuverlässigkeit des CELL-DYN[®] 3500 beim Rind zu überprüfen. Lässt man hierbei einmal die feline Thrombozyten außer Betracht, so ergaben sich nahezu identische Übereinstimmungen im Methodenvergleich wie in der vorliegenden Arbeit. Sämtliche Korrelationskoeffizienten waren nach der Arbeit von BLEUL et al. (2002) nur geringgradig kleiner.

Beim Differentialblutbild lagen die Korrelationskoeffizienten für den wichtigsten Wert (neutrophile Granulozyten) je nach Arbeit deutlich höher (VIVES-CORRONS et al. 1996: $r = 0,916$) oder gleich (BURCHERT-GRAEVE und KOCK 1996: $r = 0,986$). Die restlichen Parameter wurden mit Humanblut deutlich zuverlässiger erkannt als in der vorliegenden Arbeit. Insbesondere die humanen Lymphozyten und Monozyten können vom CELL-DYN[®] 3500 offensichtlich genauer differenziert werden.

Die Ergebnisse des CELL-DYN[®] 3500 bei anderen Tierarten erbrachten ähnliche Korrelationen bei der Maus und beim Rind (KIEFFER 1995, BLEUL et al. 2002) und deutliche niedrigere bei der Ratte (KIEFFER 1995). Beispielsweise lag hier r für die neutrophilen Granulozyten nur bei 0,886.

Schlussbetrachtung

Bei einer abschließenden Beurteilung bleibt festzuhalten, dass bei den Untersuchungen der CELL-DYN[®] 3500 mit den Referenzmethoden gute bis sehr gute Korrelationen aufwies. Eine Ausnahme bildete hier die Zählung der feline Thrombozyten, die aufgrund mangelnder Übereinstimmung mit der Zählkammermethode und ebenfalls schlechter Präzision nicht mit dem Gerät vorgenommen werden sollte.

Man sollte sich vergegenwärtigen, dass statistische Berechnungen selbst keine Antworten hinsichtlich klinischer Relevanz und daher Akzeptanz eines zu testenden Verfahrens geben können. Sie liefern vielmehr Anhaltspunkte über die Art und Größe der Fehler, die diesen Methoden anhaften. Ob sich eine neue Methode eignet, ist abhängig davon in welchem Maße diese Fehler tolerierbar sind (WESTGARD und HUNT 1973). Die Anzahl der aufgetretenen, klinisch relevanten Abweichungen bei beiden Tierarten sind bei gleichzeitiger Berücksichtigung des klinischen Bildes tolerierbar.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Messergebnisse des CELL-DYN[®] 3500, eines vollautomatischen Hämatologiesystems, hinsichtlich ihrer Zuverlässigkeit bei der Analyse von Hunde- und Katzenblutproben überprüft. Hierfür wurden folgende Untersuchungen durchgeführt und mit den Resultaten der Referenzmethoden verglichen: automatisierte Zellzahlbestimmung von Leukozyten (WBC), Erythrozyten (RBC) und Thrombozyten (PLT), Hämatokritmessung (HCT), Bestimmung der Hämoglobinkonzentration (HGB), sowie automatisierte Blutzelldifferenzierung von neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten.

Vorab wurde eine Qualitätskontrolle des Gerätes und der Referenzmethoden durch serielle Präzisionsmessungen vorgenommen und eine Untersuchung der Probenstabilität bei Lagerung angeschlossen.

Der CELL-DYN[®] 3500 ist ein Multi-Parameter Durchflusszytometer, der Leukozyten (WBC) nach dem Prinzip der Laserlichtstreuung (Multi-Angle Polarized Scatter Separation; M.A.P.S.S.) sowohl zählt als auch differenziert. Erythrozyten (RBC) und Thrombozyten (PLT) werden nach dem Widerstandsmessprinzip ermittelt, nach dem zusätzlich auch die Leukozyten bestimmt werden. Die Referenzmethoden wurden nach den Empfehlungen des *International Committee for Standardization in Haematology* (ICSH 1984) gewählt und beinhalteten manuelle Zählungen der WBC, RBC und PLT, die Mikro-Hämatokrit-Zentrifugen Methode und die spektrophotometrische Messung der Hämoglobinkonzentration nach dem WHO Standard für Hämoglobinbestimmungen. Die automatischen Differentialblutbilder wurden mit mikroskopischen 400-Zell Differentialblutbildern verglichen.

