

2 LITERATURÜBERSICHT: DER FORTSCHRITT DER BLUTUNTERSUCHUNG UND DEREN QUALITÄT

Im folgenden Kapitel soll einleitend ein Überblick über die Entwicklung der Blutuntersuchung und deren Qualität gegeben werden. Dazu wird zunächst ein historischer Abriss über die Entwicklung der Blutuntersuchung im Allgemeinen dargestellt (Kapitel 2.1). Des Weiteren wird auf deren Relevanz beim Rind in der heutigen Zeit eingegangen (Kapitel 2.2) und die Qualitätssicherung bis zur Analyse betrachtet (Kapitel 2.3). Dabei wird insbesondere auf die möglichen Einflussgrößen innerhalb der präanalytischen Phase eingegangen. Auch die Möglichkeiten der Standardisierung werden dargestellt und die Stabilität ausgewählter Parameter im Blut nach heutigen Literaturerkenntnissen erläutert. Abschließend wird noch auf die verschiedenen Bestimmungsmethoden im Analysenlabor eingegangen (Kapitel 2.4).

2.1 Historische Entwicklung der Blutuntersuchung

Schon in frühester Zeit wurde das Blut für die Grundlage des Lebens gehalten. HIPPOKRATES stellte um 400 v.Chr. basierend auf der Elementenlehre von EMPEDOKLES die Viersäftelehre auf, wonach die Gesamtheit aller lebenden und unbelebten Dinge aus vier Elementen mit je zwei Eigenschaften besteht. Durch das ungleiche Mengenverhältnis dieser vier Elemente in der Materie sollte diese ihre spezifischen Eigenschaften erhalten. Die Viersäftelehre stützte sich nun auf die Annahme, dass analog zu den vier Elementen auch die Grundlage der körperlichen Vorgänge vier Säfte sind, die mit denselben Eigenschaften ausgestattet sind (HIPPOKRATES, 400 v.Chr.). Dies wird aus Abbildung 2.1 ersichtlich. Jede dieser vier Flüssigkeiten sollte ihren besonderen Ursprung im Organismus haben. Dem Blut wurde das Herz, der gelben Galle die Leber, der schwarzen Galle die Milz und dem Schleim das Gehirn als Ursprungsorgan zugeschrieben (vgl.: LEUENBERGER, 1980). In einer abgestandenen Blutprobe werden diese vier Anteile im Blut deutlich. An der Oberfläche befindet sich dann der „Schleim“, gefolgt vom Serum („gelbe Galle“), dem hellroten Anteil an der oberen Grenze des Blutkuchens („Blut“) und dem dunkelrot bis schwarz gefärbten Blutkuchen („schwarze Galle“) am Boden des Probengefäßes (vgl.: ROTHSCUH, 1974). Eine Krankheit wurde damals als eine Störung des Gleichgewichts dieser vier Säfte im Organismus verstanden, was sich noch heute in vielen medizinischen Fachbegriffen widerspiegelt. So galt z.B. der „Katarrh“ (kata-rheo: herab-fließen) als eine Herauslösung von überflüssigem Schleim aus dem Gehirn durch die Löcher des Siebbeins in die Atemwege (FISCHER-HOMBERGER, 1975).

ARISTOTELES argumentierte um 350 v.Chr., dass das Blut durch einen Kochungsprozess aus der Nahrung entstehen würde, wodurch gesundes Blut süß und rot wäre und eine spezifische Dicke hätte. Demnach wird das Blut bei Krankheit wässrig, da dann die Wärme nicht mehr ausreicht, um das Blut richtig zu kochen (vgl.: LEUENBERGER, 1980).

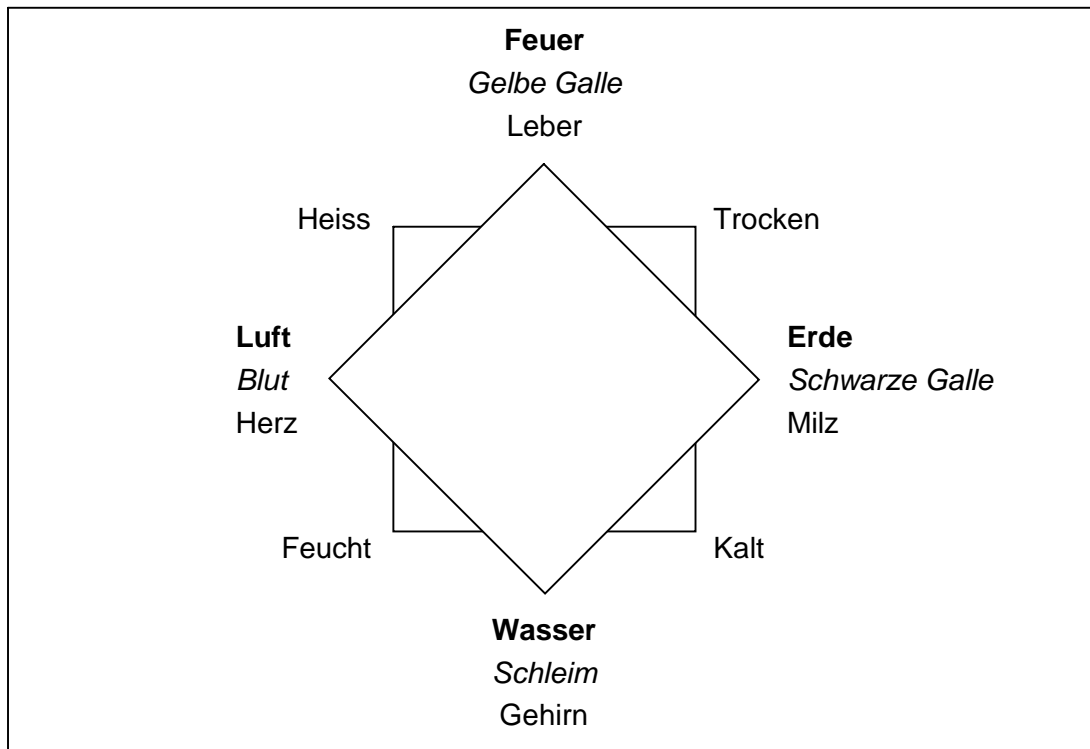


Abb. 2.1: Viersäftelehre.

Die vier Elemente, aus denen die Materie durch unterschiedliche Mengenverhältnisse zusammengesetzt ist, bilden das vordere Quadrat. Analog werden die vier Säfte mit ihrem Ursprung im Organismus angegeben. Das hintere Quadrat bilden die zwei Eigenschaften, die jedes Element bzw. jeden Saft näher beschreiben (siehe LEUENBERGER, 1980).

Im 12. Jahrhundert wurde das diagnostische Verfahren der Untersuchung von Aderlassblut (Hämatoskopie) durch den Salerner Arzt MAURUS weiterentwickelt, indem das Blut im flüssigen und geronnenen Zustand auf Farbe, Konsistenz, Temperatur, Geschmack und Geruch untersucht und der Gerinnungszeitpunkt bestimmt wurde (vgl.: SCHÄFFER, 1991). Bis ins 16. Jahrhundert wurde diese Hämatoskopie zur Diagnostik verwendet (ROTHSCHUH, 1974).

1527 kamen durch die Arbeiten von PARACELUS die ersten Zweifel an der alten Lehre von den Elementen, Qualitäten und vier Säften auf (vgl.: SCHÄFFER, 1991). Er lehnte die allgemeine Meinung, dass das Blut primär krank sein könnte, ab und argumentierte, dass die eigentliche Wurzel der Krankheit in den Organen läge, was wiederum zu einer Veränderung des Blutes führen würde (vgl.: ROTHSCHUH, 1974). Ebenso verwarf VAN HELMONT, der alle Lebensvorgänge als chemische Prozesse darstellte, die Säftelehre (vgl.: LIEBEN, 1935). Die Veröffentlichungen von PARACELUS und VAN HELMONT sorgten im 17. Jahrhundert bei vielen Alchimisten und Ärzten für ein verstärktes Beobachten und Experimentieren im Zusammenhang mit der Blutdiagnostik (ROTHSCHUH, 1974).

Die darauf folgenden neuen Erkenntnisse waren eng mit der Entwicklung und dem Fortschritt auf dem Gebiet der Mikroskopie verknüpft. So wurden z.B. 1656 von BORELLI die weißen und 1666 von MALPIGHI die roten Blutkörperchen entdeckt (vgl.: ASCHOFF et al., 1960). Trotz dieser Erkenntnisse zu den Blutbestandteilen und den Schwierigkeiten bei der Abgrenzung feinsten Farb- und Konsistenzunterschiede des Blutes wurde die Hämatoskopie weiterhin durchgeführt (SCHÄFFER, 1991). DE SOLLEYSSEL erweiterte sogar das Verfahren der Hämatoskopie dahingehend, dass damit auch auf das Temperament des Pferdes geschlossen werden konnte (DE SOLLEYSSEL, 1664). Noch 1786 wurde die Hämatoskopie bei der systematischen Tierseuchenbekämpfung in Pfalzbayern angewandt. So konnte WILL beobachten, dass das Blut von milzbrandinfizierten Tieren immer stark verdickt, schwarz und ohne Serumanteil war, was vor allem in klinisch zweifelhaften Fällen die Diagnose und Prognose sicherte (WILL, 1786).

Untersuchungen zu den Blutzellen

Im Jahre 1852 führte VIERORDT die erste quantitative Bestimmung der roten Blutkörperchen mit Hilfe einer langwierigen Methode, bei der ein Blutstropfen komplett ausgezählt wurde, durch (VIERORDT, 1852). Bereits 1855 wurde von CÄRMER die erste Blutkörperchen-Zählkammer beschrieben, die in den darauffolgenden Jahren viele Weiterentwicklungen erfuhr (vgl.: AUTENRIETH, 1974).

Die morphologische Erforschung der verschiedenen Blutzellen erfolgte in der Mitte des 19. Jahrhunderts noch am ungefärbten Nativpräparat. Dazu wurde die von KOCH 1877 publizierte Deckglasausstrichmethode und später die von JANCSÓ und ROSENBERGER (1896) beschriebene Objektträgerausstrichmethode verwendet. Beide Methoden werden auch heute noch angewandt (vgl.: BOROVIČZÉNY, 1974). Anfangs wurde ausschließlich Kapillarblut verwendet (FRANCKE, 1889). Nach Einführung der Venenpunktion durch GRAWITZ im Jahre 1902 wurde auch venöses Blut untersucht. Als Fixiermethode für die Präparate wurde von EHRlich 1877 die Hitzefixation eingeführt, die 1904 durch die von GIEMSA entwickelte chemische Fixierung mittels Methanol abgelöst wurde (vgl.: BOROVIČZÉNY, 1974). Durch die Fixierung gelang es, die Präparate anzufärben, so dass EHRlich 1880 die Leukozyten- und Erythrozytenarten mit Hilfe seiner Triacidfärbung und dem Nachweis der spezifischen Leukozytengranulationen differenzieren konnte (vgl.: AUTENRIETH, 1974). Zur Jahrhundertwende wurden in rascher Folge die bis heute üblichen panoptischen Färbemethoden publiziert (AUTENRIETH, 1974). Seitdem ist die Untersuchung des Differentialblutbildes in der medizinischen Diagnostik zur Routineanalyse geworden (BOROVIČZÉNY, 1974).

Die bisher durchgeführte Kammerzählung erforderte einen hohen Personal- und Zeitaufwand, so dass 1948 von LANGERKRANZ der erste praktisch nutzbare Blutkörperchen-Zählautomat entwickelt wurde, der mit einer photoelektrischen Methode arbeitete (vgl.: AUTENRIETH, 1974). Mit den ersten automatischen Blutzell-Zählgeräten konnten nur Erythrozyten und Leukozyten gezählt werden und die Verdünnungen erfolgten per Hand. Von diesen halbautomatischen Blutzell-Zählgeräten führte die Entwicklung weiter zu vollautomatischen

tischen Geräten, die Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten und Hämoglobin sowie später auch das Differentialblutbild bestimmen konnten (ROLEFF, 2004).

Untersuchungen zur klinischen Chemie des Blutes

BOYLE führte 1683/84 die erste physikalisch-chemische Blutuntersuchung durch. Seine Veröffentlichung der „Memoirs for the natural history of human blood“ (1684) beschäftigte sich ausschließlich mit der physikalisch-chemischen Blutuntersuchung (vgl.: AUTENRIETH, 1974). Diese Versuche wurden um 1720 von JURIN mit genaueren Verfahren weitergeführt und SCHWENCKE publizierte 1743 die erste Monographie des Blutes, in der seine eigenen Versuche sowie die von BOYLE und anderen Vorgängern zusammengefasst wurden (vgl.: ROTHSCHUH, 1974).

PARMENTIER und DEYEUX veröffentlichten 1796 mit „Memoire sur le sang“ die ersten genaueren chemischen Daten zu den Blutbestandteilen im gesunden und kranken Zustand. Des Weiteren wiesen sie einen Einfluss des Sauerstoffs auf die Blutfarbe nach (vgl.: SIEDLER, 1974). Zur gleichen Zeit wurde von FOURCROY Rinderblut untersucht, um die Absorption von Sauerstoff nachzuweisen. An Stelle des absorbierten Sauerstoffs fand er jedoch Kohlensäure im Blut (vgl.: LEUENBERGER, 1980). 1808 wurden durch BERZELIUS erstmalig Methoden der organischen Chemie für Blutuntersuchungen eingesetzt (vgl.: SIEDLER, 1974).

Diese ersten chemischen Blutanalysen wurden mit Vollblut durchgeführt, da angenommen wurde, dass die Wand der Blutkörperchen durchlässig sei und somit die Zellen dieselbe Zusammensetzung hätten wie das sie umgebende Plasma. Im Blut wurden Wassergehalt, Trockengewicht der Blutkörperchen, Albumin, Fibrin, Fette, Salze und Extraktivstoffe bestimmt (LIEBEN, 1935). SCHMIDT beobachtete 1850, dass die Zusammensetzung des Zell- und Blutplasmas nicht identisch ist, benötigte jedoch für diese Untersuchungen 300 ml Blut (vgl.: LEUENBERGER, 1980). Auch die ungleiche Verteilung der Alkalisalze im Blut, d.h. Kalium vorwiegend in den Zellen und Natrium im Serum, wurde von SCHMIDT zuerst beobachtet (vgl.: LIEBEN, 1935).

1878 lieferte VON LIEBIG genaue Blutanalysen mit quantitativen Angaben zu den Inhaltsstoffen der Blutasche. Des Weiteren stellte er bei seinen Untersuchungen an Menschen und Tieren fest, dass der Natriumgehalt des Blutes nahrungsunabhängig ist. Auch versuchte er, die Bedeutung des Kochsalzes für den Organismus zu ergründen und erklärte: *„Das Kochsalz dient im Organismus zur Vermittlung der allgemeinsten Vorgänge, ohne durch seine Bestandtheile Antheil an dem Bildungsprocess zu nehmen.“* (VON LIEBIG, 1878: S. 312). HOPPE-SEYLER lieferte 1883 eine genaue Darstellung der Nachweismethoden und quantitativen Bestimmung der Seruminhaltsstoffe. Diese gestalteten sich als sehr zeitaufwändig und für die meisten Methoden waren größere Blutvolumina erforderlich. So erfolgte z.B. die Zuckerbestimmung durch Kochen und Ausfällen mit Essigsäure und nachfolgender Filtration, wonach das Filtrat auf Zucker geprüft wurde. *„Selten sind diese Flüssigkeiten so reich an Zucker, dass das Filtrat nach Ausfällung der Eiweißstoffe rechtsseitige Circumpolarisation zeigt. Will man durch dieses den Zucker nachweisen, so ist es am besten eine größere Quantität der Flüssigkeit zu prüfen.“* (HOPPE-SEYLER, 1883: S. 417).

Bevor das Blut einer chemischen Analyse unterzogen werden konnte, waren die gesuchten Substanzen aus früheren Versuchen und anderen Zusammenhängen schon bekannt. So wurde z.B. der Nachweis der Glukose im Blut nur möglich, weil 1660 von GLAUBER Traubenzucker in getrockneten Trauben (Rosinen) und im Honig nachgewiesen wurde. MARKGRAF hat 1747 den in Rosinen enthaltenen Zucker in reinem Zustand extrahieren können und den nächsten bedeutsamen Schritt unternahm KIRCHHOFF, indem er 1811 Traubenzucker durch Abbau von Stärke mit Hilfe von Schwefelsäure gewann. Das optische Drehungsvermögen der Glukoselösungen wurde zuerst von BIOT bei seinen Untersuchungen zur optischen Aktivität von chemischen Lösungen gemessen (vgl.: LIEBEN, 1935). 1923 veröffentlichten die Dänen HAGEDORN und JENSEN die titrimetrische Blutzuckerbestimmung, die mit Kapillarblut durchgeführt werden konnte, so dass keine größeren Blutmengen mehr erforderlich waren (vgl.: LEUENBERGER, 1980). In ähnlicher Verfahrensweise wurden im Laufe der Zeit auch die anderen Blutinhaltsstoffe nachgewiesen.

Der technische Fortschritt betraf auch die Materialien zur Blutentnahme und die Geräte zur Blutuntersuchung. Die erste Zentrifuge wurde 1852 beschrieben, aber erst gegen Ende des 19. Jahrhunderts wurde diese auch in medizinischen Laboratorien verwendet. Bis dahin wurde die Trennung der flüssigen und festen Anteile des Blutes durch Dekantieren erreicht (LEUENBERGER, 1980).

Ab 1930 gewannen chemische Blutuntersuchungen immer mehr an Bedeutung. Durch die Entwicklung der elektronischen Datenverarbeitung wurde eine Automatisierung der Analysemethoden möglich, die wiederum für eine Bewältigung des gestiegenen Probenaufkommens sorgte. In den späten sechziger Jahren wurden die ersten Automaten ins klinisch-chemische Laboratorium eingeführt und bald darauf begannen verschiedene Unternehmen mit dem Bau von Analysegeräten, die zum Teil auf ganz verschiedenen Prinzipien beruhen (LEUENBERGER, 1980). So gibt es Automaten, die nur mit Methoden der Trockenchemie arbeiten wie z.B. die Reflotron[®]-Systeme der Firma Roche (Basel) und die Ektachem[®]-Geräte der Firma Kodak (New York) (SONNTAG, 1995). Andere Automaten nutzen Spektralphotometer, Flammenphotometer, Atomabsorptionsspektrometer oder andere photometrische Methoden zur Analyse der Blutproben (STÖBER und GRÜNDER, 1990). Derzeit können aus Blut, Urin, Gewebe und anderen Proben mit Hilfe modernster Analysesysteme und neu entwickelter Reagenzien weit über 2000 Parameter untersucht werden (RICHTER- MAIERHOFER, 2006).

2.2 Relevanz der Blutuntersuchung beim Rind

Zur Erforschung des Blutes und seiner Funktionen wurden schon frühzeitig in der Geschichte Blutentnahmen beim Rind durchgeführt, da hier problemlos die dafür notwendigen größeren Blutmengen gewonnen werden konnten. Dies diente jedoch hauptsächlich der Klärung wissenschaftlicher Fragestellungen und weniger der Diagnostik (siehe Kapitel 2.1).

In den letzten Jahren ist in Folge der Entwicklung in Tierzucht, -haltung und -fütterung die Milchproduktion stetig gestiegen (GÄBEL, 2007). Während eine Kuh zu Beginn des 19. Jahrhunderts noch weniger als 1000 Liter Milch im Jahr gab, sind heute Mengen von 8000 bis 12000 Litern pro Jahr nicht ungewöhnlich, wobei pro Liter Milch 500 Liter Blut durch das Euter fließen müssen (MARTENS und LUY, 2008). Diese Steigerung der Milchleistung bedingte eine ansteigende Belastung des Stoffwechsels (GÄBEL, 2007; MARTENS und LUY, 2008). Demzufolge stieg durch eine hohe Milchleistung auch das Risiko, an Plazentareten-tion, Ovarialzysten, Mastitis, Klauenerkrankungen, Milchfieber, Ketose und Labmagenverla-gerung zu erkranken (FLEISCHER et al., 2001). Während früher die Blutuntersuchung vor al-lem beim erkrankten Einzeltier angewendet wurde, kam in den späten 1960-iger Jahren die Testung des metabolischen Profils im Rinderblut auf, um die Stoffwechsellage zu überwachen (PAYNE und PAYNE, 1987). Durch den Einzug der Analyseautomaten in klinische Laboratorien konnten größere Probenanzahlen und mehr Blutparameter in kürzerer Zeit und mit geringeren Kosten untersucht werden (LEUENBERGER, 1980). Die Blutentnahme erfolgte aus der Hals-, Euter- oder Schwanzvene, wobei letztere Entnahmestelle zunächst auf Grund der häufigen Verschmutzungen und des angenommenen Stresses für die Kuh nicht üblich war (PAYNE und PAYNE, 1987). Erst in den achtziger Jahren wurde die Praktikabilität der Blutentnahme aus der Schwanzvene in der Rinderpraxis dargelegt (DELORME, 1982). Inzwi-schen wurde diese Methode in der Rinderpraxis etabliert.

Heutzutage hat die Blutuntersuchung beim Rind drei Funktionen, nämlich

1. Kontrolle und Überwachung von Tierseuchen,
2. Herdendiagnostik im Rahmen der Bestandsbetreuung und
3. Einzeltierdiagnostik im Krankheitsfall.

Nachfolgend wird auf die Herdenbestandsbetreuung, das Stoffwechselprofil und einzelne Parameter dieses Profils näher eingegangen.

2.2.1 Herdenbestandsbetreuung

In Deutschland werden seit über 20 Jahren Konzepte für die tierärztliche Bestandsbetreuung von Rinderbetrieben entwickelt und umgesetzt. Dabei handelt es sich in der klassischen Form um prophylaktische Maßnahmen gegen Infektionskrankheiten und Parasitosen, ein umfassendes Tiergesundheitsmonitoring und die erforderlichen Behandlungen auf Einzeltierebene (MANSFELD et al., 2007). So wurden beispielsweise bereits in den siebziger Jahren in der DDR beim Übergang zu industriemäßigen Produktionsmethoden auf dem Gebiet der Milcherzeugung regelmäßige Kontrolluntersuchungen des Futters und des Stoffwechsels ausgewählter Tiergruppen durchgeführt. Auf diese Weise konnten Stoffwechselstörungen frühzeitig erkannt werden, so dass hohe Produktionsleistungen mit geringen Tierverlusten auch bei der industriemäßigen Milchproduktion mit Tierkonzentrationen von 1000 oder sogar 2000 Milchkühen möglich waren (SCHÄFER und ROSSOW, 1975). Seit Anfang der neunziger Jahre wird die integrierte tierärztliche Bestandsbetreuung (ITB) in der Rinderpraxis etabliert, bei der dem Tierarzt zusätzliche Kontrollfunktionen zukommen, indem er in den Produktionsprozess und den Informationsfluss des jeweiligen Betriebes integriert wird (MANSFELD et al., 2007). Stoffwechselüberwachungen mit Hilfe von Blutproben sind dabei Teil der gesamten Bestandsanalyse (STÖBER, 1990; GRÜNDER, 1991; MULLIGAN et al., 2006).

Zur Überwachung der Stoffwechsellage einer Herde wird eine ausreichende Anzahl an Blutproben gewonnen, wobei das Minimum bei zwölf Kühen je Herde liegen sollte (OETZEL, 2004). Auf Grund der hohen Kosten für die Analyse einer großen Anzahl von Blutproben werden häufig Poolproben für die Stoffwechselüberwachung gewonnen (TORNQUIST und VAN SAUN, 1999). Dabei werden mehrere Blutproben zu einer Probe gemischt, die dann analysiert wird (BENDER und STAUFENBIEL, 2003). Inzwischen setzt sich jedoch die Ansicht durch, für Stoffwechselkontrollen in Rinderherden Einzeltieranalysen durchzuführen, da bei der Verwendung von Poolproben Probleme mit gegenläufigen Veränderungen einzelner Parameter, fehlender Normalverteilung und der genetischen Variabilität der Tiere auftreten können (FÜRLL, 2005). Poolproben sollten daher nur noch zur Erkennung von Krankheiten mit geringer Prävalenz verwendet werden, da vor allem molekularbiologische Nachweismethoden sehr kostenaufwendig sind. Einzelproben werden hier erst analysiert, wenn eine Poolprobe positiv ist, wodurch Kosten gesenkt werden (WOLFGANG, 2005).

2.2.2 Stoffwechselprofil

Pionierarbeit bei der Untersuchung des metabolischen Profils leisteten PAYNE et al. (1970) am *Compton Institute of Animal Health* (UK). Der sogenannte „Compton metabolic profile test“ beinhaltete Indikatoren des Energie-, Protein-, Mineral- und Elektrolyt-Stoffwechsels (PAYNE et al., 1970). Seitdem wurde die Methode angepasst und modifiziert und wird nun in vielen Ländern in der Bestandsbetreuung genutzt (BRYDL et al., 2008). Die Ergebnisse geben nützliche Informationen zum metabolischen, nutritiven und reproduktiven Zustand der

Herde (SEIFI und BAZARGANI, 2003) und können auch als diagnostische Hilfe im Bestand verwendet werden (VAN SAUN, 2000).

Die Blutuntersuchung zur Stoffwechselüberwachung kann zum Zweck der Vorbeuge in unauffälligen Beständen und zu diagnostischen Zwecken in Problembeständen durchgeführt werden (FÜRLL, 2005). Da die verschiedenen Laktationsstadien der Kühe unterschiedliche Stoffwechsellagen bedingen, wird im Rahmen der Stoffwechselüberwachung eine repräsentative Anzahl des jeweiligen Leistungsniveaus beprobt (PAYNE und PAYNE, 1987). Es handelt sich dabei im Regelfall um die Gruppe der Milchkühe zu Laktationsbeginn, die Gruppe der Milchkühe in der Laktationsmitte und die Gruppe der Trockensteher (KELLY, 1996).

Im Mittelpunkt der Stoffwechselkontrollen bei der tierärztlichen Bestandsbetreuung stehen Bestandserkrankungen, die auftreten können oder bereits aufgetreten sind (FÜRLL, 2005). Besonders für die Diagnose und das Herdenmanagement von peripartalen Krankheiten ist die Untersuchung des metabolischen Profils sinnvoll (HOFF und DUFFIELD, 2003). In Tabelle 2.1 sind die Blutparameter aufgelistet, die sich bei bestimmten Herdenproblemen zur Diagnostik anbieten.

Tab. 2.1: Wichtige Stoffwechselkreise und die korrespondierenden Bestandserkrankungen bei Milchkühen (nach FÜRLL, 2005).

Stoffwechselkreis	Häufige Bestandserkrankungen
Energie- (Kohlenhydrat-, Fett-) und Eiweißstoffwechsel	Ketose, Fettmobilisationssyndrom, Labmagenverlagerung
Säure-Basen-Haushalt	direkt: Pansenazidose, Pansenalkalose indirekt: Euter- und Klauenentzündungen, Kalziumhaushalt
Mineralstoffwechsel: Na, K, Ca, P, Mg	Ca/P: Gebärparese, Rachitis/Osteomalazie Mg: Tetanie Na/K: Fruchtbarkeitstörungen, Mastitiden
Spurenelementstoffwechsel: Mn, Cu, Se, Co, Zn u.a.	Fruchtbarkeits- und Bewegungsstörungen, geringere Resistenz, Weißfleischigkeit, Anämien, Immunsuppression, Hautveränderungen u.a.
Vitaminhaushalt: Vitamin A, D, E, C u.a.	Fruchtbarkeitsstörungen, Weißfleischigkeit, Hautveränderungen, Gebärparese u.a.

2.2.3 Parameter

In diesem Unterkapitel werden ausgewählte Parameter des Energie-, Eiweiß- und Mineralstoffwechselkreises (siehe Tab. 2.1) näher beschrieben, welche im Rahmen der Erhebung des Stoffwechselprofils bei Milchkühen regelmäßig angefordert werden.

Aspartat-Amino-Transferase (AST):

Dieses Enzym befindet sich intrazellulär im Zytoplasma und den Mitochondrien und kommt beim Rind ubiquitär, aber vorwiegend im Skelett- und Herzmuskel und in der Leber vor (KELLER, 1971; DIRKSEN, 1990). Aktivitätserhöhungen im Plasma zeigen Zell- und Gewebeschädigungen bzw. Zellzerstörungen an (BAUMGARTNER und SCHLERKA, 1983). Trotz der nicht vorhandenen Organspezifität deuten Aktivitätssteigerungen der AST auf Leber- und Muskelerkrankungen hin (KRAFT und DÜRR, 2005c). In der Bestandsdiagnostik wird die AST im Zusammenhang mit anderen leberspezifischen Parametern zur Beurteilung der Leberfunktion herangezogen. Eine Erhöhung der AST-Aktivität in der peripartalen Periode ergibt sich aus der Schädigung der Leberzellen bei fortschreitender Verfettung der Leber (REID und COLLINS, 1980) und durch den Abbau von Muskeleiweiß bei einer negativen Energiebilanz (VAN DEN TOP et al., 1995a; STEEN et al., 1997). Ein Anstieg über 1000 U/l (16670 nkat/l) ist als prognostisch ungünstig zu bewerten (GRÜNDER, 1991).

Bei Fleischrindern konnten höhere Enzymaktivitäten in den Mitochondrien nachgewiesen werden als bei Milchrindern (ARAI et al., 2003). Die AST-Aktivität steigt mit zunehmendem Alter an und ist abhängig von Reproduktionsstatus und Laktation (PETERSON und WALDERN, 1981; DOORNENBAL et al., 1988). Zusätzlich konnten tageszeitabhängige Schwankungen beobachtet werden, die eine Aktivitätssteigerung um bis zu 21% erzeugen können (HAGEMEISTER und UNSHELM, 1968).

γ -Glutamyl-Transferase (γ -GT):

Die γ -GT ist ein ubiquitäres Enzym, das membrangebunden vorwiegend in Euter-, Nieren-, Gallengangs- und Darmepithelien vorkommt (DIRKSEN, 1990). Allerdings erzeugen nur hepatobiliäre Erkrankungen eine Aktivitätssteigerung im Blut, so dass die γ -GT als leberspezifisch angesehen werden kann (GRÜNDER, 1991; KRAFT und DÜRR, 2005c). Ein signifikanter Anstieg der γ -GT-Aktivität kann vor allem beim Leberegelbefall beobachtet werden, der vor allem durch die Egelwanderung und die Zerstörung der Gallengangsepithelien verursacht wird (LOTFOLLAHZADEH et al., 2008). Generell ist eine spezifische Erhöhung bei Hepatopathien mit intra- oder extrahepatischer Cholestase zu finden. Eine unspezifische Erhöhung kommt bei Erkrankungen unter Mitbeteiligung der Leber wie z.B. Enteritiden und Pankreatitiden vor (KRAFT und DÜRR, 2005c).

In der Humanmedizin konnte bei Patienten mit Lebererkrankungen eine Form der γ -GT mit abweichender Molekularmasse im Blut nachgewiesen werden, so dass durch eine Elektrophorese der γ -GT zwischen extrahepatischem und intrahepatischem Ikterus unterschieden werden kann (WENHAM et al., 1985). Die Untersuchung der γ -GT-Isoenzyme hat

dahingegen nur limitierten klinischen Nutzen, da bisher keine direkten Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Erkrankungen und den Isoenzymen nachgewiesen werden konnten (NEMESÁNSZKY und LOTT, 1985).

Glutamat-Dehydrogenase (GLDH):

Dieses Enzym kommt beim Rind vorwiegend in der Leber und zwar intrazellulär in den Mitochondrien vor (DIRKSEN, 1990). Geringe Aktivitäten sind beim Rind auch in Niere, Hirn und Milz nachweisbar (KELLER, 1971). Die GLDH gilt als leberspezifisch, so dass Aktivitätserhöhungen im Plasma auf Zellschädigungen bzw. Zellzerstörungen der Leber hindeuten (KLOENE, 1974; BAUMGARTNER und SCHLERKA, 1983). Ein Anstieg über 200 U/l (3334 nkat/l) ist dabei als prognostisch ungünstig zu bewerten (GRÜNDER, 1991). Beim Hund zeigte sich, dass alleinige GLDH-Erhöhungen auf geringgradige Leberschäden hinweisen. Zusätzlich ließ sich die GLDH bei dieser Tierart durch hohe Glukosegehalte induzieren (MÜHLBERGER und KRAFT, 1994). Die höchste Aktivität der GLDH findet sich im zentrilobulären Bereich des Leberläppchens, weshalb die GLDH bei sekundären Hepatopathien wie z.B. Gallestauung sehr empfindlich reagiert (KRAFT und DÜRR, 2005c). Vorübergehende Erhöhungen der GLDH sind beim Rind ohne besondere pathologische Wertigkeit, da es sich um ein sehr empfindliches Enzym handelt (BAUMGARTNER und SCHLERKA, 1983; KRAFT und DÜRR, 2005c). Die GLDH ist jedoch auf Grund ihrer Organspezifität zur Abgrenzung von Nierenkrankheiten gut geeignet (DIRKSEN, 1990; SCHMIDT et al., 1992).

Bilirubin:

Bilirubin entsteht vor allem aus dem Abbau von Hämoglobin und zu einem geringen Teil aus Myoglobin, Zytochromen und Katalasen. Im retikuloendothelialen System wird dabei zunächst Bilirubin I gebildet, welches wasserunlöslich ist und zum Transport im Blut an Albumin gebunden wird. In der Leber wird Albumin abgespalten und Bilirubin I mit Glukuronsäure zum wasserlöslichen Bilirubin II (Bilirubin-Diglukuronid) konjugiert, das mit der Galle in den Dünndarm ausgeschieden wird (KRAFT und DÜRR, 2005c).

Die Bestimmung des Gesamtbilirubins im Serum dient vor allem der Feststellung von Leberfunktionsstörungen, weil diese beim Rind überwiegend anikterisch verlaufen und sich damit der rein klinischen Diagnostik weitgehend entziehen (GRÜNDER, 1991). Beim prähepatischen (hämolytischen) und posthepatischen (cholestatischen) Ikterus sind die Bilirubinwerte ebenfalls erhöht (KRAFT und DÜRR, 2005c). Bei Patienten mit hepatischem oder posthepatischem Ikterus kann neben Bilirubin I und II zusätzlich Delta-Bilirubin im Serum gefunden werden, welches durch eine nichtenzymatisch vermittelte kovalente Kopplungsreaktion zwischen Bilirubin II und Albumin entsteht und nicht über die Leber oder die Niere ausgeschieden, sondern langsam verstoffwechselt wird (THALER et al., 2008). Ferner steigt der Gesamtbilirubingehalt im Serum bei Nahrungskarenz an (Inanitionsikterus), da bei stimulierter Lipolyse die Freien Fettsäuren und Bilirubin I um dieselben Transportproteine in den Hepatozyten konkurrieren (KRAFT und DÜRR, 2005c). Ein leichter Anstieg des Serumbilirubinspiegels ist auch in den Wochen um den Kalbetermin zu beobachten (DIRKSEN, 1990).

Harnstoff:

Der Harnstoffgehalt im Serum dient in erster Linie zur Beurteilung der Nierenfunktion, da dieser bei Niereninsuffizienz stark erhöht ist (KRAFT und DÜRR, 2005a). Die Konzentration im Serum ist vom Rohproteingehalt der Nahrung abhängig (STÖBER und GRÜNDER, 1990). Bei fütterungsbedingter Überversorgung kann Harnstoff bis in den Grenzwertbereich von 8 mmol/l ansteigen, während er im Hungerzustand absinkt (GRÜNDER, 1991). Die Proteine werden im Pansen durch mikrobielle Enzyme zu Ammoniak abgebaut, welches den Pansenbakterien und -protozoen als wichtigste Stickstoffquelle für die Eiweißsynthese dient. Im Überschuss gebildetes Ammoniak gelangt mit dem Pfortaderblut in die Leber, wo im Harnstoffzyklus aus Ammoniak Harnstoff synthetisiert wird (KRAFT und DÜRR, 2005a). Dieser wird mit dem Harn ausgeschieden und ein kleiner Teil gelangt über den ruminohepatischen Kreislauf zurück in den Pansen (DIRKSEN, 1990). Daher eignet sich Harnstoff zur klinischen Diagnostik der Nierentätigkeit (STÖBER und GRÜNDER, 1990; GRÜNDER, 1991). Ist diese beeinträchtigt, steigt der Gehalt harnpflichtiger Substanzen im Blut an (FROMM und HIERHOLZER, 2000). Eine derartige Urämie kann prärenal z.B. bei mangelnder Flüssigkeitszufuhr, renal z.B. bei Nierenkrankheiten oder postrenal z.B. bei Harnstau verursacht werden (GRÜNDER, 2006). Ein weiterer Einflussfaktor auf die Harnstoffkonzentration im Blut ist der Energiegehalt des Futters, da bei Energiemangel die Rückresorption von Harnstoff in den Nieren und dessen Rücktransport über den ruminohepatischen Kreislauf in den Pansen steigt (OCHRIMENKO et al., 1998). In der Bestandsdiagnostik wird der Harnstoffgehalt zur Beurteilung des Eiweiß- und Energiestoffwechsels häufig in Milchproben bestimmt (REKSEN et al., 2002).

Es konnten tageszeitabhängige Schwankungen der Harnstoffgehalte im Blut mit leichten Anstiegen nach der Fütterung nachgewiesen werden (HAGEMEISTER und UNSHELM, 1970). Des Weiteren korreliert die Harnstoffkonzentration positiv mit der Milchmenge und negativ mit dem Alter des Rindes (KITCHENHAM et al., 1975). Bei DOORNENBAL et al. (1988) stiegen dahingegen die Werte mit dem Alter des Rindes an. Ferner liegt der Serumgehalt bei laktierenden Kühen höher als bei nichtlaktierenden (KITCHENHAM et al., 1975; DOORNENBAL et al., 1988). Auch jahreszeitliche Einflüsse auf den Harnstoffgehalt im Blut konnten bei Mutterkühen während der Weidezeit nachgewiesen werden (OCHRIMENKO et al., 1998).

Cholesterin:

Cholesterin wird vor allem in der Leber synthetisiert und ist ein essentieller Bestandteil von Zellmembranen und Lipoproteinen sowie ein Grundstoff für die Synthese der Gallensäuren und Steroidhormone (RIESEN, 2005). Bei Wiederkäuern ist die Cholesterinkonzentration im Blut vorwiegend abhängig von der Synthese im Darm. Die Ausscheidung erfolgt zum überwiegenden Teil über die Gallensäuren mit dem Darminhalt (KRAFT, 2005c).

Eine Abnahme des Cholesteringehalts im Blut erfolgt bei akuten entzündlichen und degenerativen Lebererkrankungen sowie Darmentzündungen (DIRKSEN, 1990; KRAFT, 2005c). Erhöhte Werte werden z.B. bei Gallengangverschluss, chronischer Fasziolose, Ketose mit Leberbeteiligung und lymphatischer Leukose gemessen (DIRKSEN, 1990).