Die hohe Präzision des CELL-DYN[®] 3500 konnte durch niedrige Variationskoeffizienten dokumentiert werden. Diese waren bei allen untersuchten Parametern durchweg kleiner als die der manuellen Referenzmethoden (Präzision in Serie).

Zur Gewährleistung verlässlicher Werte der automatischen Blutanalyse sollte die Blutprobe gekühlt und innerhalb von 48 Stunden nach Blutentnahme untersucht werden (Untersuchung zur Probenlagerung).

Es konnten folgende Korrelationskoeffizienten (r) durch lineare Regressionsanalyse nach Pearson ermittelt werden: 0,988 und 0,977 für WBC; 0,927 und 0,960 für RBC; 0,949 und 0,598 für PLT; 0,971 und 0,957 für HGB; 0,979 und 0,969 für HCT bei Hunden bzw. Katzen. Die Korrelationskoeffizienten für neutrophile Granulozyten waren 0,974 und 0,984, die für Lymphozyten 0,701 und 0,891 bei Hunden bzw. Katzen. Da Monozyten und insbesondere basophile Granulozyten nur in sehr geringen Konzentrationen im Blut vorliegen waren nur mäßige Korrelationen dieser Zellen zu ermitteln. Auf die statistische Auswertung der Basophilen wurde aus diesem Grund gänzlich verzichtet. Die Korrelation der eosinophilen Granulozyten war mit Korrelationskoeffizienten von 0,835 und 0,928 bei Hunden bzw. Katzen trotz niedriger absoluter Zellzahlen hoch. Dies belegte die besondere Fähigkeit des CELL-DYN[®] 3500 diese Zellpopulation richtig zu erkennen.

Da der Korrelationskoeffizient (r) nur den linearen Zusammenhang zwischen zwei Methoden ausdrückt und keine Aussage über die Übereinstimmung der Messwerte trifft, wurden absolute Differenzen nach der Methode nach BLAND und ALTMAN (1986) gebildet und in einem separaten Streudiagramm graphisch dargestellt.

Die Mittelwerte der absoluten Differenzen (mittlere Abweichungen) waren für sämtliche Parameter mit Ausnahmen der felines Thrombozyten sehr gering. Es konnten so keine systematischen klinisch relevanten Abweichungen festgestellt werden, nur einzelne zufällige, nicht erklärbare. Die Ergebnisse der Thrombozytenmessungen bei der Katze sollten nicht vom Gerät übernommen werden. Die Thrombozytenmessung bei der Katze sollte wahrscheinlich grundsätzlich nicht durch Impedanzmessgeräte erfolgen.

Insgesamt betrachtet, kann der CELL-DYN[®] 3500 als ein sehr zuverlässiges und einfach zu bedienendes Gerät angesehen werden, das präzise und akkurate Messergebnisse bei physiologischen und den meisten pathologischen Blutproben von Hunden und Katzen liefert. Das Gerät kann die Bearbeitungszeit der Blutprobenanalyse signifikant verkürzen, sodass sich der Benutzer intensiver mit der Studie pathologischer Proben befassen kann.

Für pathologische Blutbilder bleibt die mikroskopische Untersuchung unersetzlich.

Wir betrachten jedes Blutbild, bei dem ein Parameter außerhalb des Referenzbereichs liegt, oder dessen Ergebnisse klinisch nicht plausibel sind, als mikroskopisch zu überprüfen. Knapp 40 % aller Katzen- und gut 20 % aller

Hundeblutbilder werden in der Medizinischen Kleintierklinik mikroskopisch nachdifferenziert.

Darüber hinaus sind sämtliche Gerätewarnungen bezüglich pathologischer Zellen, wie Blasten, unreife Granulozyten, reaktive Lymphozyten und andere, im Veterinärprogramm des CELL-DYN® 3500 deaktiviert, sodass auch hier im klinischen Verdachtsfall eine mikroskopische Blutzellendifferenzierung unerlässlich ist.

6 SUMMARY

Evaluation of the Abbott CELL-DYN 3500 hematology analyzer for clinical use in canine and feline blood samples

The objective of this study was to evaluate the performance of the CELL-DYN[®] 3500, an automated hematology system for canine and feline blood sample analysis. The WBC (white blood cells), RBC (red blood cells), PLT (platelets) counts, the hematocrit (HCT), the hemoglobin concentration (HGB) and the WBC differential were determined and compared with the results obtained by the reference methods. In addition, a quality control was performed by studying within-run precision and the impact of blood storage on the automated blood analysis was examined.

The CELL-DYN[®] 3500 is a multi-parameter flow cytometer which counts and differentiates WBC based on the principle of multi-angle polarized scatter separation (M.A.P.S.S.). RBC and PLT are measured by the impedance method. The WBC count is determined by both, optical and impedance methods. The reference methods were used according the *International Committee for Standardization in Haematology* (ICSH 1984) recommendations on blood cell analysis. They included manual counts of WBC, RBC and PLT, a centrifugal micro-hematocrit method and a hemoglobin measurement by spectrophotometry using the WHO hemoglobin standard. The WBC differential was compared with the manual microscopic differentiation of 400 WBC.

A good reliability of the CELL-DYN[®] 3500 was documented by low coefficients of variation that were all lower than those of the manual reference methods (within-run precision).

The investigation of blood storage showed no significant changes of all measured parameters after 48 hours, except for feline PLT and hematocrit, when blood samples kept under low temperature (fridge).

The correlation coefficients (r) using linear regression analysis by Pearson were the following: 0,988 and 0,977 for WBC; 0,927 and 0,960 for RBC; 0,949 and 0,598 for PLT; 0,971 and 0,957 for HGB; 0,979 and 0,969 for HCT in dogs and cats respectively. The correlation coefficients neutrophils were 0,974 and 0,984 and for lymphocytes 0,701 and 0,891 in dogs and cats respectively. Due to the relatively low absolute numbers of monocytes and especially basophils only moderate correlation

were found for the former and the latter was excluded for statistical analysis. The correlation of eosinophils was high with correlation coefficients of 0,835 and 0,928 in dogs and cats respectively, which illustrates the ability of the CELL-DYN[®] 3500 to detect this cell type very accurately despite low absolute numbers.

The correlation coefficient documents the strength of relation between two methods but not their agreement in the light of clinical relevance. Therefore the absolute differences were determined and graphically illustrated in separate scatter plots using the method by BLAND and ALTMAN (1986).

With the exception of feline platelets, the average differences against the mean were low and not clinically relevant. Nevertheless very few large and clinically relevant differences could be found but not explained. PLT determinations of cats should not be accepted from this cell counter and probably should not be measured automatically by impedance methods in general.

The CELL-DYN[®] 3500 was found to be reliable, accurate and easy-to-use for blood cell counting and identifying normal and most of the pathological specimens obtained from dogs and cats. By using the CELL-DYN[®] 3500, the time for blood sample analysis can be shortened significantly and gives the user the possibility for a deeper study of pathological samples. In these samples a thorough microscopic exam is irreplaceable. Every differential cell count with one parameter clearly out of the reference range or every clinically unexpected result should be verified by microscopic examination. About 20% of all canine and 35% of all feline differential cell counts have to be repeated microscopically in our laboratory.

Moreover the automated warning system for pathological cells, such as blasts, immature granulocytes, reactive lymphocytes and more, is deactivated in the machines veterinary program so that these cells can only be verified accurately by manual methods.

7 ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
Art. Nr.	Artikel Nummer
BASO	basophile Granulozyten
Buffy Coat	Leukozyten- (+ Thrombozyten-) Schicht nach Blutzentrifugation
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa, ungefähr
CBC	complete blood count
Comp.	company, Firma
dl	Deziliter (0,1 Liter)
EOS	eosinophile Granulozyten
Fa.	Firma
fL	Femtoliter (10^{-15} Liter)
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HCT	Hämatokrit
HGB	Hämoglobinkonzentration
Inc.	Incorporation
Kap.	Kapitel
K ₃ EDTA	Tri-Kalium-Ethylendiamintetraessigsäure
LED	Leuchtdiode
LYM	Lymphozyten
MCH	mean cell hemoglobin; Hämoglobingehalt der einzelnen Erythrozyten
MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration; mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozytenmasse
MCV	mean cell volume; mittleres Erythrozyteneinzelvolumen
mg	Milligramm (10^{-3} Gramm)
Mio.	Millionen
ml	Milliliter (10^{-3} Liter)
MONO	Monozyten
NEU	neutrophile Granulozyten
nm	Nanometer (10^{-9} Meter)