Der Cholesteringehalt im Blut ist altersabhängig und sinkt mit zunehmendem Alter ab (FREITAG, 1964; PETERSON und WALDERN, 1981). Des Weiteren wird die Konzentration durch Trächtigkeit und Laktation beeinflusst (FREITAG, 1964; PETERSON und WALDERN, 1981; DIRKSEN, 1990), wobei der Cholesteringehalt mit steigender Milchleistung absinkt (FREITAG, 1964). Zusätzlich hat die Futterzusammensetzung einen Einfluss auf den Serumcholesteringehalt (FREITAG, 1964; DIRKSEN, 1990), jedoch nicht die Futteraufnahme, wie die nur geringen Schwankungen im Tagesprofil zeigten (FREITAG, 1964; UNSHELM, 1969a). So eignet sich dieser Parameter auch zur Einschätzung der Rohfaserversorgung, da Rohfasermangel in Folge einer pH-Verschiebung im Pansen in den azidotischen Bereich zu einem Abfall der Acetatkonzentration führt. Damit kommt es zu einem niedrigeren Cholesteringehalt im Blut, da Acetat ein wichtiger Baustein des Cholesterins ist (OCHRIMENKO et al., 1998).

Gesamteiweiß:

Eiweiße haben im Körper verschiedenartige Funktionen. Sie sorgen für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes, bedingen einen Teil der Pufferkapazität des Blutes, sind an den Abwehrvorgängen beteiligt und dienen dem Transport von Stoffen sowie als Reservepool für Aminosäuren (LÖSCH et al., 2000). Mittels elektrophoretischer Trennung lassen sich im Gesamteiweiß Albumin, α -, β - und γ -Globuline unterscheiden (STÖBER und GRÜNDER, 1990). Mit Ausnahme der Immunglobuline wird das gesamte Protein in den Hepatozyten synthetisiert (KRAFT und DÜRR, 2005b).

Eine Erhöhung der Proteinkonzentration im Blut tritt z.B. bei Exsikkose, Infektionskrankheiten, Entzündungen und Neoplasien auf. Erniedrigte Proteingehalte finden sich zum einen bei verminderter Synthese, wie z.B. bei Hepatopathien, Enteropathien, Malassimilationssyndrom und Unter- bzw. Fehlernährung, und zum anderen bei Proteinverlusten, wie z.B. bei Proteinurie, Blutverlusten und exsudativer Enteropathie oder Dermatitis (STÖBER und GRÜNDER, 1990; KRAFT und DÜRR, 2005b).

In vivo ist der Proteingehalt von verschiedenen Einflussgrößen abhängig. So haben junge Tiere einen geringeren Serumproteingehalt als erwachsene (KRAFT und DÜRR, 2005b), wobei der Gehalt mit zunehmendem Alter ansteigt (DOORNENBAL et al., 1988; STÖBER und GRÜNDER, 1990). Des Weiteren zeigt sich eine Abhängigkeit vom Reproduktionsstatus, da die Werte bei Trockenstehern höher liegen als bei laktierenden Kühen (PETERSON und WALDERN, 1981). Bei Milchkühen fällt der Serumalbumingehalt zur Zeit des Kalbens ab und erreicht erst innerhalb der folgenden drei Monate wieder seinen Ausgangswert (STÖBER und GRÜNDER, 1990). Zusätzlich konnten individuelle und tagesabhängige Unterschiede im Proteingehalt des Blutes nachgewiesen werden (UNSHELM, 1969b). Auf Grund der geringen tageszeitabhängigen Schwankungen wird ein Einfluss des Fütterungszeitpunktes ausgeschlossen (UNSHELM, 1969b; STÖBER und GRÜNDER, 1990).

β-Hydroxybuttersäure (BHBS):

Zur Beurteilung der Energieversorgung von Rindern bietet sich unter anderem die Bestimmung der BHBS an (WHITAKER, 1996; VAN SAUN, 2000). Die BHBS gehört zusammen mit Azeton und Azetessigsäure zu den Ketonkörpern (THOMAS, 2005a), wobei sie mit ca. 80% den Hauptanteil der Ketonkörper im Blut bildet (KRAFT, 2005b). Voraussetzungen für die Entstehung von Ketonkörpern beim Rind (Ketogenese) sind eine gesteigerte Lipolyse, ein niedriges Insulin/Glukagon-Verhältnis sowie niedrige Konzentrationen an Malonyl-CoA (HOLTENIUS und HOLTENIUS, 1996). In Folge gesteigerter Lipolyse kommt es zu einem erhöhten Anfall von Acetyl-CoA, welches intramitochondrial in der Leber zu Azetoazetat und β-Hydroxybuttersäure umgewandelt wird. Auch in der Pansenwand kann abhängig von der Fütterung β-Hydroxybuttersäure synthetisiert werden (HERDT, 2000). Die Ketonkörper fungieren in verschiedenen Organen, vor allem aber in der Muskulatur, als Energieträger (HOLTENIUS und HOLTENIUS, 1996).

Eine erhöhte Konzentration von Ketonkörpern im Blut (>1200 µmol/l) ist ein Zeichen für die negative Energiebilanz (MCINTOSH, 1944; HERDT, 2000). So lange keine manifeste Erkrankung vorliegt wird daher von „subklinischer Ketose“ gesprochen (STÖBER, 2006). Die Stoffwechselkrankheit der Ketose bzw. Hyperketonämie wird diagnostiziert über das klinische Erscheinungsbild, wie z.B. Inappetenz, Milchrückgang, Mattigkeit und nervöse Erscheinungen und den Gehalt an Ketonkörpern, Freien Fettsäuren und Glukose im Blut (MCINTOSH, 1944; HERDT, 2000; LARSEN und NIELSEN, 2005). HOLTENIUS und HOLTENIUS (1996) unterscheiden dabei die hypoglykämisch-hypoinsulinämische Form der Ketose (Typ I) von der hyperglykämisch-hyperinsulinämischen Form der Ketose (Typ II). Während die erstgenannte Form in der Hochlaktation vorkommt, tritt die letztgenannte Form unmittelbar nach der Kalbung im Zusammenhang mit dem Fettmobilisationssyndrom der Leber auf (HOLTENIUS und HOLTENIUS, 1996).

Grundsätzlich können primäre und sekundäre Ketosen unterschieden werden. Die Ursache für primäre Ketosen kann stoffwechselbedingt durch eine ungenügende Glukoneogenese bei unzureichender Versorgung („Ketose der Armen“) oder bei verfetteten Tieren durch das Fettmobilisationssyndrom mit relativer Insulinresistenz („Ketose der Reichen“) sein. Eine weitere Ursache für die primäre Ketose kann alimentär sein durch die Aufnahme ketogener Futtermittel, wie z.B. die Blätter der Zuckerrübe oder Buttersäure in fehlgeordneter Silage (STÖBER, 2006; KRAFT, 2005b). Eine sekundäre Ketose entsteht häufig bei vielen Infektionskrankheiten (wie z.B. Metritis und Mastitis) durch die damit einhergehende negative Energiebilanz (STOKOL und NYDAM, 2005).

Freie Fettsäuren (NEFA):

Eine Erhöhung des Gehaltes an Freien Fettsäuren tritt dann ein, wenn in Folge eines Glukosemangels oder durch eine Störung der Glukoseutilisation eine zusätzliche Mobilisierung von Fettdepots zur Aufrechterhaltung des Energiebedarfs der peripheren Organe erforderlich ist (BRENNER und REINHARD, 1976). Die Konzentration der Freien Fettsäuren im Serum ist das Ergebnis des Fettabbaus und dient daher als Indikator für die Lipidmobilisation (JOHNSON und PETERS, 1993). Der NEFA-Gehalt im Blut zeigt eine hochsignifikante Laktationsdynamik

mit einem starken Anstieg kurz vor der Kalbung, einem Peak zum Partus und einer Plateauphase in den ersten zehn Tagen nach der Kalbung (STAUFENBIEL et al., 2008). Vier Wochen nach der Kalbung sinken die Plasma-NEFA-Gehalte wieder auf Werte ab, die vergleichbar zu denen vor der Kalbung sind (VAN DEN TOP et al., 1995b).

Die bei negativer Energiebilanz stark erhöhten NEFA-Gehalte führen zu einer erhöhten Produktion von Ketonkörpern oder Fett durch die Leber, was zu einer höheren Inzidenz von Stoffwechselerkrankungen wie Ketose, Fettleber und Labmagenverlagerung führt (VAN DEN TOP et al., 1995b; VAN SAUN, 2000). Milchkühe sind während der peripartalen Periode durch den hohen Energiebedarf des Fetus und die darauffolgende Milchproduktion, in Verbindung mit einem Rückgang der Trockenmasse-Aufnahme direkt vor dem Kalben, besonders anfällig für eine negative Energiebilanz (STOKOL und NYDAM, 2005). Der NEFA- und BHBS-Gehalt im Blut und der Leberfettgehalt verdeutlichen die Adaptation des Milchrindes an die negative Energiebilanz. In der Bestandsdiagnostik gelten als obere Referenzwerte für den NEFA-Gehalt im Blut 800 $\mu\text{mol/l}$ bis eine Woche *post partum* und 500 $\mu\text{mol/l}$ fünf Wochen *post partum* bis einen Tag *ante partum* (STAUFENBIEL et al., 2008).

Glukose:

Beim Rind werden die Nahrungskohlenhydrate in den Vormägen unter anderem zu Propionat abgebaut, welches intrahepatisch zur Glukoneogenese eingesetzt wird (STÖBER, 2006). Da die Blutglukose beim Rind über die Neogenese in der Leber entsteht, haben unter anderem Rasse, Alter, Geschlecht, Reproduktionsstatus und Futteraufnahme Einfluss auf die Höhe der Blut-Glukosewerte (DOORNENBAL et al., 1988; GRÜNDER, 1991).

Die metabolisierbare Energie der Futtermittel korreliert positiv mit der Blutglukose (PETERSON und WALDERN, 1981). Tageszeitabhängige Schwankungen der Glukose mit einem deutlichen Maximum zwischen 10 und 14 Uhr konnten nachgewiesen werden (HAGEMEISTER und UNSHELM, 1970). Die Glukosekonzentration im Blut ist bei der Geburt höher und fällt dann bis zu einem Jahr allmählich ab, wobei nach zwei Jahren kein Alterseffekt mehr nachgewiesen wird (DOORNENBAL et al., 1988). Dahingegen konnten andere Studien eine positive Korrelation zwischen Alter des Rindes und dem Glukosegehalt des Blutes ausmachen (KITCHENHAM et al., 1975; PETERSON und WALDERN, 1981). Zusätzlich zeigte sich eine negative Korrelation der Glukosegehalte mit der Milchleistung der Kühe (KITCHENHAM et al., 1975). ARAI et al. (2003) zeigten, dass Fleischrinder im Vergleich zu Milchrindern im Mittel höhere Glukosewerte haben.

Natrium:

In der extrazellulären Flüssigkeit ist Natrium das Kation mit der höchsten Konzentration und bestimmt entscheidend den osmotischen Druck (MARTENS, 1995; KRAFT und WIRTH, 2005). Der Natriumgehalt des Serums wird unabhängig von Über- oder Unterversorgung mit Hilfe des antidiuretischen Hormons (ADH) und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) weitgehend konstant gehalten. Eine diagnostische Verwendung im Hinblick auf den Versorgungsstatus ist daher praktisch unmöglich. Eine Natrium-Unterversorgung kann ins-

besondere bei ausschließlicher Weidehaltung laktierender Kühe auftreten, wobei zum Nachweis Harn- oder Speichelproben empfohlen werden (GRÜNDER, 1991; MARTENS, 1995). Änderungen des Natriumgehaltes im Serum oder Plasma zeigen eine Zu- oder Abnahme der Osmolalität im Extrazellularraum an (KRAFT und WIRTH, 2005) und werden durch renale oder digestive Fehlfunktionen oder bei extremen Nahrungsdefizit erzeugt (VAN SAUN, 2000). Auf Grund der hormonellen Regulationsmechanismen konnten tageszeitabhängige Schwankungen des Natriumgehaltes beobachtet werden (UNSHELM und RAPPEN, 1968; MARTENS, 1995). Ein Zusammenhang zwischen Natriumgehalt und Milchmenge oder Alter des Rindes konnte nicht festgestellt werden (UNSHELM und RAPPEN, 1968; KITCHENHAM et al., 1975).

Kalium:

Kalium ist im Körper vor allem im Intrazellularraum zu finden, wo es wesentlich den osmotischen Druck mitbestimmt. Das starke Konzentrationsgefälle zwischen Intra- und Extrazellularraum wird durch die Natrium-Kalium-ATPase der Zellmembran aufrechterhalten (KRAFT und WIRTH, 2005). Als Pflanzenfresser nehmen Wiederkäuer mehr Kalium auf, als zur Bedarfsdeckung notwendig ist. Die Plasma-Kaliumwerte werden jedoch weitgehend konstant gehalten, da über den Bedarf hinaus resorbiertes Kalium über die Nieren ausgeschieden wird und ein akuter Anstieg der Plasma-Kaliumkonzentration durch Insulin verhindert wird, indem es für einen verstärkten Transport von Kalium in den Intrazellularraum sorgt (MARTENS, 1995). Des Weiteren wird Kalium bei Natriummangel zu Gunsten des Natriums eliminiert (KRAFT und WIRTH, 2005). Es können tageszeitabhängige Schwankungen beobachtet werden, die mit einem deutlichen Anstieg am Vormittag und Absinken am Abend ein gegensätzliches Verhalten zu Natrium zeigen (UNSHELM und RAPPEN, 1968). Ein Zusammenhang zwischen der Kaliumkonzentration im Blut und der Milchmenge oder dem Alter des Rindes konnte nicht beobachtet werden (KITCHENHAM et al., 1975). Die Untersuchung des Kaliumgehaltes im Blut bietet sich unter anderem bei Erbrechen, Durchfall, Polyurie, Niereninsuffizienz und Hypoadrenokortizismus an (KRAFT und WIRTH, 2005). Des Weiteren kann ein Kaliumüberangebot im Futter Ursache für das Auftreten der Hypomagnesämie (Weidetetanie) sein, da Magnesium beim Rind nur in den Vormägen resorbiert wird und die Aufnahme in die Pansenepithelzelle durch die elektrische Triebkraft der Potenzialdifferenz an der Zellmembran erfolgt. Eine Erhöhung der Kalium-Konzentration in der Pansenflüssigkeit führt jedoch zu einer Depolarisierung dieser Membran, wodurch die Magnesium-Aufnahme reduziert wird (MARTENS und SCHWEIGEL, 2003).

Kalzium:

Kalzium ist bei Säugetieren an vielen physiologischen Prozessen im Körper beteiligt, wie z.B. bei der neuronalen Erregbarkeit, der Muskelkontraktion, der Integrität und Permeabilität der Zellmembran, der Knochenbildung und der Enzym-Aktivität (DOZE et al., 2008). Eine der Hauptfunktionen von Kalzium ist dessen Beteiligung am skelettalen Wachstum. Der Kalziumgehalt im Blut ist daher altersabhängig, und es kann beim Rind ein Absinken bis zu einem Alter von zehn Jahren beobachtet werden (DOORNENBAL et al., 1988).

Im Serum liegt Kalzium zu 55% als ionisiertes Kalzium (Ca^{2+}), zu 40% an Protein und zu 5% an organische Säuren gebunden vor, wobei der biologisch wirksame Anteil die ionisierte Form des Kalziums ist (KRAFT, 2005a). Die Bindung von Kalzium ist abhängig vom pH-Wert. So steigt bei Alkalose die Konzentration von Carbonationen im Blut, wodurch Kalzium in Form von Kalziumcarbonat gebunden wird und der Anteil des ionisierten Kalziums sinkt (DOZE et al., 2008). Des Weiteren wird der Blutkalziumspiegel von Rindern durch ihre Reproduktionsphase beeinflusst, da laktierende Kühe Kalzium für die Milchproduktion benötigen und so der Spiegel niedriger ist als bei Trockenstehern (PETERSON und WALDERN, 1981; DOORNENBAL et al., 1988). Die Analyse des Kalziumgehaltes um den Zeitpunkt der Kalbung herum dient als nützlicher Indikator für klinische oder subklinische hypokalzämische Zustände (MARTENS, 1995; VAN SAUN, 2000). Die Bestimmung von Kalzium ist daher zur sicheren Differentialdiagnose des Festliegens *ante* und *post partum* unverzichtbar (GRÜNDER, 1991).

Der Kalziumspiegel wird im Blut durch die Hormone Parathormon, Calcitriol und Calcitonin reguliert und weitgehend konstant gehalten (UNSHELM und RAPPEN, 1968; MARTENS, 1995; KAUNE, 2000). Eine nutritive Über- oder Unterversorgung kann daher mit Hilfe von Blutanalysen nicht nachgewiesen werden (BUHMANN und GRÜNDER, 1985; GRÜNDER, 1991; MARTENS, 1995, WHITAKER, 1996). Indirekt kann eine mangelhafte Kalziumresorption durch einen niedrigen Cholesterinwert, z.B. bei Rohfasermangel zu Weideauftrieb und damit einhergehender latenter Pansenazidose, erzeugt werden (OCHRIMENKO et al., 1998). Direkt lässt sich die Kalziumversorgung von Rindern mit einer Futtermitteluntersuchung oder der Untersuchung des Kotwassers prüfen (GRÜNDER, 1991).

Anorganisches Phosphat:

Phosphor kommt im Blut als organischer Ester, als Phospholipid und als anorganisches Phosphat vor (KRAFT, 2005a). Die Hauptfunktion des Phosphats liegt in der Beteiligung am skelettalen Wachstum, wodurch der Phosphatgehalt altersabhängig ist und mit zunehmendem Alter absinkt (KITCHENHAM et al., 1975; DOORNENBAL et al., 1988). Phosphat wird im Blut ähnlich wie Kalzium durch die Hormone Parathormon, Calcitriol und Calcitonin reguliert und weitgehend konstant gehalten (MARTENS, 1995; KAUNE, 2000). Der Plasmagehalt eignet sich daher nicht zur Einschätzung des Versorgungsstatus der Rinder, sofern nicht ein extremer Phosphatmangel vorliegt (GRÜNDER, 1991; MARTENS, 1995). Einen Einfluss auf den Phosphatgehalt im Rinderblut haben neben Reproduktionsstatus und Milchleistung auch der gegenwärtige Hormonstatus und Stress (PETERSON und WALDERN, 1981; OCHRIMENKO et al., 1998). Die Untersuchung des Phosphatgehaltes im Blut bietet sich zusätzlich zu anderen Blutparametern unter anderem bei festliegenden Milchkühen und Osteopathien an (ROSSOW und BOLDUAN, 1994).

2.3 Qualitätssicherung bis zum Labor (Präanalytik)

Definitionsgemäß werden unter dem Begriff der Präanalytik alle Prozesse zusammengefasst, die vor der eigentlichen Laboranalyse ablaufen (PLEBANI, 2006). Diese Prozesse beginnen bereits mit der Entscheidung, eine Laboruntersuchung zu veranlassen, und der Vorbereitung des Patienten für die Entnahme (SCHAUSEIL, 2006). Abbildung 2.2 verdeutlicht die Dimension der Präanalytik im gesamten Prozessweg einer Blutprobe. Zusätzlich wird deutlich, welche Teilbereiche des Prozessweges verbindlich oder nur freiwillig geregelt sind.