PCV	packed cell volume; im weiteren Sinne Synonym für Hämatokrit
pg	Picogramm (10^{-12} Gramm)
PLT	Blutplättchen; Thrombozyten
RBC	rote Blutzellen; Erythrozyten
s.	siehe
s.o.	siehe oben
sog.	so genannte
s.S.	siehe Seite
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
VK	Variationskoeffizient
WBC	weiße Blutzellen; Leukozyten
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WIC	Widerstandsmessung der Leukozyten
WOC	optische Leukozytenzählung
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
μ l	Mikroliter (10^{-6} Liter)
2 SD	doppelte Standardabweichung

8 SCHRIFTTUMVERZEICHNIS

Abbott

CELL-DYN[®] 3500, Bedienungsanleitung.

Abbott GmbH Diagnostika, Wiesbaden, 1996

Abbott

CELL-DYN[™], M.A.P.S.S. Laser-Differenzierung, „Der Blick in die Zukunft“.

Abbott GmbH Diagnostika, Wiesbaden, 1995.

Becton Dickinson

Zellzählung mit der Unopette. Arbeitsanleitung.

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg 1991

Begemann H.

Methodik: Die „klassischen“ Zähl- und Messverfahren. In: Praktische Hämatologie, 10. Auflage.

Stuttgart; New York: Thieme 1997; 457-81

Bland JM, Altman DG.

Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement.

Lancet 1986; 1: 307-10.

Bleuel H.

Anwendung des CELL-DYN[®] 3500 bei tierexperimentellen Studien.

Boehringer, Mannheim 1995

Bleul U.

Hämatologische Verlaufsuntersuchungen bei Rindern intra und post partum – gleichzeitig eine Überprüfung des Hämatologiesystems CELL-DYN[®] 3500 R.

Diss med vet, Giessen 1998

Bleul U, Sobiraj A, Bostedt H.

Evaluation of the CELL-DYN[®] 3500 haematology analyser for bovine blood.

Comp Clin Path 2002; 11: 201-10

Bleul U, Sobiraj A, Bostedt H.

Effects of duration of storage and storage temperature on cell counts of bovine blood samples as determined by an automated haematology analyser.

Comp Clin Path 2002; 11: 211-16

Bull BS, Korpman RA.

Intralaboratory Quality Control Using Patient's Data. In: Quality Control. Cavill I, Hrsg. Edinburgh: Churchill Livingstone 1982; 121-150.

Bull BS, et al.

A Method for the Independent Assessment of the Accuracy of Hematology Whole Blood Calibrators.

American Journal of Clinical Pathology 1992; 98: 623-29.

Burchert-Graeve M, Kock R.

Automated leucocyte differentials in 292 patients with leucopenia: an evaluation of the Abbott CELL-DYN[®] 3500 (CD3500) haematology analyser.

Clin Lab Haematol 1996; 18(4): 253-59

Chapman ES, Hetherington EJ, Zelmanovic D.

A simple automated method for determining ex-vivo platelet activation status.

Blood 1996; 88: 292-99

Chapman ES, Sorette M, Hetherington EJ, et al.

A rapid, automated flow cytometric method to measure activated degranulated platelets by density determination.

Thromb Haemost 2003; 89(6): 1004-15

Chow EY, Leung KK.

Evaluating the CELL-DYN[®] 3500 haematology analyser in an acute general hospital.

Clin Lab Haematol 1996; 18(3): 187-93

Davies DT, Fisher GV.

The validation and application of the Technicon H-1 for the complete automated evaluation of laboratory animal haematology.

Comp Haem Int 1991; 1: 91-105

Dörner K, Schulze S, Reinhardt M.

Erste Evaluationsergebnisse mit dem Hämatologiesystem CELL-DYN[®] 3500.

Klin Lab 1993; 39: 39-44

Dutcher TF.

Automation in the Hematology Laboratory. In: Fairbanks VF, Hrsg. Current Haematology, Vol. 1

New York: John Wiley 1981: 633-50

Dürr U, Kraft W.

Qualitätskontrolle. In: Kraft W, Dürr UM., Hrsg. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, 3. Auflage.

Stuttgart: Schattauer, 1995.

Eder H, Fritsche H.

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

Tierärztliche Praxis 1986; 14, 417-29

Eppendorf Gerätebau

Analysensystem PCP 6121, Geräteprospekt.

Eppendorf Gerätebau Netheler & Hinz GmbH, Hamburg, 1981

Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC.

Schalm's Veterinary Hematology, Fifth Edition.

Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins 2000

Fernandes PJ, Modiano JF, Wojcieszyn J et al.

Use of the Cell-Dyn 3500 to predict leukemic cell lineage in peripheral blood of dogs and cats.

Vet Clin Pathol 2002; 31: 167-82

Fournier M, Gireau A, Chretien MC et al.

Laboratory evaluation of the Abbott CELL-DYN[®] 3500 5-part differential.

Am J Clin Pathol 1996 105(3): 286-92

Hart S, Nolte I.

Zur Thrombozytenaggregation bei der Katze.

Tierärztl Prax 1991; 19: 413-18

Hawkey CM, Dennett TB, Peirce MA.

Color Atlas of Comparative Veterinary Hematology.

Ames: Iowa State University Press 1989

Hettich

Kleinzentrifuge HAEMATOKRIT für die Arztpraxis und das Labor. Geräteprospekt.

Hettich GmbH, Tuttlingen, 1991

Hofmann-Lehmann R, Wegmann D, Winkler GC, Lutz H.

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

Comp Haematol Int 1998; 8: 108-16

ICSH (International Committee for Standardization in Haematology)

Protocol for evaluation of automated blood cell counters.

Clin Lab Haematol 1984; 6: 69-84

Iles-Mann J, Henniker J.

An evaluation of the differential from the Abbott CD 3500 in a population of patients with haematological abnormalities.

Clin Lab Haematol 1997; 19(3): 191-96

Jain NC.

Essentials of Veterinary Hematology. Forth Edition.

Philadelphia: Lea & Febiger, 1993

Jain NC.

Hematologic techniques. In: Schalm's veterinary hematology. Forth Edition.

Philadelphia: Lea & Febiger, 1986: 46-51

Joyner RE, Brooks MJ.

Evaluation of the automated leucocyte count and differential from the CELL-DYN[®] 3500 in sickle cell disease.

Clin Lab Haematol 1995; 17(4): 329-33

Kieffer JA.

CELL-DYN 3500-A Fully Automated Instrument for Veterinary Hematology: Performance Evaluation for the Analysis of Mouse and Rat Blood.

Diss med vet, Zürich 1995

Knoll JS.

Clinical Automated Hematology Systems. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC., Hrsg. Schalm's Veterinary Hematology. Fifth Edition.

Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins 2000: 3-11

Knoll JS, Rowell SL.

Clinical hematology: in-clinic analysis, quality control, reference values, and system selection.

Vet Clin North Am 1996; 26: 981-1002

Kosanke W.

Laserstreulicht und Peroxidasefärbung als Grundlagen zur Erstellung des Blutbildes und der Retikulozytenanalytik. In: Bruhn HD, Fölsch UR, Hrsg. Lehrbuch der Labormedizin.

Stuttgart: Schattauer, 1999: 403-10

Kraft et al.

Hämatologie. In: Kraft W, Dürr UM., Hrsg. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, 3. Auflage.

Stuttgart: Schattauer, 1995.

Kraft et al.

Hämostase. In: Kraft W, Dürr UM., Hrsg. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, 3. Auflage.

Stuttgart: Schattauer, 1995.

Latimer KS, Tvedten H.

Leukocyte Disorders. In: Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods. Willard MD, Tvedten H, Turnwald GH, Hrsg.

Philadelphia: Saunders; 1999: 52-74

Levine RA, Hart AH, Wardlaw SC.