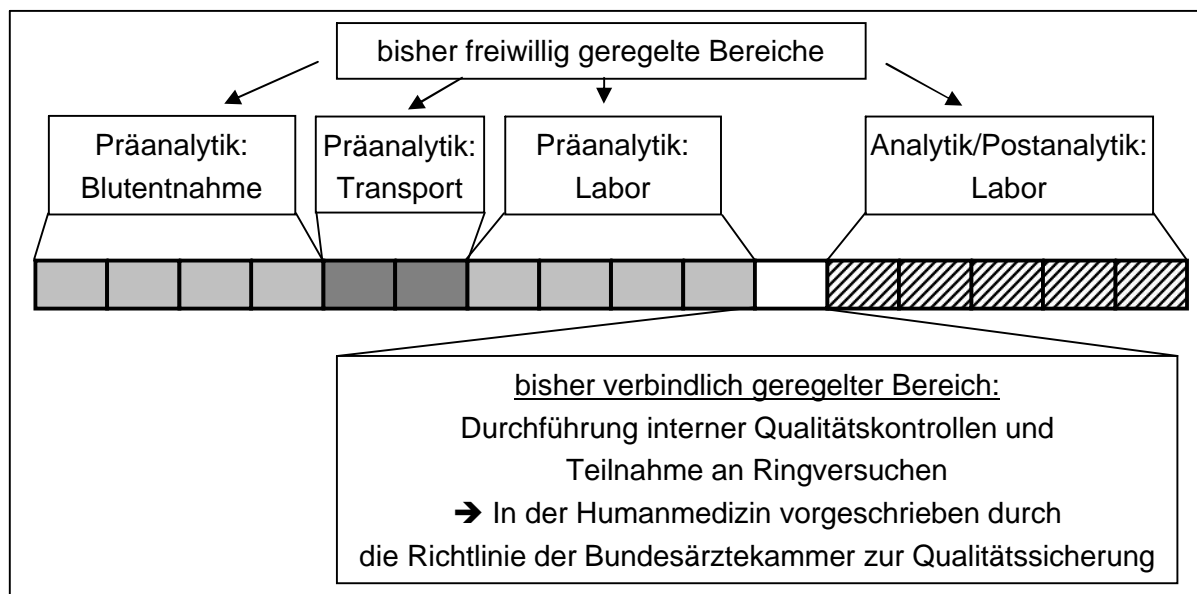


Abb. 2.2 Strukturierte Darstellung des Prozessweges einer Blutprobe (nach MÜLLER, 2005).

Die fortschreitende Automatisierung der Laboratorien erforderte standardisierte Arbeitsabläufe, eliminierte viele fehleranfällige Schritte und wurde so dem Drang nach Qualitätssicherung gerecht (KALRA, 2004). Historisch gesehen war die Qualitätssicherung schon immer ein wichtiger Punkt im Zusammenhang mit Produktionsvorgängen. So haben z.B. die Ägypter schon 1450 v.Chr. Methoden der Qualitätskontrolle entwickelt, um einheitliche Steine für ihre Pyramiden zu hauen (vgl.: EVANS und LINDSAY, 1996). Diese Art der Qualitätssicherung war informell. Heutzutage wurden allgemein gehaltene und spezielle Normen von der deutschen (DIN), der europäischen (EN) und der internationalen Normungsorganisation (ISO - International Organisation for Standardisation) entwickelt, die sich mit der Thematik der Qualität auseinandersetzen (siehe z.B. DIN EN ISO 9000:2005).

In diesem Kapitel werden einführend einige Begriffserklärungen zur Qualitätsthematik geliefert. Ferner wird auf die Einflussgrößen innerhalb der Präanalytik und deren Standardisierung eingegangen. Zusätzlich wird die Problematik hämolytischer Proben erläutert und die Stabilität ausgewählter Parameter der klinischen Chemie in Vollblut und Serum wiedergegeben.

2.3.1 Der Qualitätsbegriff im Zusammenhang mit der Blutuntersuchung

Der Begriff der Qualität hat verschiedene Bedeutungen. Abgeleitet vom lateinischen Wort „qualitas“ bezeichnet er ursprünglich nur die Beschaffenheit eines Objektes (GRAEBIG und VIETHEN, 1996). Zu dieser wertfreien Beschreibung führt der DUDEN (2006) als Synonyme auch Bezeichnungen wie Güte und Wert. Dadurch ist dieser Begriff nicht mehr wertfrei, sondern gibt den erreichten Grad einer vorgegebenen Zielvorstellung wieder (VIETHEN, 1995). Im Zusammenhang mit der Qualität eines Produktes oder Vorganges wird inzwischen häufig der Begriff des Qualitätsstandards genannt, der häufig synonym mit dem Begriff der Qualitätsnorm verwendet wird. Es handelt sich dabei um einen Wert, der primär nichts über die Qualität aussagt (SCHILLING et al., 1996).

Der Begriff der Qualitätssicherung ist zum Zweck der Vertrauensbildung in die Qualitätssfähigkeit einer Organisation zu verstehen (SCHILLING et al., 1996). Es handelt sich dabei um denjenigen Teil des Qualitätsmanagements, der dafür sorgt, dass Kunden oder dritte Parteien von der Qualität der Produkte einer Organisation überzeugt sind (GRAEBIG und VIETHEN, 1996). Zur Kontrolle der Qualitätssicherung in humanmedizinischen Laboratorien ist die Teilnahme an Ringversuchen durch die Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen vorgeschrieben (BUNDESÄRZTEKAMMER, 2003). Durch diese Richtlinie ist die Voraussetzung für die Vergleichbarkeit laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen gegeben (GUDER et al., 2002). Eine derartige Richtlinie und diese Art vorgeschriebener Ringversuche existiert in der Tiermedizin derzeit noch nicht¹. Ringversuche veterinärmedizinischer Laboratorien finden bisher nur auf Eigeninitiative der Laborleiter oder gebunden an humanmedizinische Laboratorien statt. So ist in Deutschland z.B. die Teilnahme an Ringversuchen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie e.V. (DGKL) und des Instituts für Standardisierung und Dokumentation e.V. (INSTAND) möglich. In den Niederlanden werden auch für veterinärmedizinische Labors Ringversuche angeboten, so z.B. vom Tiergesundheitsdienst Deventer (GD, 2008).

Der Oberbegriff für alle qualitätsbezogenen Tätigkeiten ist „Qualitätsmanagement“ (QM) (GRAEBIG und VIETHEN, 1996; SCHILLING et al., 1996). Dieses besteht aus den Teilbereichen Qualitätsplanung, Qualitätslenkung, Qualitätssicherung und Qualitätverbesserung (LISCHEWSKI, 1998; GEIGER, 1995). Die QM-Systeme aller Branchen müssen die Minimalanforderungen der DIN EN ISO 9001 erfüllen (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG E.V., 2000). Darüber hinaus existieren weitere speziellere Normen. Unabhängige Zertifizierungsstellen überprüfen diese QM-Systeme (STROEBEL, 1996). Für viele Unternehmensbereiche ist die Zertifizierung sogar in EU-Richtlinien vorgeschrieben (WIESHEU und SPITZNER, 2004). Des Weiteren können Organisationen und damit auch Laboratorien ihr Qualitätsmanagement akkreditieren lassen. Dies hat einen höheren Stellenwert als die Zertifizierung, da zusätzlich

¹ Persönliche Mitteilung von M. Mrozek, Bundestierärztekammer e.V., 2006.

zu den grundsätzlichen Qualitätsforderungen der DIN EN ISO 9001 noch speziellere Anforderungen an die Qualität gestellt werden. Als Grundlage für die Akkreditierung von Laboratorien gilt seit 2000 die DIN EN ISO/IEC 17025 (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG E.V., 2005). Aus dieser Norm wurde 2003 die speziellere Norm DIN EN ISO 15189 für medizinische Laboratorien geschaffen, welche auch die Kontrolle und Überwachung der präanalytischen Phase als Teil des Gesamtprozesses verlangt (WOOD, 2005). Diese gilt allerdings nur für humanmedizinische diagnostische Untersuchungen, so dass veterinärmedizinische Laboratorien nur die Akkreditierung nach DIN EN ISO 17025 anstreben können², in der auf die präanalytische Phase nicht eingegangen wird (WOOD, 2005).

Die erste in Deutschland vorgenommene Zertifizierung eines QM-Systems im medizinischen Bereich erfolgte 1995 mit dem St. Josefs-Hospital in Wiesbaden (LISCHEWSKI, 1998). Als erstes medizinisches Labor Deutschlands wurde laut Informationen des DAP (Deutsches Akkreditierungssystem Prüfwesen GmbH) 1995 das Ärztliche Labor der Doktoren Berthold und Schmidt in Frankfurt/Oder akkreditiert². Der Bereich der Präanalytik wurde dazu nicht näher betrachtet.

Präzise Messergebnisse können zu einer falschen Diagnose und Therapie führen, wenn die Probe zur Zeit der Analyse so verändert ist, dass sie nicht mehr der Grundgesamtheit im Patienten entspricht (APPEL et al., 1999). Zweck einer klinisch-chemischen Untersuchung ist es daher, den zum Zeitpunkt der Probennahme vorhandenen Wert eines Parameters bei der *In vitro*-Analyse unverfälscht zu ermitteln (GUDER et al., 2002). Da das Analysenresultat von der Vorgeschichte der Probe und der Qualität der einzelnen Arbeitsschritte im Labor mitbestimmt wird, ist die Einbeziehung der Präanalytik in das Qualitätsmanagement unverzichtbar (SKOPP und PÖTSCH, 2002). Dies verdeutlicht auch Abbildung 2.2. Ziel ist daher, die Prozeduren der Blutentnahme, des Umgangs und der Lagerung der Proben zu standardisieren, um die Variationen zu minimieren, die das Endergebnis der Analyse beeinflussen können (MORAGLIO und BANFI, 1996).

2.3.2 Einflussgrößen innerhalb der Präanalytik

Durch die Entwicklung und erfolgreiche Umsetzung hochqualitativer Analysestandards konnten analytische Fehler stark reduziert werden und sind damit nicht mehr die Hauptfaktoren, die die Verlässlichkeit und klinische Anwendbarkeit der Labordiagnostik bestimmen (PLEBANI und CARRARO, 1997; STANKOVIC, 2004; LIPPI et al., 2006a).

Über den Einfluss von Fehlern durch mangelhafte bzw. fehlende Standardisierung der Präanalytik auf den gesamten diagnostischen Prozess sind in der Literatur verschiedene Anga-

² Persönliche Mitteilung von H. Manke, Deutsches Akkreditierungssystem Prüfwesen GmbH (DAP), 2008.

ben zu finden. So sind es bei LIPPI et al. (2006a) bis zu 93%, bei AUFENANGER und ZAWTA (1999) bis zu 80%, bei PLEBANI (2006) 46-68,2% und bei BOONE et al. (1995) 41% der Fehler im gesamten diagnostischen Prozess, die durch Fehler in der Präanalytik erzeugt werden.

Über die verschiedenen Einflussgrößen auf die präanalytische Phase der Blutuntersuchung (siehe Abb. 2.3) sind viele Untersuchungen durchgeführt worden. Nachfolgend wird auf die einzelnen Variablen näher eingegangen.

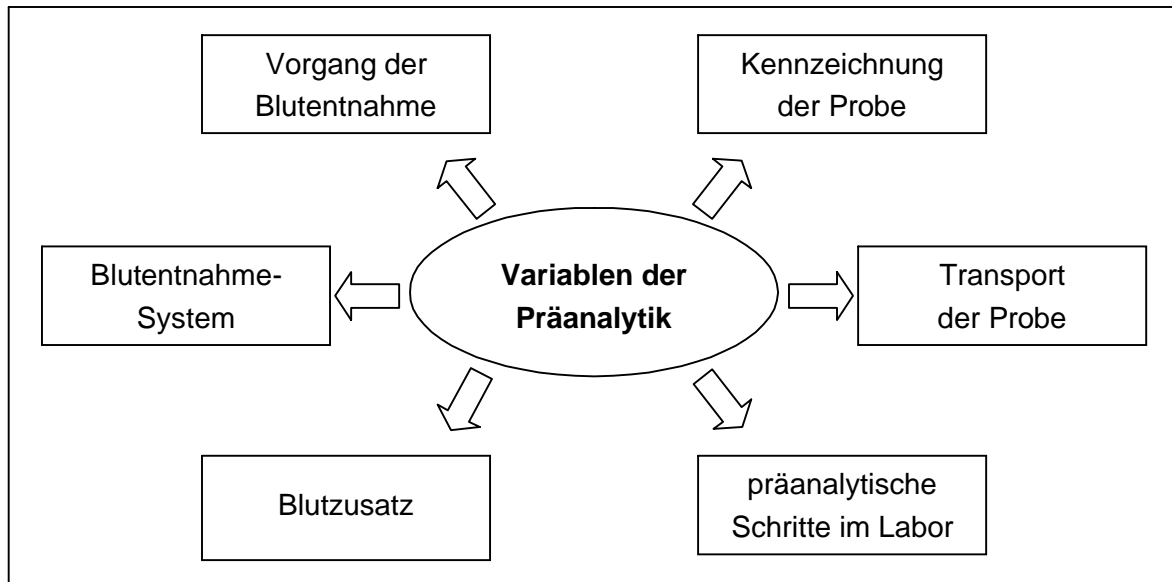


Abb. 2.3: Einflussgrößen auf die präanalytische Phase der Blutuntersuchung.
Erläuterungen im Text.

2.3.2.1 Vorgang der Blutentnahme

Nach Untersuchungen von PLEBANI und CARRARO (1997) werden die meisten Fehler in der präanalytischen Phase während der Blutentnahme erzeugt.

Die Blutentnahme beim Rind kann aus der Halsvene (V. jugularis externa), der Eutervene (V. epigastrica cranialis superficialis) oder der Schwanzvene (V. caudalis mediana) erfolgen (STÖBER und GRÜNDER, 1990). Empfohlen wird dabei die Blutentnahme aus der Hals- oder Schwanzvene, da bei der Eutervene eine große Gefahr der Hämatom- und Abszessbildung besteht (JONES und ALLISON, 2007). Zusätzlich konnten beim Vergleich der verschiedenen Venen Unterschiede in den Konzentrationen der Blutparameter festgestellt werden (GELFERT und STAUFENBIEL, 1998). So liegen z.B. die Konzentrationen der Parameter Glukose und Kalzium im Blut der Eutervene niedriger als in der Halsvene, wohingegen es sich z.B. für die Parameter Harnstoff und anorganisches Phosphat anders herum verhält (REDEZKY et al., 2003).

Eine ungeeignete Vene und schwierige Blutentnahme kann die Hämostase aktivieren und hämolytische Proben erzeugen (LIPPI et al., 2006b). Schon die Punktion des Blutgefäßes aktiviert Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren (GUDER et al., 2002).

Eine anhaltende Stauung der Vene ist mit Hämokonzentration und variierenden Werten bei Gerinnungsanalysen durch Aktivierung der Gerinnungskaskade assoziiert (LIPPI et al., 2006b; YOUNG et al., 2006). Der ansteigende intravaskuläre Druck während des Venenstaus führt zu einer vermehrten Abfiltration von Plasmawasser und niedermolekularen Bestandteilen in den interstitiellen Raum, wodurch sich korpuskuläre und hochmolekulare Bestandteile des Blutes auf einen kleineren intravasalen Raum verteilen und somit erhöhte Konzentrationen aufweisen (JUNGE et al., 1978; GUDER et al., 1996; LIPPI et al., 2006b). Die Konzentration der Blutparameter hängt daher vor allem von der Dauer der Stauung und von der Größe der Blutparameter und deren Proteinbindung ab (LIPPI et al., 2006b). Zu langes Stauen kann intravasal auch eine Hämolyse herbeiführen (HAGEMANN, 2005; SCHAUSEIL, 2006).

Ein weiterer Fehler, der bei der Blutentnahme auftreten kann, ist die mangelnde Quantität (JONES et al., 1997). Laut PLEBANI (2006) machen ungenügende Probenvolumina über 60% der präanalytischen Fehler aus. Dies ist bei Verwendung von Probenröhrchen mit Antikoagulantien oder anderen Zusätzen problematisch, da das richtige Mischungsverhältnis von Blut und Röhrchenzusatz so nicht entstehen kann (LIPPI et al., 2006b).

In der Tiermedizin müssen zusätzlich die meisten Tiere für eine korrekte Blutentnahme auf Grund von Abwehrbewegungen fixiert werden (BAUMGARTNER, 2005). Gerade bei landwirtschaftlichen Nutztieren ist die Entnahme von Blutproben meist nur unter Einsatz von Zwangsmaßnahmen möglich, was Stress verursacht und so die Konzentration von Blutparametern beeinflussen kann (RIETSCHER et al., 1975; REDETZKY et al., 2003; MUDROŇ et al., 2005; REYNOLDS et al., 2008). Die Blutentnahme aus der Schwanzvene des Rindes kann dagegen auch ohne Fixation durchgeführt werden und ist ohne Venenstau möglich (DELORME, 1982).

2.3.2.2 Blutentnahmesystem

Bis in die fünfziger Jahre erfolgte die Blutentnahme mit offenen Glasröhrchen. Seitdem haben die Blutentnahmesysteme viele Weiterentwicklungen erfahren, so dass inzwischen auch innovativere Systeme mit Vakuum, Trenngel und / oder integrierten Zusätzen wie Antikoagulantien erhältlich sind (HILL et al., 1992).

Die Wahl des Blutentnahmesystems kann einen Effekt auf die Konzentration der Blutparameter bei der anschließenden Analyse ausüben (REYNOLDS et al., 2008). Zusätzlich kann auch der gewählte Kanüldurchmesser einen Einfluss auf die Laborergebnisse haben, da z.B. bei Verwendung von Kanülen kleineren Durchmessers mit Vakuum-Röhrchen großer Druck auf das Blut ausgeübt wird, so dass das Hämolyserisiko steigt (LIPPI et al., 2006b).

Die verschiedenen Systeme, die bei der Blutentnahme zum Einsatz kommen können, werden in Abbildung 2.4 wiedergegeben.

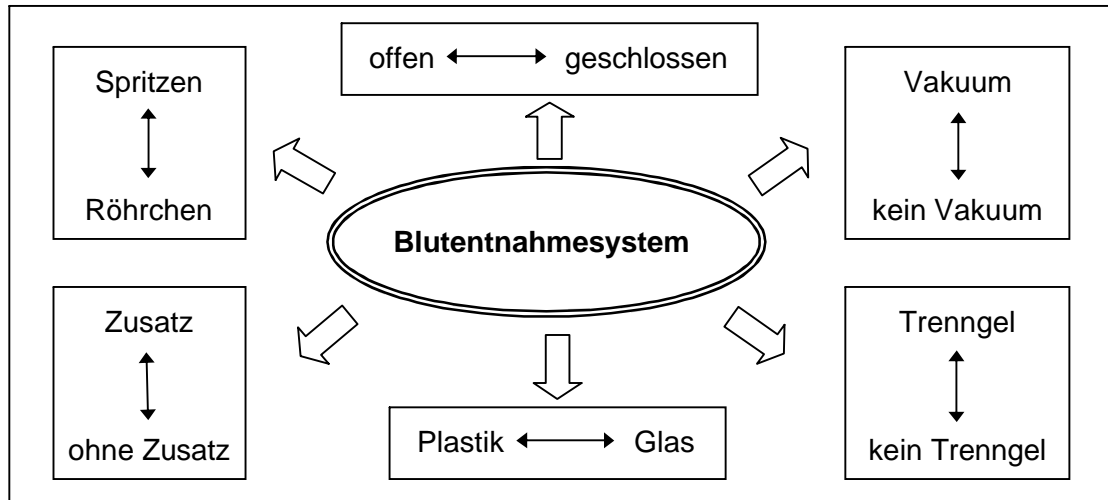


Abb. 2.4: Variablen bei der Wahl des Blutnahmesystems.

Erläuterungen im Text. Auf die möglichen Zusätze wird in Kapitel 2.3.2.3 eingegangen.

Offene oder geschlossene Systeme:

Es können offene oder geschlossene Systeme zur Blutentnahme verwendet werden (BANFI, 1995). Bei offenen Systemen handelt es sich um unverschlossene Röhrchen wie z.B. Reagenzgläser, die bei der Blutentnahme unter die Kanüle gehalten werden. Geschlossene Systeme sind dahingegen mit der Kanüle bei der Blutentnahme verbunden. Einige geschlossene Systeme wie z.B. Monovetten® können bei Entfernung des Deckels und Zurückziehen des Stempels auch als offene Systeme verwendet werden. Der Umgang mit dem offenen System ist bei der Blutentnahme meist technisch einfacher (CAIRO und WAGNER, 1997). Die Gefahr der Kontamination ist bei diesem System jedoch größer als beim geschlossenen (CAIRO und WAGNER, 1997; ELCHALAL et al., 2000). Das kann bei der Blutentnahme im Rinderstall ein Problem darstellen, da das verbreitete Vorkommen von luftgetragenen Keimen nachgewiesen wurde (CHAI, 1998).

Spritzen oder Röhrchen:

Es können Spritzen oder Röhrchen zur Blutentnahme verwendet werden (BURNETT et al., 1995). Bei der Verwendung von Spritzen wird das Blut anschließend zur Verarbeitung im Labor in Röhrchen umgefüllt (JONES und ALLISON, 2007). Für Ratten konnten NEPTUN et al. (1985) signifikante Differenzen für einige klinisch chemische Blutparameter bei der Verwendung von Spritzen und Röhrchen ausmachen. Dahingegen konnten DUBREUIL et al. (1990) beim Schwein keinen Effekt auf die Blutwerte feststellen. Die Einführung von Einmalkanülen und evakuierten Röhrchensystemen ermöglicht eine Blutentnahme von einheitlicher Qualität (LIPPI et al., 2006b). In der Tiermedizin werden jedoch weiterhin Spritzen als alternatives Blutnahmesystem genutzt (REYNOLDS et al., 2008). CARRARO et al. (2000) weisen aller-

dings darauf hin, dass das Auftreten einer *In vitro*-Hämolyse durch die Verwendung von evakuierten Röhrchensystemen an Stelle von Spritzen reduziert werden kann.

Röhrchen mit oder ohne Vakuum:

Es sind Röhrchen mit oder ohne Vakuum verfügbar. Durch das Vakuum ergibt sich in den Blutentnahmeröhrchen eine standardisierte Füllmenge, was ein korrektes Mischungsverhältnis bei der Verwendung von Antikoagulantien erzeugt (BANFI, 1995). Gerade für kleine Tiere oder solche mit schlechter Zirkulation (z.B. im Schock) ist das Vakuum dieser Röhrchen jedoch zu hoch, so dass die Venen kollabieren und die nötige Blutmenge nicht gewonnen werden kann (REYNOLDS et al., 2008).

Röhrchen mit oder ohne Trenngel:

Röhrchen mit oder ohne Trenngel können für die Blutentnahme genutzt werden. Bei der Verwendung von Röhrchen mit Trenngel befindet sich dieses am Boden des Gefäßes. Erst durch die Zentrifugation der Röhrchen lagert sich das Trenngel auf Grund seiner Dichte zwischen Blutkuchen und Serum oder Plasma ab (VAN DEN OUWELAND und CHURCH, 2007). Durch die Nutzung von Röhrchen mit Trenngel können fehleranfällige Schritte, wie die Umbeschriftung der Proben und Serumtransfer in weitere Röhrchen nach der Zentrifugation, eliminiert werden, da die Original-Probenröhrchen zur Analyse beibehalten werden (LAESSIG et al., 1976b; BANFI, 1995; YOUNG et al., 2006). Bei hohen Proteinkonzentrationen im Blut nimmt jedoch die Plasmaviskosität zu, wodurch die Positionierung des Trenngels im Röhrchen gestört werden kann (VAN DEN OUWELAND und CHURCH, 2007). Gel-Röhrchen zeichnen sich durch einen guten Schutz gegen mögliche Kontamination aus (O'KEANE und CUNNINGHAM, 2006). JONES et al. (1997) zeigten, dass Serum aus Röhrchen ohne Gel häufiger unbrauchbar ist für die Analyse als aus Röhrchen mit Trenngel. Serum-Röhrchen mit Trenngel werden als lagerungstauglich eingestuft, da keine klinisch signifikanten Interaktionseffekte durch die Polymerbarriere festgestellt werden konnten (LAESSIG et al., 1976c). STOKOL und NYDAM (2005) wiesen jedoch bei der Untersuchung von Rinderblut eine höhere Konzentration an Freien Fettsäuren in Serum-Röhrchen mit Trenngel im Vergleich zu Röhrchen ohne Trenngel nach. Dieser Konzentrationsunterschied wurde auf das Trenngel zurückgeführt und die Röhrchen daher im Gegensatz zur Schlussfolgerung von LAESSIG et al. (1976c) nicht zur Lagerung empfohlen (STOKOL und NYDAM, 2005).

Glas oder Plastik als Material:

Als Material der Spritzen oder Röhrchen kann Glas oder Plastik verwendet werden (BURNETT et al., 1995; MORAGLIO und BANFI, 1996). Die Nutzung von Glasröhrchen ist aus arbeitsschutztechnischen Gründen und auf Grund der besseren Eignung von Plastikröhrchen für automatisierte Laboratorien zurückgegangen (KRATZ et al., 2006). Beim Vergleich dieser beiden Materialien konnten HILL et al. (1992) keine Grenzflächeneffekte für die klinische Chemie des Blutes nachweisen. Bei der Auswertung des Blutbildes wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen EDTA-haltigen Glas- und Plastikröhrchen festgestellt, die jedoch nicht von klinischer Bedeutsamkeit waren (VAN COTT et al., 2003). Auch KRATZ et al. (2006) stellten bei ihren Untersuchungen zu Gerinnungsanalysen für einige Parameter sta-

tistisch aber nicht klinisch signifikante Differenzen fest. BURNETT et al. (1995) weisen darauf hin, dass Glas zur Blutgasbestimmung besser geeignet ist als Plastik, da es impermeabel für Gase ist.

2.3.2.3 Blutzusätze

Als Zusätze für Blutproben finden vor allem Gerinnungshemmer (Antikoagulantien) Verwendung. Durch den Einsatz von Antikoagulantien können gerinnungsbedingte Veränderungen einiger Messgrößen weitgehend vermieden werden (GUDER et al., 2002). Eine mögliche Fehlerquelle bei der Blutentnahme ist jedoch die Verwendung von Röhrcchen mit ungeeigneten Zusätzen (PLEBANI und CARRARO, 1997). Diese Röhrcchen machen 13-16% der ungeeigneten Proben, die im Labor ankommen, aus (LIPPI et al., 2006b).

Tabelle 2.2 liefert einen Überblick über die derzeit gebräuchlichen Zusätze in Blutentnahmeröhrcchen. Wird kein Zusatz verwendet, so trennt die Zentrifugation das Serum vom Blutkuchen. Heparin, EDTA und Zitrat können als Antikoagulant zum Erhalt von Plasma eingesetzt werden (KRAFT und DÜRR, 2005d). Die Wahl des Antikoagulant richtet sich dabei nach der Empfehlung für die angestrebte Untersuchung (siehe Tab. 2.2). So werden EDTA für die Hämatologie, Heparin für eilige Bestimmungen und Untersuchungen, bei denen schon eine leichte Hämolyse stören kann, und Zitrat für die Gerinnungsanalytik verwendet (GUDER et al., 2002; HAGEMANN, 2005). EDTA und Zitrat sollten jedoch nicht für Bestimmungen zur klinischen Chemie des Blutes verwendet werden, da diese Antikoagulantien einen Effekt auf mehrere Parameter ausüben (RUSSEL und ROUSSEL, 2007). Der Vorteil bei der Verwendung von Plasma gegenüber Serum liegt im Zeitgewinn, da die Zentrifugation sofort erfolgen kann und eine Gerinnung nicht abgewartet werden muss. Außerdem können gerinnungsbedingte Veränderungen vermieden werden (GUDER et al., 2002; VAP und WEISER, 2007). Bei Fluorid handelt es sich um einen Glykolysehemmer, der meist in Kombination mit einem Antikoagulant zur Glukosebestimmung eingesetzt wird (HAGEMANN, 2005).

Bei der Entnahme von Blutproben mit verschiedenen Zusätzen soll die Reihenfolge nach den NCCLS-Richtlinien (National Committee for Clinical Laboratory Standards) erfolgen, wonach zuerst Röhrcchen für Blutkulturen, dann Röhrcchen für Serum (Vollblut), gefolgt von Zitrat-, Heparin-, EDTA- und Fluoridblut verwendet werden (LIPPI et al., 2006b). Auf diese Art und Weise werden Kontaminationen zwischen den Röhrcchen minimiert (GUDER et al., 2002).

Antikoagulantien verursachen eine Wasserverschiebung aus den Blutzellen in das Plasma, wodurch es zu einer Verdünnung der Konzentration von Makromolekülen im Plasma kommt (AUFENANGER und ZAWTA, 1999). Des Weiteren sind für die gebräuchlichen Antikoagulantien (Heparin, EDTA, Zitrat, Oxalat) Interferenzen mit den Bestimmungsmethoden vieler Analyten dokumentiert worden (KROLL und ELIN, 1994). STOKOL und NYDAM (2005) konnten für Rinderblut nachweisen, dass die Gehalte der Freien Fettsäuren durch Antikoagulantien beeinflusst werden und mit der Zeit ansteigen, insbesondere bei höherer Temperatur.

Bei der Verwendung von Blutzusätzen ergibt sich bei ungenügender Füllung der Röhren ein fehlerhaftes Mischungsverhältnis von Blut und Zusatz (MORAGLIO und BANFI, 1996; LIPPI et al., 2006b). Außerdem muss ein korrektes Mischen der Proben mit dem verwendeten Blutzusatz erfolgen, damit sich dessen Wirkung entfalten kann (GUDER et al., 2002; LIPPI et al., 2006b). Dabei soll das Röhren 8-10mal geschwenkt, jedoch nicht geschüttelt werden, um eine Gerinnungsaktivierung zu vermeiden (HAGEMANN, 2005).

Tab. 2.2: Derzeit gebräuchliche Zusätze in Röhren zur Blutentnahme und deren Indikation (nach KRAFT und DÜRR, 2005d).

Erläuterungen siehe Text.

Blutzusatz	Indikation	Bemerkungen
Kein Zusatz	Klinische Chemie	Vollblut ohne Zusatz wird zur Serumgewinnung genutzt, wobei zur Vermeidung von Hämolyse meist Gerinnungshilfen z.B. in Form von Granulat eingesetzt werden.
Heparin	Klinische Chemie	Antikoagulant; Der Vorteil gegenüber Serum liegt in der verminderten Hämolysegefahr und der schnellen Zentrifugierbarkeit.
EDTA	Hämatologie	Antikoagulant; EDTA ist ungeeignet zur Analyse der klinischen Chemie auf Grund der Effekte auf mehrere Parameter.
Zitrat	Gerinnungsanalysen, Blutkörperchensenkungsreaktion	Antikoagulant; Zitrat ist ungeeignet zur Analyse der klinischen Chemie auf Grund der Effekte auf mehrere Parameter.
Fluorid	Glukose, Laktat	Antiglykolyse; Fluorid wird meist in Kombination mit einem Antikoagulant wie z.B. Oxalat verwendet.

2.3.2.4 Transport der Probe

Die nächste Variable der Präanalytik ist der Probentransport zum Labor. Für das Versenden von diagnostischen Proben wie Blut wurden von der Berufsgenossenschaft für Gesundheitsdienst und Wohlfahrtspflege gefahrgutrechtliche Hinweise herausgegeben. Demnach erfolgt eine Einordnung der Proben nach Gefahreinschätzung, wonach sich die Art der Verpackung und Kennzeichnung für den Transport richtet (BGW, 2007).

Die vom Tierarzt entnommenen Blutproben werden entweder selbst zum Labor transportiert, vom Kurier abgeholt oder per Post zum Labor gesendet (BGW, 2007). Dabei sollte der

Transport so erfolgen, dass sich die Probe möglichst wenig verändert (HAGEMANN, 2005). Veränderungen in der Blutprobe sind durch den Stoffwechsel der Zellen (z.B. Glykolyse), die Abgabe von Ionen durch die Zellen (z.B. Kalium) und das Ausströmen von Gasen bei Verwendung von Plastik-Röhrchen möglich (BURNETT et al., 1995). Auf diese Prozesse haben sowohl die Transportdauer bzw. Lagerung der Proben (SÜDHOF und WÖTZEL, 1960) als auch die Temperatur Einfluss (BURNETT et al., 1995). JENSEN et al. (2008) empfehlen Vollblut für den Transport, da das Zentrifugieren von Blutproben vor dem Transport zeitraubend und teuer ist und der Transfer von Plasma in neue Röhrchen zusätzlich das Risiko der Kontamination und Misidentifikation in sich birgt. Bei diesen Untersuchungen kamen die Proben jedoch innerhalb von sechs Stunden nach der Blutentnahme im Labor an (JENSEN et al., 2008). Wenn aus technischen Gründen eine längere Transportdauer nicht vermieden werden kann, sollte das Serum oder Plasma vor dem Transport abzentrifugiert werden (GUDER et al., 1996; GUDER et al., 2002; RAI und VITZTHUM, 2006).

Ausführlichere Angaben zu dieser Thematik können in Kapitel 2.3.5 (Stabilität ausgewählter Parameter der klinischen Chemie) nachgelesen werden.

2.3.2.5 Kennzeichnung der Probe

Die fehlerhafte Zuordnung einer Probe zum Laborauftrag durch mangelhafte bzw. fehlende Kennzeichnung ist eine weitere Fehlerquelle innerhalb der Präanalytik (PLEBANI und CARRARO, 1997; KALRA, 2004; HAGEMANN, 2005; LIPPI et al., 2006b; PLEBANI, 2006).

2.3.2.6 Präanalytische Schritte innerhalb des Labors

Dies beinhaltet die Probenaufnahme im Labor und das Zentrifugieren, Aufteilen, Pipettieren und Verdünnen von Proben vor der Analyse (PLEBANI, 2006). Auch das Mischen der Proben vor der Analyse ist ein präanalytischer Vorgang (BURNETT et al., 1995).

Das Zentrifugieren von Vollblut zur Gewinnung von zellfreiem Serum bzw. Plasma sollte beim Großtier nach etwa 30 Minuten erfolgen (VAP und WEISER, 2007), wobei die Blutprobe bis dahin vollständig bei Raumtemperatur geronnen sein sollte (RUSSEL und ROUSSEL, 2007). Bisher wurden nur wenige Empfehlungen zur Zentrifugation von Blutproben veröffentlicht. So empfiehlt das NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) für die Humanmedizin eine Zentrifugation bei 1000-1200 x g über 10 ± 5 Minuten (BERMES et al., 2006). Für die Veterinärmedizin wird eine Zentrifugation mit 3000 Umdrehungen / Minute über 5 – 10 Minuten empfohlen (KRAFT und DÜRR, 2005d). Je nachdem wie groß der Durchmesser der Zentrifuge ist, kann die g-Zahl bei 3000 Umdrehungen unterschiedlich hoch sein (HAGEMANN, 2005), so dass die Angabe der Umdrehungszahl keine standardisierte Vorgabe darstellt.

Wenn eine Analyse innerhalb einiger Tage nicht möglich ist, sollte das Serum eingefroren werden, da das Einfrieren auf die meisten Analyte minimale Effekte ausübt (RUSSEL und ROUSSEL, 2007). Trotzdem sollte mehrmaliges Einfrieren und Auftauen vermieden werden.

2.3.3 Möglichkeiten der Standardisierung der Präanalytik

Der in der Industrie zunehmende Qualitätsanspruch wurde auch auf das Gesundheitswesen übertragen. Auf Grund der vielen möglichen Einflussfaktoren der Präanalytik auf den Gesamtprozess der Blutuntersuchung liefert die präanalytische Phase der Blutuntersuchung das größte Potential für die Optimierung der Qualität (LIPPI und GUIDI, 2006). Die erste dokumentierte Standardisierung der Blutentnahme erfolgte 1889 durch FRANCKE (1889) mit der Entwicklung einer speziellen Nadel zur Blutentnahme aus der Fingerspitze, wodurch sowohl der Druck auf die Fingerbeere als auch die Eindringtiefe standardisiert wurde.

In der Humanmedizin waren JUNGE et al. (1978) unter den Ersten, die genaue Angaben zu einer Standardisierung der Blutentnahme lieferten, indem sie unter anderem die Uhrzeit, die Umgebungstemperatur und eine maximale Stauzeit der Vene von einer Minute festlegten. Sie wiesen auch darauf hin, dass die Faust während der Entnahme nicht geöffnet und geschlossen werden sollte, da dies zu einer 10-20%igen Erhöhung der Kaliumkonzentration führt (JUNGE et al., 1978).

Auch für die Blutentnahme beim Rind wurden Versuche zur Festlegung von Standardbedingungen angestrengt. So formulierte GRÜNDER (1991) erstmalig generelle Standardbedingungen für die Blutentnahme beim Rind, zu denen eine möglichst stressfreie Gewinnung der Blutproben, die sorgfältige Aufbewahrung und der schonende Transport sowie eine zeitgerechte und kontrollierte Untersuchungsmethodik gehören. Außerdem wurden für viele Blutparameter Aussagen zu ihrer höchstzulässigen Untersuchungszeit getroffen (GRÜNDER, 1991). Über die maximale Dauer bis zur Abzentrifugation des Serums konnten verschiedene Angaben gefunden werden. Während STOKOL und NYDAM (2005) eine umgehende Trennung des Serums von den Zellen empfahlen, war bei HOFF und DUFFIELD (2003) eine Zeitspanne von zwei bis drei Stunden möglich. Laut GELFERT und STAUFENBIEL (1998) kann sogar bis spätestens einen Tag nach Blutprobenentnahme zentrifugiert werden, um valide Ergebnisse für die klinische Chemie des Rindes zu erzeugen.

Laut DIN EN ISO 15189:2003 soll das Labor Anleitungen zur Probennahme veröffentlichen, die unter anderem die Art und Weise der Blutentnahme mit Beschreibungen zu den verwendbaren Röhrchen und deren Zusätzen, Anweisungen zur Lagerung der Proben und Zeitlimits beinhalten (WOOD, 2005). Diese Norm gilt allerdings nur für humanmedizinische Laboratorien (siehe Kapitel 2.3.1). Trotzdem haben viele kommerzielle veterinärmedizinische Laboratorien Leitlinien erstellt, um Einfluss auf die Präanalytik der Proben, die bei Ihnen eingesendet werden, auszuüben (siehe z.B. VETERINARY LABORATORIES AGENCY, 2003; UBC COMMITTEE ON ANIMAL CARE, 1996; DAIRY PHARM & DIAGNOSTIC SERVICE, 2005).

2.3.4 Hämolytische Proben

Unter Hämolyse wird die Zerstörung der Zellmembran der roten Blutkörperchen und die daraus resultierende Abgabe von Hämoglobin und intrazellulären Komponenten ins Plasma verstanden (STANKOVIC und SMITH, 2004; YOUNG et al., 2006). Sie ist der häufigste Grund für im Labor ankommende zur Analyse ungeeignete Proben (JONES et al., 1997; LIPPI et al., 2006a).

Eine Hämolyse kann *in vivo* oder *in vitro* entstehen, wobei sie meist *in vitro* zum Zeitpunkt der Blutentnahme oder beim Probentransport stattfindet (KROLL und ELIN, 1994).

In vivo kann eine Hämolyse z.B. durch Krankheit (GUDER, 1986; HAGEMANN, 2005) oder zu lange Stauung des Gefäßes (BAUMGARTNER und SCHLERKA, 1983; DÜRR und KRAFT, 2005; HAGEMANN, 2005) entstehen. *In vitro* kann sie durch viele verschiedene Einflüsse verursacht werden. Diese werden in Tabelle 2.3 wiedergegeben.