Quantitative buffy coat analysis of blood collected from dogs, cats, and horses.

J Am Vet Med Assoc 1986; 189: 670-73

Liedl R.

Möglichkeiten und Grenzen des Technicon H*1 in der Anwendung auf Zellzahlbestimmung und Zelldifferenzierung bei Blutproben der Katze.

Diss med vet, München 1996

Lilliehook I, Larsson B.

Evaluation of CELL-DYN[®] 3500, a haematological instrument adapted for testing animal samples.

Svensk Veterinartidning 1998; 50: 643-48

Macey MG, Carty E, Chapman ES, et al.

Use of mean platelet component to measure platelet activation on the ADVIA 120 Hematology System.

Cytometry 1999; 38: 250-55

Mäde D, Wujanz G.

Untersuchungen zur Stabilisierung von Schweineblut für hämatologische Untersuchungen.

Berl Münch Tierärztl Wochenschr 1995; 108: 299-304

Merck

Hämoglobin-Merckotest[®]. Zusammensetzung und Arbeitsanleitung, Art. Nr. 3317.

Diagnostika Merck, Darmstadt, 1996

Miles

Ames-Hema-Tek-Slide-Stainer, Geräteprospekt.

Miles GmbH, Frankfurt, 1975.

Moritz A.

Der Einsatz lasergestützter Multiparameter-Hämatologiesysteme in der Veterinärmedizin.

Habil.-Schrift, Giessen 2000

Moritz A, Fickenscher Y, Meyer K et al.

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

Vet Clin Pathol 2004; 33: 32-38

Müller TH, Doscher A, Schunter F et al

Manual and automated methods for the determination of leukocyte counts at extreme low levels: comparative evaluation of the Nageotte chamber and the Abbott CELL-DYN[®] 3500 analyser.

Transfus Sci 1997; 18(4): 505-15

Nebe CT.

Der Stellenwert des automatischen Differentialblutbilds in der hämatologischen Labordiagnostik.

Abbott Times 1997; Sonderheft 2

Neuerer F, Hirschberger J.

Evaluation des Hämatologiegerätes Vet ABC/8P bei Hund, Katze und Pferd.

Praktischer Tierarzt 1999; 80(7): 584-94

Pschyrembel W.

Klinisches Wörterbuch, 256. Auflage

Berlin, Walter de Gruyter & Co. 1989; 634

Reagan WJ, Sanders TG, DeNicola DB.

Veterinary Hematology: Atlas of Common Domestic Species.

Ames: Iowa State University Press 1998

Sarstedt

THROMBO-PLUS® Sarstedt. Thrombozytenzählung, Arbeitsanleitung.

Sarstedt, Nümbrecht 1995.

Schneider W (a).

Der Technicon H*1-Hämatologie-Analysator: Das Ergebnis einer langjährigen Erfahrung mit Durchflusszytometrie und Zytochemie (Teil 1).

Extracta Diagnostica 1989; 3 (4): 172-81

Schwendenwein I

Erfahrungen mit dem CELL-DYN® 3500 (Abbott Diagnostics) in Routine und Forschung.

Unveröffentlichte schriftliche Notiz

Swaim WR.

Laboratory and clinical evaluation of white blood cell differential counts: comparison of the Coulter VCS, Technicon H*1, and 800-cell manual method.

Am J Clin Path 1991; 95: 381-88

Tasker S, Cripps PJ, Mackin AJ.

Evaluation of methods of platelet counting in the cat.

J Small Anim Pract 2001; 42 (7): 326-32

Thomas L.

Labor und Diagnose, 4. Auflage.

Marburg/Lahn: Medizinische Verlagsgesellschaft 1992

Thomas L, Müller T, Rodrian J.

Vergleich der Bestimmung von Leukozytenpopulationen am Technicon H*1 mit der mikroskopischen Differenzierung.

Lab Med 1989; 13: 213-19

Tvedten HW.

Advanced hematology analyzers: interpretation of results.

Vet Clin Path 1993; 22(3): 72-80

Tvedten HW.

Multi-species hematology atlas: Technicon H 1e system interpretation of results.

Tarrytown, New York: Miles Inc. 1993a

Tvedten HW, Wilkins RJ.