Tab. 2.3: Übersicht über die möglichen Hämolyse verursachenden Einflüsse *in vitro*.

An jedem Punkt der präanalytischen Phase kann eine Hämolyse eintreten.

Einfluss	Quelle(n)
zu starkes Aspirieren des Blutes	BAUMGARTNER und SCHLERKA, 1983; DÜRR und KRAFT, 2005; HAGEMANN, 2005
kleine Kanülengröße	CARRARO et al., 2000; LIPPI et al., 2006b
zu starkes Schütteln oder Mischen der Probe nach der Entnahme	GUDER, 1986; KROLL und ELIN, 1994; CARRARO et al., 2000; DÜRR und KRAFT, 2005; LIPPI et al., 2006b
Zentrifugation, bevor die Gerinnung abgeschlossen ist	CARRARO et al., 2000
zu hochtouriges oder langdauerndes Zentrifugieren	LIPPI et al., 2006b
zu lange Lagerung als Vollblut	BAUMGARTNER und SCHLERKA, 1983; GUDER, 1986; DÜRR und KRAFT, 2005
zu heiße oder kalte Temperaturen	BAUMGARTNER und SCHLERKA, 1983; KROLL und ELIN, 1994; LIPPI et al., 2006b
Verunreinigung mit Detergentien	GUDER, 1986; KROLL und ELIN, 1994

Hämolytische Proben können die Analytik über verschiedene Mechanismen stören. Zum einen kommt es zur Freisetzung von intrazellulären Bestandteilen in den Extrazellularraum und zum anderen kann die analytische Methode durch optische oder chemische Interferenzen gestört werden (SONNTAG, 1986; GUDER et al., 2002).

2.3.5 Stabilität ausgewählter Parameter der klinischen Chemie

Im Zusammenhang mit der Qualität der Blutuntersuchung werden in diesem Unterkapitel die für die Studie ausgewählten Parameter der klinischen Chemie näher betrachtet. Es werden deren Stabilität bei der Lagerung von Blutproben speziesübergreifend erläutert und mögliche Störfaktoren bei der Analyse wiedergegeben.

2.3.5.1 Aspartat-Amino-Transferase (AST)

(siehe Tabelle 2.4)

Vollblut:

Für die AST-Aktivität im humanen Vollblut wurde eine Stabilität bei 32°C über 24 Stunden (ZHANG et al., 1998), bei Raumtemperatur über 48 Stunden (LAESSIG et al., 1976a) und 56 Stunden (BOYANTON und BLICK, 2002) und bei Raum- und Kühlschrankschranktemperatur über sieben Tage (HEINS et al., 1995) beschrieben. HEINS et al. (1995) konnten allerdings einen nicht signifikanten Anstieg der AST-Aktivität beobachten, der bei Kühlschrankschranktemperatur größer war. Andere Untersuchungen zeigten einen Anstieg der AST-Aktivität, der mit der Temperatur positiv korreliert war (REHAK und CHIANG, 1988). CLARK et al. (2003) berichten von einem Anstieg der AST-Aktivität im humanen Vollblut bei 21°C nach 24 Stunden um 15% und nach drei Tagen um 41%, während es bei 4°C nach drei Tagen nur 7% waren. Auch bei ONO et al. (1981) stieg die AST-Aktivität bei Raumtemperatur nach 24 Stunden um 17% an, jedoch konnte bei der Lagerung bei 4°C nach 48 Stunden ein Aktivitätsverlust von 13% beobachtet werden.

Bei der Lagerung von bovinem Vollblut konnte nach drei Tagen ein Anstieg der AST-Aktivität um 18,3% bei Raumtemperatur und 10% bei Kühlschrankschranktemperatur beobachtet werden (VON BENTEN, 1972). TASKER (1978) konnte in drei Tagen einen Anstieg der AST nur bei Raumtemperatur nachweisen. Dahingegen konnten FONTAINE et al. (1987b) einen stärkeren Anstieg bei Kühlschrankschranktemperatur ausmachen, der nach 24 Stunden bei 14% lag, während die AST bei Raumtemperatur nur um 7% angestiegen war. Im Gegensatz dazu beobachteten BLINCOE und MARBLE (1985) im bovinen Vollblut mit Heparinzusatz bei Kühlschrankschranktemperatur einen Aktivitätsverlust von 10% nach drei Tagen und 20% nach sieben Tagen.

Serum:

Die Lagerung von humanem Serum erzeugte unterschiedliche AST-Stabilitäten. Bei einigen Untersuchungen blieb die AST über 56 Stunden bei Raumtemperatur (BOYANTON und BLICK, 2002) bzw. sieben Tage bei Raum- und Kühlschrankschranktemperatur (VOIT, 1993; HEINS et al., 1995) stabil. Bei anderen Untersuchungen wird ein kontinuierlicher Aktivitätsverlust beschrieben (THOMAS, 2005f). Diese Abnahme war unabhängig von der Lagerungstemperatur

(CUCCERINI et al., 1983; DONNELLY et al., 1995) oder bei Raumtemperatur-Lagerung größer (MASSARRAT und HERBERT, 1977; NIBLOCK et al., 1986).

Bei der Lagerung von bovinem Serum wird für die AST eine Stabilität von drei Tagen (JONES, 1985), fünf Tagen (GRÜNDER, 1991) oder zehn Tagen (TASKER, 1978) angegeben. VON BENTEN (1972) konnte über drei Tage hinweg einen variierenden Verlauf der AST-Aktivität im bovinen Serum beobachten mit einem geringgradigen Anstieg am ersten Tag und nachfolgendem Absinken der Werte. Bei TOLLERSRUD (1969) blieb die Aktivität der AST über fünf Tage bei Kühlschranktemperatur erhalten, während sie bei Raumtemperatur signifikant anstieg, was auf bakterielle Kontamination der Proben zurückgeführt wurde.

Mögliche Störfaktoren:

Durch Hämolyse ergeben sich erhöhte AST-Aktivitäten, da die AST in Erythrozyten in höheren Konzentrationen vorhanden ist als im Plasma (KELLER, 1971; TASKER, 1978; EL-SEBAIE und HOFMANN, 1981; SONNTAG, 1986; GRAFMEYER et al., 1995; THOMAS, 2005f). Die Stärke der Interferenz ist dabei abhängig von dem jeweils verwendeten Analyseautomaten und dessen Methodik (HEINS et al., 1995).

Erhöhte Lipidwerte können im bovinen Serum ebenfalls zu artifiziell erhöhten AST-Aktivitäten führen (JACOBS et al., 1992).

Ein weiterer möglicher Störfaktor kann das Auftreten von Makro-AST sein. Dabei handelt es sich um Komplexbildungen zwischen der AST und Immunglobulinen, die auch bei gesunden Patienten zu hohen AST-Aktivitäten im Serum führen (STASIA et al., 1994; THOMAS, 2005f).

Antikoagulantien blieben ohne Einfluss auf die Analyse der AST im Plasma (TASKER, 1978). Dagegen konnten THORESEN et al. (1992) im Serum signifikant höhere AST-Aktivitäten nachweisen als im Plasma.

Durch die Zugabe von exogenem Pyridoxalphosphat zum Serum kann eine erhöhte Stabilität der AST-Aktivität bei Lagerung bei Raumtemperatur erreicht werden (NIBLOCK et al., 1986).

Tab. 2.4: Literaturangaben zur Stabilität der AST in Blutproben.

Autor (en)	Spezies	Material	RT	KT
BLINCOE und MARBLE (1985)	Rind	Vollblut mit Heparin-Zusatz	6 h*	< 3 d
FONTAINE et al. (1987b)	Rind	Vollblut	24 h	24 h
GRÜNDER (1991)	Rind	Serum	n.u.	5 d
JONES (1985)	Rind	Serum	3 d	3 d
TASKER (1978)	Rind	Vollblut Serum	< 3 d 10 d*	3 d* 10 d*
TOLLERSRUD (1969)	Rind	Serum	< 5 d	5 d*
LAESSIG et al. (1976a)	Mensch	Vollblut	48 h	n.u.
BOYANTON und BLICK (2002)	Mensch	Vollblut Serum	56 h* 56 h*	n.u. n.u.
CLARK et al. (2003)	Mensch	Vollblut mit EDTA-Zusatz	< 24 h	24 h
CUC CERINI et al. (1983)	Mensch	Serum	24 h	24 h
HEINS et al. (1995)	Mensch	Vollblut Serum	7 d* 7 d*	7 d* 7 d*
NIBLOCK et al. (1986)	Mensch	Serum	24 h	28 d*
ONO et al. (1981)	Mensch	Vollblut	8 h	n.u.
REHAK und CHIANG (1988)	Mensch	Vollblut	< 24 h	24 h*
BREUER und STUCKY (1975)	Mensch / Hund Ratte	Vollblut Vollblut	2 h* < 2 h	n.u. n.u.
FRIEDEL und MATTENHEIMER (1970)	Mensch / Hund / Ratte Kaninchen	Vollblut Vollblut	< 1 h 2 h	n.u. n.u.
THORESEN et al. (1992)	Hund	Vollblut Serum / Plasma	3 d ^{**} 3 d ^{**}	n.u. n.u.
LINDNER (1991)	Pferd	Vollblut Heparin-Plasma	4 d* < 4 d	4 d* 4 d*
SAEED et al. (1995)	Kamel	Serum	3 d	9 d*
DAVY et al. (1984)	Seidenäffchen	Heparin-Plasma	< 24 h	48 h*

* = Versuchsende; ** = Lagerung Tag 0 bis Tag 1 bei 4°C; n.u. = nicht untersucht

2.3.5.2 γ -Glutamyl-Transferase (γ -GT)

(siehe Tabelle 2.5)

Vollblut:

Im humanen Vollblut blieb die Aktivität der γ -GT über 24 Stunden (REHAK und CHIANG, 1988; ZHANG et al., 1998) bzw. 48 Stunden (ONO et al., 1981) bei Raum- und Kühlschranktemperatur erhalten. Über 56 Stunden hinweg konnte ein stetiger Anstieg der γ -GT bei Raumtemperatur beobachtet werden, der jedoch nicht signifikant war (BOYANTON und BLICK, 2002). Nach vier Tagen Lagerung bei Raumtemperatur wurde eine Aktivitätserhöhung von 13,7% ermittelt, während es bei 4°C nach sieben Tagen nur 2% waren (CLARK et al., 2003). Dahingegen zeigte sich die γ -GT bei den Untersuchungen von HEINS et al. (1995) sowohl bei Raum- als auch bei Kühlschranktemperatur über sieben Tage hinweg als stabiler Parameter.

Bei der Lagerung von equinem Vollblut über vier Tage blieb die γ -GT bei 4°C stabil, während die Aktivität bei Raumtemperatur ab dem zweiten Tag erhöht war (LINDNER, 1991). Auch im caninen Vollblut wurde ein Anstieg der γ -GT-Aktivität nachgewiesen (THORESEN et al., 1992). Zur Stabilität der γ -GT in bovinen Vollblutproben liegen keine Daten vor.

Serum:

Bei der Lagerung von humanem Serum zeigte sich die γ -GT bei verschiedenen Lagerungsdauern bis zu sieben Tagen sowohl bei Raum- als auch bei Kühlschranktemperatur stabil (MASSARRAT und HERBERT, 1977; VOIT, 1993; DONNELLY et al., 1995; HEINS et al., 1995; BOYANTON und BLICK, 2002).

Beim Kamel blieb die γ -GT-Aktivität im Serum über sechs Tage bei Raumtemperatur und über neun Tage bei Kühlschranktemperatur erhalten (SAEED et al., 1995). Im caninen Serum blieb die γ -GT über drei Tage stabil (THORESEN et al., 1992). Im equinen Plasma fiel die γ -GT bei Raumtemperatur bis zum vierten Tag um 9% ab, während sich bei 4°C keine signifikanten Veränderungen ergaben (LINDNER, 1991). Im Plasma von Seidenäffchen zeigte die γ -GT bei 4°C eine Stabilität von 48 Stunden, während bei Raumtemperatur nach 24 Stunden bereits signifikante Abweichungen gemessen wurden (DAVY et al., 1984).

Im bovinen Serum blieb die γ -GT drei Tage bei 20°C stabil (JONES, 1985). Für 4°C wird eine Stabilität von zwei Tagen (JONES, 1985) bzw. fünf Tagen (GRÜNDER, 1991) angegeben.

Mögliche Störfaktoren:

Bei der Bestimmung der γ -GT-Aktivität in humanen Blutproben kann eine Hämolyse ab einer Konzentration des freien Hämoglobins von 2 g/l zu erniedrigten Werten führen (THOMAS, 2005e). Diesen Aktivitätsverlust konnte SONNTAG (1986) erst ab einer Konzentration von 3 g/l Hämoglobin beobachten und führte dies auf den Austritt des Enzyminhibitors

Glycin aus den Thrombo- und Leukozyten zurück. HEINS et al. (1995) machten hingegen die Abgabe von Gluthation für die Hemmung des Enzyms verantwortlich. JACOBS et al. (1992) konnten auch im bovinem Serum einen starken Abfall der γ -GT-Werte bei steigender Hämolyse nachweisen.

Die Zusätze Zitrat, Oxalat und Fluorid wirken störend bei der Analyse der γ -GT, da diese die γ -GT-Aktivität unterdrücken (THOMAS, 2005e). THORESEN et al. (1992) fanden bei ihren Untersuchungen signifikant niedrigere Aktivitäten im Serum als im Heparinplasma, lieferten dafür jedoch keinen Erklärungsansatz.

Tab. 2.5: Literaturangaben zur Stabilität der γ -GT in Blutproben.

Autor (en)	Spezies	Material	RT	KT
GRÜNDER (1991)	Rind	Serum	n.u.	5 d
JONES (1985)	Rind	Serum	3 d	2 d
BOYANTON und BLICK (2002)	Mensch	Vollblut Serum	56 h* 56 h*	n.u. n.u.
CLARK et al. (2003)	Mensch	Vollblut mit EDTA-Zusatz	1 d	7 d*
DONNELLY et al. (1995)	Mensch	Serum	4 Monate*	4 Monate*
HEINS et al. (1995)	Mensch	Vollblut, Serum	7 d*	7 d*
ONO et al. (1981)	Mensch	Vollblut	48 h*	48 h*
REHAK und CHIANG (1988)	Mensch	Vollblut	24 h*	24 h*
VOIT (1993)	Mensch	Serum	n.u.	7 d*
THORESEN et al. (1992)	Hund	Vollblut Serum Heparin-Plasma	n.u. 3 d ^{*/**} 3 d ^{*/**}	< 24 h n.u. n.u.
LINDNER (1991)	Pferd	Vollblut Heparin-Plasma	1 d 2 d	4 d* 4 d*
SAEED et al. (1995)	Kamel	Serum	6 d	9 d*
DAVY et al. (1984)	Seidenäffchen	Heparin-Plasma	< 24 h	48 h*

* = Versuchsende; ** = Lagerung Tag 0 bis Tag 1 bei 4°C; n.u. = nicht untersucht

2.3.5.3 Glutamat-Dehydrogenase (GLDH)

(siehe Tabelle 2.6)

Vollblut:

Zur Lagerungsstabilität der GLDH im Vollblut sind bisher sehr wenige Untersuchungen durchgeführt worden. Im caninen Vollblut konnten über drei Tage bei Raumtemperatur keine signifikanten Abweichungen beobachtet werden (THORESEN et al., 1992).

Serum:

Für humanes Serum werden abfallende GLDH-Aktivitäten dokumentiert, die nach 24 Stunden bei Raumtemperatur 10% und nach drei Tagen bei 4°C 5% betragen (THOMAS, 2005d). SCHMIDT und SCHMIDT (1963) beschreiben nach drei Tagen Lagerung bei Kühlschranktemperatur einen Aktivitätsverlust von 13%, während VOIT (1993) nach sieben Tagen keine Veränderung der GLDH-Aktivität nachweisen konnte. In anderen Untersuchungen blieb die GLDH wiederum nur 24 Stunden bei 4°C und vier Stunden bei Raumtemperatur stabil (SCHMIDT et al., 1992).

Für canines Serum wurde eine Lagerungsstabilität von 48 Stunden bei 20°C und sieben Tagen bei 4°C ermittelt (PETA et al., 2007). THORESEN et al. (1992) wiesen eine Stabilität von drei Tagen bei Raumtemperatur im caninen Serum nach.

Bei der Untersuchung des Plasmas von Seidenäffchen zeigte die GLDH bei 4°C eine Stabilität von 48 Stunden, während bei Raumtemperatur nach 24 Stunden bereits signifikant abweichende Aktivitäten gemessen wurden (DAVY et al., 1984).

Im bovinen Serum zeigte die GLDH sowohl bei Raum- als auch bei Kühlschranktemperatur starke Aktivitätsschwankungen (KLOENE, 1974). Für die GLDH wird eine Stabilität von 18 Stunden bei Kühlschranktemperatur angegeben (GRÜNDER, 1991).

Mögliche Störfaktoren:

Eine Hämolyse der Proben hat keinen Einfluss auf die Bestimmung der GLDH-Aktivität (SONNTAG, 1986; SCHMIDT et al., 1992), da dieses Enzym stark organspezifisch ist und in Erythrozyten nicht oder in kaum nachweisbaren Mengen vorliegt (KELLER, 1971).

Durch die Trübung von lipämischen Seren oder Plasmen können falsch erniedrigte GLDH-Aktivitäten gemessen werden (SCHMIDT et al., 1992).

Der Zusatz von Natrium-Fluorid verursacht erniedrigte GLDH-Aktivitäten im Plasma (THOMAS, 2005d). Die Zusätze Heparin, EDTA und Zitrat erzeugen dahingegen keine Interferenzen (SCHMIDT et al., 1992; THORESEN et al., 1992).

Tab. 2.6: Literaturangaben zur Stabilität der GLDH in Blutproben.

Autor (en)	Spezies	Material	RT	KT
GRÜNDER (1991)	Rind	Serum	n.u.	18 h
GUDER et al. (1996)	Mensch	Serum	7 d	7 d
SCHMIDT et al. (1992)	Mensch	Serum Plasma	4 h 4 h	24 h 24 h
SCHMIDT und SCHMIDT (1963)	Mensch	Serum	n.u.	2 d
VOIT (1993)	Mensch	Serum	n.u.	7 d*
PETA et al. (2007)	Hund	Serum	48 h	7 d
THORESEN et al. (1992)	Hund	Vollblut Serum Heparin-Plasma	3 d ^{*/**} 3 d ^{*/**} 3 d ^{*/**}	n.u. n.u. n.u.
DAVY et al. (1984)	Seidenäffchen	Heparin-Plasma	< 24 h	48 h*

* = Versuchsende; ** = Lagerung Tag 0 bis Tag 1 bei 4°C; n.u. = nicht untersucht

2.3.5.4 Bilirubin

(siehe Tabelle 2.7)

Vollblut:

Bei der Lagerung von humanem Vollblut bei unterschiedlichen Temperaturen blieb Bilirubin bis zu 48 Stunden stabil (LAESSIG et al., 1976a; ONO et al., 1981; REHAK und CHIANG, 1988; ZHANG et al., 1998). KELLER (1975) beobachtete nach 48 Stunden eine signifikante Konzentrationsabnahme. Dagegen konnten BOYANTON und BLICK (2002) nach 24 Stunden bei Raumtemperatur einen Anstieg des Bilirubingehaltes von 17% nachweisen, der auf Hämokonzentration zurückgeführt wurde.

Im equinen (LINDNER, 1991) und caninen (THORESEN et al., 1992) Vollblut blieb die Konzentration von Bilirubin bei der Lagerung über vier Tage erhalten. Im caninem Vollblut mit Heparin-Zusatz wurde ein Abfall des Bilirubingehaltes beobachtet (THORESEN et al., 1992).

Auch im bovinen Vollblut blieb Bilirubin bei der Lagerung bei Raum- oder Kühlschrankschranktemperatur über drei Tage stabil (TASKER, 1978).

Tab. 2.7: Literaturangaben zur Stabilität von Bilirubin in Blutproben.

Autor (en)	Spezies	Material	RT	KT
GRÜNDER (1991)	Rind	Serum	n.u.	18 h
TASKER (1978)	Rind	Vollblut Serum	3 d* 10 d*	3 d* 10 d*
BOYANTON und BLICK (2002)	Mensch	Vollblut Serum	24 h 56 h*	n.u. n.u.
GUDER et al. (1996)	Mensch	Serum	2 d	7 d
HEINS et al. (1995)	Mensch	Serum	3 d	7 d*
KELLER (1975)	Mensch	Heparin-Vollblut Heparin-Plasma	48 h 48 h	n.u. n.u.
LAESSIG et al. (1976a)	Mensch	Vollblut	48 h	n.u.
ONO et al. (1981)	Mensch	Vollblut	48 h*	48 h*
REHAK und CHIANG (1988)	Mensch	Vollblut	24 h*	24 h*
THALER et al. (2008)	Mensch	Serum	3 d	8 d
LINDNER (1991)	Pferd	Vollblut Heparin-Plasma	4 d* 4 d*	4 d* 4 d*
THORESEN et al. (1992)	Hund	Vollblut Serum Heparin-Plasma	3 d ^{*/**} 3 d ^{*/**} 3 d ^{*/**}	n.u. n.u. n.u.

* = Versuchsende; ** = Lagerung Tag 0 bis Tag 1 bei 4°C; n.u. = nicht untersucht

Serum:

Für humanes Serum wird eine Stabilität von drei Tagen im abgedunkelten Gefäß angegeben (THOMAS, 2005c). HEINS et al. (1995) konnten nach drei Tagen bei Raumtemperatur einen Abfall der Bilirubinkonzentration nachweisen, der auf Photooxidation zurückgeführt wurde, während die Konzentration bei Lagerung bei 9°C unverändert blieb. Bei KELLER (1975) trat dieser Konzentrationsabfall bei Raumtemperatur-Lagerung schon nach 48 Stunden im Heparinplasma ein.

Im caninen Serum und Heparinplasma (THORESEN et al., 1992) und im equinen Heparinplasma (LINDNER, 1991) blieb Bilirubin über mehrere Tage stabil.

Für die Lagerung von bovinem Serum wird für Bilirubin eine Stabilität von 18 Stunden und bei Dunkelheit von vier Tagen angegeben (GRÜNDER, 1991). Bei TASKER (1978) blieb Bilirubin sowohl bei Raum- als auch bei Kühlschranktemperatur über zehn Tage stabil.

Mögliche Störfaktoren:

Als Störfaktor bei der Bilirubinbestimmung gilt vor allem die Lichtexposition der Probe (KRAFT und DÜRR, 2005c; THOMAS, 2005c), bei der Bilirubin durch Photooxidation abgebaut wird (VOIT, 1993). Dadurch kann der Gehalt des Gesamtbilirubins um bis zu 30% (THOMAS, 2005c), laut THALER et al. (2008) sogar um bis zu 50% innerhalb einer Stunde abfallen.

Eine Hämolyse der Proben wirkt sich ebenfalls störend auf die Bestimmung des Gesamtbilirubins aus (EL-SEBAIE und HOFMANN, 1981; SONNTAG, 1986; THALER et al., 2008). Je nach Untersuchungsmethode können dabei falsch erniedrigte (TASKER, 1978) oder erhöhte Konzentrationen (SONNTAG, 1986) nachgewiesen werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Hämoglobin sowohl eine spektrale als auch eine chemische Interferenz verursachen kann (GRAFMEYER et al., 1995).

Erhöhte Lipidwerte können im Serum zu artifiziell erhöhten Bilirubingehalten führen (JACOBS et al., 1992).

2.3.5.5 Gesamteiweiß

(siehe Tabelle 2.8)

Vollblut:

Bei der Lagerung von humanem Vollblut erwies sich das Gesamteiweiß sowohl bei Raum- als auch bei Kühlschranktemperatur als stabiler Parameter (LAESSIG et al., 1976a; ONO et al., 1981; BOYANTON und BLICK, 2002; CLARK et al., 2003). REHAK und CHIANG (1988) konnten innerhalb von 24 Stunden keinen Temperatureinfluss auf den Proteingehalt der Proben im Bereich von 3°C bis 38°C beobachten. Dahingegen zeigte sich bei ZHANG et al. (1998) bei einer Inkubation bei 32°C nach 24 Stunden ein Anstieg des Proteingehaltes, der auf Hämokonzentration zurückgeführt wurde. Auch KELLER (1975) konnte im heparinisiertem Vollblut eine signifikante Zunahme des Proteingehaltes bei Lagerung bei Raumtemperatur nachweisen, was mit einer möglichen Wechselwirkung bei der Biuret-Reaktion erklärt wurde.

Im equinen Vollblut blieb der Proteingehalt bei einer Lagerung über vier Tage unverändert (LINDNER, 1991). Im caninen Vollblut stieg der Proteingehalt bei Raumtemperatur nach zwei Tagen signifikant an (THORESEN et al., 1992).

Im bovinen Vollblut blieb der Proteingehalt bei Lagerung bei Raum- oder Kühlschranktemperatur stabil (TASKER, 1978; WITTEWITZ et al., 1986; FONTAINE et al., 1987b).

Tab. 2.8: Literaturangaben zur Stabilität des Serum-Proteins in Blutproben.

Autor (en)	Spezies	Material	RT	KT
FONTAINE et al. (1987b)	Rind	Vollblut	96 h*	96 h*
GRÜNDER (1991)	Rind	Serum	n.u.	5 d
TASKER (1978)	Rind	Vollblut Serum	3 d* 10 d*	3 d* 10 d*
WITTEWITZ et al. (1986)	Rind	Vollblut	72 h*	72 h*
BOYANTON und BLICK (2002)	Mensch	Vollblut Serum	56 h* 56 h*	n.u. n.u.
CLARK et al. (2003)	Mensch	EDTA-Vollblut	7 d*	7 d*
DONNELLY et al. (1995)	Mensch	Serum	4 Monate*	4 Monate*
LAESSIG et al. (1976a)	Mensch	Vollblut	48 h*	n.u.
ONO et al. (1981)	Mensch	Vollblut	48 h*	48 h*
REHAK und CHIANG (1988)	Mensch	Vollblut	24 h*	24 h*
THOMAS (2005b)	Mensch	Serum	7 d	4 Wochen
VOIT (1993)	Mensch	Serum	n.u.	7 d*
THORESEN et al. (1992)	Hund	Vollblut Serum Heparin-Plasma	2 d** 3 d*/** 3 d*/**	n.u. n.u. n.u.
LINDNER (1991)	Pferd	Vollblut Heparin-Plasma	4 d* 4 d*	4 d* 4 d*
SAEED et al. (1995)	Kamel	Serum	7 d	7 d
DAVY et al. (1984)	Seidenäffchen	Heparin-Plasma	< 24 h	48 h*

* = Versuchsende; ** = Lagerung Tag 0 bis Tag 1 bei 4°C; n.u. = nicht untersucht

Serum:

Im humanen Serum verhielt sich dieser Parameter bei unterschiedlichen Lagerungsdauern bis zu sieben Tagen sowohl bei Raum- als auch bei Kühlschranktemperatur stabil (VOIT, 1993; DONNELLY et al., 1995; BOYANTON und BLICK, 2002). THOMAS (2005b) gibt für die Lagerung der Proben bei Raumtemperatur eine Stabilität von sieben Tagen und bei 4°C von bis zu einem Monat an. Im Heparinplasma konnte von KELLER (1975) eine geringe Zunahme der Proteinkonzentration bei Lagerung bei Raumtemperatur beobachtet werden.

Im cameliden Serum zeigte sich dieser Parameter über sieben Tage stabil (SAEED et al., 1995). Im Serum von Hunden (THORESEN et al., 1992) und Plasma von Pferden (LINDNER, 1991) blieb dieser Parameter bei Lagerung ebenfalls unverändert. Der Proteingehalt im Plasma von Seidenäffchen war nur bei 4°C stabil, während bei Raumtemperatur nach 24 Stunden Lagerung ein Anstieg verzeichnet werden konnte, der nach 48 Stunden wieder abgefallen war (DAVY et al., 1984).

Als höchstzulässige Untersuchungszeit für Gesamteiweiß im bovinen Serum werden fünf Tage angegeben (GRÜNDER, 1991). Bei TASKER (1978) blieb der Proteingehalt im Rinderserum sogar über zehn Tage bei Raum- oder Kühlschranktemperatur stabil.

Mögliche Störfaktoren:

Die Analyse des Proteingehaltes kann durch verschiedene Einflussgrößen gestört werden. Leicht abweichende Werte finden sich unter anderem im Blutplasma und -serum, da im Plasma noch Fibrinogen enthalten ist (KRAFT und DÜRR, 2005d; THOMAS, 2005b). Des Weiteren kann der Proteingehalt nach einer Stauung von über drei Minuten bis zu 10% ansteigen (THOMAS, 2005b). Zusätzlich konnten RIETSCHEL et al. (1975) zeigen, dass der Proteingehalt beim Rind durch die Blutentnahme an sich und dem damit verbundenen Stress ansteigt. Auf Grund der großen Streuung dieses Parameters im physiologischen Bereich ergaben sich jedoch keine signifikanten Veränderungen (RIETSCHEL et al., 1975).

In hämolytischen Proben wird ein höherer Proteingehalt gemessen (TASKER, 1978; EL-SEBAIE und HOFMANN, 1981), da Hämoglobin zum einen selbst ein Protein ist und zum anderen die spektrale Analyse stört (GRAFMEYER et al., 1995). Laut THOMAS (2005b) täuschen schon 0,8 g Hb/l eine 2%ige Proteinerhöhung vor. Im Gegensatz dazu konnten SONNTAG (1986) und JACOBS et al. (1992) keinen Einfluss von Hämoglobin auf die Bestimmung des Proteingehaltes nachweisen.

Lipämie hat keinen Einfluss auf die Protein-Analyse (GRAFMEYER et al., 1995). Laut THOMAS (2005b) werden jedoch in stark lipämischen Seren erhöhte Proteinwerte durch Trübung des Ansatzes gemessen. Auch JACOBS et al. (1992) konnten im Serum von Rindern und Pferden ansteigende Proteinwerte bei der Zugabe von Lipiden nachweisen.

Erhöhte Bilirubinwerte in den Proben haben keinen Einfluss auf die Analyse des Proteingehaltes (GRAFMEYER et al., 1995). Dagegen berichtet THOMAS (2005b) von falsch-hohen Proteinwerten bei Bilirubinkonzentrationen $> 5 \text{ mg/dl}$ ($85 \mu\text{mol/l}$), wenn in der Biuretreaktion kein Leerwert ohne Kupfersulfat mitgeführt wird.

2.3.5.6 Cholesterin

(siehe Tabelle 2.9)

Vollblut:

Im humanen Vollblut zeigte sich Cholesterin als stabiler Parameter (KELLER, 1975; LAESSIG et al., 1976a; ONO et al., 1981; REHAK und CHIANG, 1988; ZHANG et al., 1998; CLARK et al., 2003). Einige Studien zeigten bei Raumtemperaturlagerung einen Anstieg des Cholesteringehaltes (HEINS et al., 1995; BOYANTON und BLICK, 2002), was auf die kontinuierliche Cholesterinfreisetzung aus den Blutzellen mittels Lecithin zurückgeführt wurde (BOYANTON und BLICK, 2002).

Im Vollblut von Pferden (LINDNER, 1991) und Hunden (THORESEN et al., 1992) blieb der Cholesteringehalt ebenfalls stabil.

Bei der Lagerung von bovinem Vollblut bei Raum- oder Kühlschranktemperatur blieb der Cholesteringehalt bis zu vier Tage stabil (TASKER, 1978; FONTAINE et al., 1987b). Dahingegen beobachtete VON BENTEN (1972) bis zum zweiten Tag der Lagerung einen allmählichen Anstieg im Cholesteringehalt, der am dritten Tag wieder abfiel.

Serum:

Bei der Lagerung von humanem Serum bei Raum- oder Kühlschranktemperatur verhielt sich Cholesterin stabil (KELLER, 1975; REHAK und CHIANG, 1988; DONNELLY et al., 1995; EVANS et al., 1995; BOYANTON und BLICK, 2002; O'KEANE und CUNNINGHAM, 2006). HEINS et al. (1995) konnten jedoch bei Raumtemperaturlagerung nach drei Tagen einen Anstieg der Werte verzeichnen. Auch HARTLEY und DAVID (1992) konnten nach 24 Stunden bei 4°C einen signifikanten Anstieg im Cholesteringehalt feststellen, was auf die Erwärmung der Proben auf Raumtemperatur und eine damit möglicherweise einhergehende Zerstörung von cholesterinhaltigen Partikeln zurückgeführt wurde.

Im cameliden Serum verhielt sich Cholesterin bei Raum- und Kühlschranktemperatur über neun Tage hinweg stabil (SAEED et al., 1995). Auch im Serum von Hunden (THORESEN et al., 1992) und Heparinplasma von Pferden (LINDNER, 1991) konnten bei der Lagerung keine Abweichungen des Cholesteringehaltes festgestellt werden.

Für bovines Serum wird eine höchstzulässige Untersuchungszeit von fünf Tagen angegeben (GRÜNDER, 1991). Auch FREITAG (1964) konnte innerhalb einer Woche bei 4°C keine signifikanten Abweichungen der Cholesterinkonzentration nachweisen, während bei VON BENTEN (1972) nach einem Tag ein geringradiger Anstieg der Werte mit einem Abfall bis zum dritten Tag der Untersuchung zu beobachten war.

Mögliche Störfaktoren:

Anhaltender Venenstau erzeugt eine Hämokonzentration (AUFENANGER und ZAWTA, 1999). Ein dreiminütiger Venenstau bewirkt daher eine Cholesterinerhöhung von bis zu 10% (RIESEN, 2005).

Erhöhte Bilirubinwerte interferieren mit enzymatischen Bestimmungsmethoden des Cholesterins (AUFENANGER und ZAWTA, 1999; RIESEN, 2005), was sich auf die Ergebnisse einiger Analysegeräte auswirkt (GRAFMEYER et al., 1995).

Hämolyse wirkt nicht störend auf die Cholesterinbestimmung im humanen Serum (SONNTAG, 1986; GRAFMEYER et al., 1995). In Blutproben von Rindern konnte TASKER (1978) jedoch einen signifikanten Anstieg des Cholesterins bei starker Hämolyse nachweisen. Auch JACOBS et al. (1992) konnten einen Anstieg der Cholesterinkonzentration durch die Zugabe von Hämoglobin zum Serum von Rind, Pferd, Hund und Katze nachweisen.

Antikoagulantien erzeugen eine Verschiebung von Wasser aus den Zellen in das Plasma, wodurch die Plasmakonzentration von Makromolekülen verdünnt wird (AUFENANGER und ZAWTA, 1999). Daher kann im Serum eine etwa 3% höhere Cholesterinkonzentration als im EDTA-Plasma gemessen werden (LABORATORY METHODS COMMITTEE, 1977; AUFENANGER und ZAWTA, 1999; RIESEN, 2005). Dieser osmotische Effekt ist abhängig von der EDTA-Konzentration und damit auch vom Füllungszustand des Probenröhrchens (CLOEY et al., 1990; COOPER et al., 1992). Bei CLOEY et al. (1990) lag der Cholesteringehalt im EDTA-Plasma um 4,7% niedriger als im Serum, während er im Heparinplasma nur um 0,5% erniedrigt war. WICKUS und DUKERSCHEIN (1992) konnten im EDTA-Plasma nur eine Serumdifferenz von 1,3% ausmachen, die auch bei unzureichend gefüllten Probenröhrchen nicht anstieg. AUFENANGER und ZAWTA (1999) beobachteten keine signifikante Differenz zwischen Serum und Heparinplasma, während Zitrat den Cholesteringehalt um 14% und Fluorid um 18% reduzierten. Bei Verwendung von Fluorid wurden auch im Plasma von Rindern (TASKER, 1978) und Schafen (MORRIS et al., 2002) erniedrigte Cholesterinwerte gemessen.

Tab. 2.9: Literaturangaben zur Stabilität von Cholesterin in Blutproben.

Autor (en)	Spezies	Material	RT	KT
VON BENTEN (1972)	Rind	Vollblut Serum	3 d* 3 d*	3 d* 3 d*
FONTAINE et al. (1987b)	Rind	Vollblut	96 h*	96 h*
FREITAG (1964)	Rind	Serum	n.u.	7 d*
GRÜNDER (1991)	Rind	Serum	n.u.	5 d
TASKER (1978)	Rind	Vollblut Serum	3 d* 10 d*	3 d* 10 d*
BOYANTON und BLICK (2002)	Mensch	Vollblut Serum	56 h* 56 h*	n.u. n.u.
CLARK et al. (2003)	Mensch	EDTA-Vollblut	7 d*	7 d*
DONNELLY et al. (1995)	Mensch	Serum	4 Monate*	4 Monate*
EVANS et al. (1995)	Mensch	Serum (mit Konser- vierungsmitteln)	n.u.	10 d*
HEINS et al. (1995)	Mensch	Vollblut Serum	3 d 3 d	7 d* 7 d*
KELLER (1975)	Mensch	Heparin-Vollblut Heparin-Plasma	96 h* 96 h*	n.u. n.u.
LAESSIG et al. (1976a)	Mensch	Vollblut	48 h*	n.u.
O'KEANE und CUNNINGHAM (2006)	Mensch	Serum	48 h*	48 h*
ONO et al. (1981)	Mensch	Vollblut	48 h*	48 h*
REHAK und CHIANG (1988)	Mensch	Vollblut	24 h*	24 h*
RIESEN (2005)	Mensch	Serum	n.u.	4 d
THORESEN et al. (1992)	Hund	Vollblut Serum Heparin-Plasma	3 d** 3 d** 3 d**	n.u. n.u. n.u.
LINDNER (1991)	Pferd	Vollblut Heparin-Plasma	4 d* 4 d*	4 d* 4 d*
SAEED et al. (1995)	Kamel	Serum	9 d*	9 d*

* = Versuchsende; ** = Lagerung Tag 0 bis Tag 1 bei 4°C; n.u. = nicht untersucht

2.3.5.7 Harnstoff im Serum

(siehe Tabelle 2.10)

Vollblut:

Im humanen Vollblut blieb der Harnstoffgehalt bei Lagerung bei 32°C über 24 Stunden unverändert (ZHANG et al., 1998). Bei Kühlschranktemperatur blieb dieser Parameter über eine Untersuchungsdauer von sieben Tagen ebenfalls stabil (HEINS et al., 1995). Bei Raumtemperatur-Lagerung konnte nach 24 Stunden ein leichter Anstieg von 6% beobachtet werden, der mit einer Hämokonzentration durch Wasserverlust an die Zellen erklärt wurde (BOYANTON und BLICK, 2002). HEINS et al. (1995) konnten erst nach zwei Tagen bei Raumtemperatur einen Anstieg des Harnstoffgehaltes verzeichnen. Dies wurde auf die Abspaltung von Ammoniak aus basischen Aminosäuren zurückgeführt, der bei Harnstoffanalysen mit Urease interferiert (HEINS et al., 1995; O'KEANE und CUNNINGHAM, 2006).

Im equinen Vollblut verhielt sich Harnstoff bei Raum- und Kühlschranktemperatur über vier Tage stabil (LINDNER, 1991). Dies wurde auch für canine Vollblutproben bei dreitägiger Lagerung bei Raumtemperatur beschrieben (THORESEN et al., 1992).