Automated blood cell counting systems: a comparison of the Coulter S-Plus IV, Ortho ELT-8/WS, Technicon H*1, and Sysmex E-5000.

Vet Clin Path 1988; 17(2): 90-6

Van Kampen EJ, Zijlstra WG.

Standardization of Hemoglobinometry: II. The Hemoglobin-cyanide Method.

Clin Chim Acta 1961; 6: 538-44.

Vives-Corrans JL, Besson I, Jou JM et al.

Evaluation of the Abbott CELL-DYN[®] 3500 hematology analyzer in university hospital.

Am J Clin Pathol 1996; 105(5): 553-59

Ward SL, Castleberry R, Smalley DL et al.

Use of the CELL-DYN[®] 3500 in a reference laboratory.

Laboratory Medicine 1996; 27(4): 265-69

Wardlaw SC, Levine RA.

Quantitative buffy coat analysis.

JAMA 1983; 249: 617-20

Wegmann D, Hofmann-Lehmann R, Lutz H.

Kurzevaluation des QBC-Vet Autoread-System.

Tierärztl Prax 1997; 25: 185-91

Weiser MG.

Modification and evaluation of a multichannel blood cell counting system for blood analysis in veterinary medicine.

J Am Vet Med Assoc 1987; 190: 411-15

Wenz G, Ramirez MA, Burns ER.

The H*1 hematology analyzer: its performance characteristics and value in the diagnosis of infectious disease.

Arch Path Lab Med 1987; 111: 521-24

Westgard JO, Hunt MR.

Use and interpretation of common statistical tests in method-comparison studies.

Clin Chem 1973; 19(1): 49-57

Zelmanovic D, Hetherington EJ.

Automated analysis of feline platelets in whole blood, including platelet count, mean platelet volume, and platelet activation state.

Vet Clin Pathol 1998; 27: 2-9

9 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Wilfried Kraft danke ich für die Bereitstellung der notwendigen finanziellen und labortechnischen Mittel zur Durchführung dieser Dissertation.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Johannes Hirschberger für die Überlassung des Themas. Er war mir durch seine Ratschläge und Verbesserungsvorschläge stets ein hilfreicher Betreuer.

Ein herzliches Dankeschön gilt dem gesamten Laborpersonal der Medizinischen Kleintierklinik, insbesondere der ehemaligen Mitarbeiterin Frau Ilona Dietz, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ferner möchte ich mich bei Herrn Dr. Michael Wiseman vom Leibniz-Rechenzentrum der Universität München für seine wertvollen Hinweise zur statistischen Datenauswertung bedanken.

Mein allergrößter Dank gilt meiner lieben Frau, ohne deren Geduld und Unterstützung ich vieles in meinem Leben nicht erreicht hätte.

10 LEBENS LAUF**Persönliche Daten**

Familienname: Neuerer
 Vorname: Felix
 Eltern: Karl-Heinz Neuerer
 Ursula Ekrot

Geboren am / in: 18.02.1969 in Heidenheim an der Brenz

Schulische Ausbildung

1975 - 1979 Grundschule
 1979 - 1988 Gymnasium mit Abschluss Abitur

Zivildienst

1988 - 1990 Universitäts-Krankenhaus Eppendorf, Hamburg
 im Pflegedienst

Universitätsausbildung

1990 - 1996 Tiermedizin an der LMU, München
 August 1996 Staatsexamen
 September 1996 Approbation als Tierarzt

Promotionsstudium

Seit November 1996 Doktorand an der Medizinischen Kleintierklinik der
 Universität München

Sonstiges

seit Mai 1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der
 Medizinischen Kleintierklinik der Universität
 München

von 01.05.98 bis 30.04.99 Internship (ECVIM-CA) an der Medizinischen
 Kleintierklinik der Universität München

von 01.05.99 bis 30.09.03 Residency (ECVIM-CA) an der Medizinischen
 Kleintierklinik der Universität München

von 01.01.01 bis 28.02.01 Auslandsaufenthalt an der Kleintierklinik der
 Utrecht University, Niederlande und

von 01.03.01 bis 31.12.01 Auslandsaufenthalt an der Purdue University,
 West Lafayette, USA im Rahmen der Residency