Bei der Lagerung von Rinder-Vollblut über drei Tage bei Raum- und Kühlschranktemperatur blieb der Harnstoffgehalt stabil (WITTEWERT et al., 1986).

Serum:

Im humanen Serum ist Harnstoff sowohl bei Raum- als auch bei Kühlschranktemperatur ein stabiler Parameter (VOIT, 1993; HEINS et al., 1995; BOYANTON und BLICK, 2002). O'KEANE und CUNNINGHAM (2006) konnten in Serum-Röhrchen mit Trenngel über 48 Stunden bei Raumtemperatur einen Anstieg von 6% nachweisen.

Im caninen Serum blieb Harnstoff bei Raumtemperatur-Lagerung stabil (THORESEN et al., 1992). Im Pferdeplasma konnten ebenfalls keine Veränderungen beobachtet werden (LINDNER, 1991).

Für Rinderserum wird eine höchstzulässige Untersuchungszeit von 36 Stunden bei 4°C angegeben (GRÜNDER, 1991).

Mögliche Störfaktoren:

Eine Analyseinterferenz durch Hämolyse der Proben konnte nicht nachgewiesen werden (GRAFMEYER et al., 1995; SONNTAG, 1986).

Tab. 2.10: Literaturangaben zur Stabilität von Harnstoff in Blutproben.

Autor (en)	Spezies	Material	RT	KT
GRÜNDER (1991)	Rind	Serum	n.u.	36 h
WITTEW et al. (1986)	Rind	Vollblut	72 h*	72 h*
BOYANTON und BLICK (2002)	Mensch	Vollblut Serum	56 h* 56 h*	n.u. n.u.
HEINS et al. (1995)	Mensch	Vollblut Serum	2 d 7 d*	7 d* 7 d*
O'KEANE und CUNNINGHAM (2006)	Mensch	Serum	48 h*	48 h*
VOIT (1993)	Mensch	Serum	n.u.	7 d*
THORESEN et al. (1992)	Hund	Vollblut Serum Heparin-Plasma	3 d ^{*/**} 3 d ^{*/**} 3 d ^{*/**}	n.u. n.u. n.u.
LINDNER (1991)	Pferd	Vollblut Heparin-Plasma	4 d* 4 d*	4 d* 4 d*

* = Versuchsende; ** = Lagerung Tag 0 bis Tag 1 bei 4°C; n.u. = nicht untersucht

2.3.5.8 β -Hydroxybuttersäure (BHBS)

(siehe Tabelle 2.11)

Vollblut:

Untersuchungen zur Stabilität der β -Hydroxybuttersäure in Blutproben stammen vorwiegend aus der Humanmedizin. Bei CUSTER et al. (1983) zeigte sich die BHBS als sehr stabiler Parameter im Vollblut, Serum und Natrium-Fluorid-Plasma. Bei der Lagerung über zwei Tage bei Raumtemperatur blieb die BHBS im Vollblut stabil. LAUN et al. (2001) zeigten, dass die BHBS-Konzentration bereits nach sechs Stunden bei der Lagerung als Vollblut mit EDTA-Zusatz um 10% abfällt, unabhängig von der Lagerung bei Raumtemperatur oder auf Eis. Laut SACKS et al. (2002) ist die BHBS in Vollblutproben bei 4°C über 24 Stunden stabil. THOMAS (2005a) gibt hierfür nur eine Stabilität von vier Stunden im humanen Vollblut an.

Im Schafblut konnten MORRIS et al. (2002) bei Lagerung bei 4°C einen Abfall der BHBS-Konzentration ausmachen.

Für die BHBS im Vollblut von Rindern konnte eine Stabilität von 24 Stunden bei Raum- und Kühlschranktemperatur ermittelt werden (STOKOL und NYDAM, 2005).

Serum:

Im gefrorenen humanem Serum zeigte sich die BHBS über mehrere Wochen stabil (FRITZSCHE et al., 2001; SACKS et al., 2002). Bei Lagerung des Serums oder Plasmas bei 4°C zeigten SACKS et al. (2002) eine Stabilität bis zu einer Woche, während THOMAS (2005a) hierfür nur 48 Stunden angibt.

Bei der Untersuchung von Rinderblut fanden STOKOL und NYDAM (2005) sowohl bei Raum- als auch bei Kühlschranktemperatur eine BHBS-Stabilität von 72 Stunden im Serum und Plasma. Auch WHITAKER (1996) erklärt die BHBS für stabil im Rinderblut.

Mögliche Störfaktoren:

Für die Bestimmung der BHBS können laut SACKS et al. (2002) alle gebräuchlichen Antikoagulantien (Heparin, EDTA, Fluorid, Zitrat, Oxalat) verwendet werden. Bei CUSTER et al. (1983) stellte sich heraus, dass die BHBS-Konzentration im Natrium-Fluorid-Plasma im Vergleich zu Proben ohne Antikoagulanzen niedriger liegt. Auch MORRIS et al. (2002) konnten für Schafblut nachweisen, dass die Serumwerte im Durchschnitt 7% höher liegen als die BHBS-Werte aus den korrespondierenden Natrium-Fluorid-Proben. STOKOL und NYDAM (2005) fanden keine Auswirkungen auf die Konzentration der BHBS durch die Wahl des Probenotyps (EDTA, Heparin, ohne Zusätze).

Hämolyse, Lipämie und Bilirubinämie führen bei bovinen Seren zu artifiziell erhöhten BHBS-Messwerten (JACOBS et al., 1992).

Tab. 2.11: Literaturangaben zur Stabilität der BHBS in Blutproben.

Autor (en)	Spezies	Material	RT	KT
STOKOL und NYDAM (2005)	Rind	Vollblut Serum	24 h* 72 h*	24 h* 72 h*
CUSTER et al. (1983)	Mensch	Vollblut Serum NaF-Plasma	2 d 7 d* 7 d*	7 d* 7 d* 7 d*
LAUN et al. (2001)	Mensch	EDTA-Vollblut EDTA-Plasma	6 h < 3 d	6 h < 3 d
SACKS et al. (2002)	Mensch	Vollblut Serum	k.A. k.A.	24 h 7 d
THOMAS (2005a)	Mensch	Vollblut Serum/Plasma	k.A. k.A.	4 h 48 h

* = Versuchsende; k.A. = keine Angaben

2.3.5.9 Freie Fettsäuren (NEFA)

(siehe Tabelle 2.12)

Vollblut:

Bei der Lagerung von humanem Vollblut fanden MCGANN und HODSON (1991) einen Anstieg der NEFA-Werte innerhalb von 24 Stunden bei Lagerung bei 4°C und 20°C. Da sie mehrere Analysen in dieser Zeit durchgeführt hatten, konnten sie zusätzlich zeigen, dass die NEFA-Werte im Vollblut nicht generell ansteigen, sondern zuerst abfallen und innerhalb einer Stunde wieder zum Ausgangswert ansteigen. Dies erklärten sie damit, dass die kontinuierliche Zuführung von Freien Fettsäuren durch Lipolyse gleichzeitig mit dem NEFA-Verbrauch der Blutzellen einhergeht (MCGANN und HODSON, 1991).

Die Lagerung von bovinem Vollblut bei 4°C und 20°C zeigte bei BRENNER und REINHARD (1976) eine Zunahme der NEFAs, wobei sich der Gehalt innerhalb von 24 Stunden um durchschnittlich 30% erhöhte. Bei STOKOL und NYDAM (2005) waren die NEFAs über 24 Stunden bei 4°C stabil. Zusätzlich stellten sie fest, dass die NEFA-Konzentration in den Proben, die bei Raumtemperatur gelagert wurden, generell höher war. WHITAKER (1996) erklärte die NEFAs für bis zu 48 Stunden stabil, da sie danach anstiegen.

Serum:

Im humanen Serum konnte eine kontinuierliche Zunahme der Freien Fettsäuren bei Lagerung bei Raum- oder Kühlschrankschranktemperatur beobachtet werden, deren Stärke von der Lipaseaktivität und der Triglyceridkonzentration im Serum abhängig war (FORBES und CAMLIN, 1959; GUDER und WISSER, 1990; VOIT, 1993; MENÉNDEZ et al., 2001). Bei Seren mit erhöhtem Neutralfettgehalt wurden schon innerhalb der ersten Stunden teilweise erhebliche Mengen an Freien Fettsäuren freigesetzt (BRAUN, 1971). Bei tiefgefrorenen Seren ändert sich die Konzentration der Freien Fettsäuren nicht (BRAUN, 1971; GLEESON, 1987; MENÉNDEZ et al., 2001). Bei den Untersuchungen von BRAUN (1971) konnte bei einigen Seren ein Abfall der Konzentration an Freien Fettsäuren innerhalb der ersten 8 Stunden nachgewiesen werden, was auf die mögliche Bildung von schwerlöslichen Erdalkalisalzen unter bestimmten Bedingungen zurückgeführt wurde.

Im Serum von Schafen wurde ein Anstieg der NEFA-Konzentration bei Lagerung bei 4°C beobachtet (MORRIS et al., 2002).

Im bovinen Serum zeigten sich die Freien Fettsäuren über 72 Stunden bei 4°C und 24 Stunden bei 20°C stabil (STOKOL und NYDAM, 2005). Bei BRENNER und REINHARD (1976) blieben die NEFAs keine 24 Stunden bei Kühlschrankschranktemperatur stabil.

Tab. 2.12: Literaturangaben zur Stabilität der NEFAs in Blutproben.

Autor (en)	Spezies	Material	RT	KT
BRENNER und REINHARD (1976)	Rind	Serum	2,5 h	< 24 h
		EDTA-Plasma	1,5 h	24 h
		EDTA-Vollblut	< 24 h	24 h
STOKOL und NYDAM (2005)	Rind	Vollblut	< 24 h	24 h*
		Serum	24 h	3 d*
WHITAKER (1996)	Rind	Vollblut	48 h	48 h
BROECHOVEN und PARIJS (1968)	Mensch	Plasma	24 h	17 d*
FORBES und CAMLIN (1959)	Mensch	Serum	< 24 h	< 24 h
MENÉNDEZ et al. (2001)	Mensch	Serum	< 24 h	48 h
		EDTA-Plasma	< 24 h	48 h
TRICHOPOULOU et al. (1976)	Mensch	Heparin-Plasma	n.u.	< 24 h
VOIT (1993)	Mensch	Serum	n.u.	< 7 d

* = Versuchsende; n.u. = nicht untersucht

Mögliche Störfaktoren:

Die Verwendung von Antikoagulantien hat keinen Einfluss auf die Stabilität der NEFAs (BRENNER und REINHARD, 1976; MORRIS et al., 2002; STOKOL und NYDAM, 2005). Der Anstieg der Freien Fettsäuren im Heparinplasma ist jedoch stärker als im EDTA-Plasma oder Serum (GLEESON, 1987). GLEESON (1987) wies nach, dass bei steigender Heparinzugabe auch die Freien Fettsäuren im Plasma stärker ansteigen. MCGANN und HODSON (1991) fanden keine Lipaseaktivierung durch die Verwendung von Heparin als Antikoagulanzen, da sie bei ihren Untersuchungen einen gleichartigen Anstieg der Freien Fettsäuren im Serum und Heparinplasma beobachteten. Bei der Verwendung von Natrium-Zitrat ließ sich eine Erhöhung der NEFAs durch eine mögliche Aktivierung der Lipaseaktivität feststellen (BRENNER und REINHARD, 1976).

Im Serum war im Vergleich zu Plasma ein höherer Gehalt an Freien Fettsäuren zu finden (BRENNER und REINHARD, 1976; MORRIS et al., 2002; STOKOL und NYDAM, 2005). Dies wurde auf die Wirkung von lipolytischen oder esterauflösenden Enzymen (wie z.B. Lecithinasen) während der Gerinnung zurückgeführt oder auf die mögliche Hemmung dieser Reaktionen durch EDTA (STOKOL und NYDAM, 2005). Laut BRENNER und REINHARD (1976) hängt dies mit dem Zeitpunkt der Serumgewinnung zusammen, da bei der Lagerung von Vollblut der Gehalt der Freien Fettsäuren stärker ansteigt als im abgetrennten Serum und Plasma.

Im bovinen Serum konnte eine leichte, aber signifikant höhere NEFA-Konzentration in SST-Röhrchen verglichen mit Röhrchen ohne Zusätzen festgestellt werden, was auf ein mögliches Produkt des Silikongeles zurückgeführt wurde (STOKOL und NYDAM, 2005).

Um eine Lipolyse *in vitro* zu verhindern, kann der Cholinesterasehemmer Paraoxon eingesetzt werden, der bei einer Konzentration von 0,4 µl/ml Blut die Lipolyseaktivität in Plasmaproben komplett unterdrücken kann (DEGEN und VAN DER VIES, 1985). Paraoxon selber hat keinen Effekt auf die Bestimmung der Freien Fettsäuren (ZAMBON et al., 1993). Da es sich bei Paraoxon um ein Neurotoxin handelt, untersuchten KREBS et al. (2000) als möglichen Ersatz Tetrahydrolipstatin (THL). THL zeigte sich als potenter Hemmstoff der *in vitro*-Lipolyse, ohne bei der Analyse zu interferieren. Bei Lagerung bei 20°C blieb jedoch eine restliche lipolytische Aktivität trotz Zusatz von THL zurück, so dass auch bei Zusatz von THL eine Lagerung auf Eis empfohlen wurde, wenn eine sofortige Untersuchung nicht möglich ist (KREBS et al., 2000).

2.3.5.10 Glukose

(siehe Tabelle 2.13)

Natrium-Fluorid:

Zur Bestimmung des Glukosegehaltes wird die Verwendung von Röhrchen, die Natrium-Fluorid (NaF) enthalten, empfohlen, da so die Glykolyse gehemmt wird (FERRANTE und KRONFELD, 1994; SACKS et al., 2002). NaF hemmt glykolytische Enzyme durch Bildung von Komplexen mit dem Kofaktor Magnesium (GUMINSKA und STERKOWICZ, 1976; CHRISTOPHER und O'NEILL, 2000; SACKS, 2006). Diese Röhrchen enthalten zumeist zusätzlich Kalium-Oxalat (KOx), um die Gerinnung zu hemmen (FERRANTE und KRONFELD, 1994).

Bei der Lagerung von humanen NaF-Proben wird die Glukose für 72 Stunden bei 4°C als stabil angesehen (SACKS et al., 2002). CHRISTOPHER und O'NEILL (2000) stellten über acht Stunden bei 25°C und 4°C ebenfalls keine signifikante Änderung des Glukosegehaltes in felinem NaF-Plasma fest, wobei die Konzentration im Plasma signifikant niedriger war als im Serum. FONTAINE et al. (1986, 1987a, 1987b, 1987c, 1987d) ermittelten in ihren Untersuchungen verschiedener Tierarten unterschiedliche Stabilitäten der Glukose im NaF-Plasma, die zwischen 12 und 96 Stunden variierten. Im Rinderblut konnten WITWER et al. (1986) in NaF-Proben eine Stabilität der Glukose über 72 Stunden beobachten.

Tab. 2.13: Literaturangaben zur Stabilität der Glukose in Blutproben.

Autor (en)	Spezies	Material	RT	KT
FONTAINE et al. (1987b)	Rind	Vollblut NaF-Vollblut	6 h 96 h*	36 h 96 h*
GRÜNDER (1991)	Rind	Vollblut Serum	k.A. k.A.	18 h 36 h
TASKER (1978)	Rind	Vollblut Serum	< 3 d 10 d*	< 3 d 10 d*
VON BENTEN (1972)	Rind	Vollblut Serum	< 24 h 3 d*	3 d* 3 d*
WITTWER et al. (1986)	Rind	Vollblut mit NaF/EDTA	72 h*	72 h*
BOYANTON und BLICK (2002)	Mensch	Vollblut Serum	< 24 h 56 h*	n.u. n.u.
DONNELLY et al. (1995)	Mensch	Serum	4 Monate*	4 Monate*
LAESSIG et al. (1976a)	Mensch	Vollblut	2 h	n.u.
ONO et al. (1981)	Mensch	Vollblut	4 h	8 h
SACKS et al. (2002)	Mensch	Serum	8 h	72 h
FONTAINE et al. (1986)	Hund	Vollblut NaF-Vollblut	k.A. k.A.	12 h 12 h
THORESEN et al. (1992)	Hund	Vollblut Serum Heparin-Plasma	n.u. 3 d ^{**} 3 d ^{**}	< 24 h n.u. n.u.
CHRISTOPHER und O'NEILL (2000)	Katze	Vollblut NaF-Vollblut	< 1 h 8 h*	8 h* 8 h*
FONTAINE et al. (1987c)	Katze	Vollblut NaF-Vollblut	k.A. k.A.	48 h 12 h
FONTAINE et al. (1987d)	Pferd	NaF-Vollblut	72 h	72 h
SAEED et al. (1995)	Kamel	Serum	3 d	6 d
FONTAINE et al. (1987a)	Schwein	NaF-Vollblut	96 h*	96 h*

* = Versuchsende; ** = Lagerung Tag 0 bis Tag 1 bei 4°C;

n.u. = nicht untersucht; k.A. = keine Angaben

Vollblut:

Bei der Lagerung von Vollblut sinkt der Glukosegehalt ab (ZHANG et al., 1998; CHRISTOPHER und O'NEILL, 2000; BOYANTON und BLICK, 2002; SACKS et al., 2002). Die Glykolyse der Zellen zur Energiegewinnung verbraucht Glukose, was zu einem Abfall der Konzentration im Blut führt (ZHANG et al., 1998). Dieser Konzentrationsabfall ist temperaturabhängig und bei 4°C verlangsamt (ONO et al., 1981; REHAK und CHIANG, 1988; ZHANG et al., 1998). Ab einer Lagerungstemperatur von 22°C ist der Abfall des Glukosegehaltes direkt proportional zur Lagerungstemperatur (REHAK und CHIANG, 1988). Im humanen Vollblut liegt die Glykolyse-rate bei 5-7% in 24 Stunden (SACKS et al., 2002), wobei sie bei Leukozytose und bakterieller Kontamination stark erhöht ist (ZHANG et al., 1998; SACKS, 2006). Die Glykolyse-rate des Rindes ist niedriger als beim Menschen (ARAI et al., 1995; CHRISTOPHER und O'NEILL, 2000).

Im humanen Vollblut fällt die Glukosekonzentration in den ersten 24 Stunden nach der Blutentnahme rasch und danach langsamer ab (BOYANTON und BLICK, 2002). Bei LAESSIG et al. (1976a) fiel der Glukosegehalt innerhalb von 24 Stunden um 30% ab. Klinisch relevante Änderungen der Glukosekonzentration in humanem Vollblut sind schon drei Stunden nach der Blutentnahme zu erwarten (ZHANG et al., 1998).

Beim Hund konnten Glukoseverluste von klinischer Relevanz nachgewiesen werden (THORESEN et al., 1992). Mit felinem Vollblut zeigten CHRISTOPHER und O'NEILL (2000), dass die Glukose in zentrifugierten Proben, bei denen das Serum auf dem Blutkuchen belassen wurde, keine signifikante Änderung bis zu 8 Stunden bei 4°C erfährt, während bei 25°C ein Abfall von 15% schon in der ersten Stunde beobachtet wurde.

Im bovinen Vollblut konnte bei Lagerung bei Raumtemperatur ein Abfall der Glukosewerte um 100% in drei Tagen nachgewiesen werden (VON BENTEN, 1972). FONTAINE et al. (1987b) wiesen nach 24 Stunden bei 20°C nur noch 74% der Glukosekonzentration des Ausgangswertes nach, während bei Lagerung bei 4°C nach 96 Stunden noch 84% vom Ausgangswert vorhanden waren. Als höchstzulässige Untersuchungszeit für Vollblut von Rindern gibt GRÜNDER (1991) 18 Stunden an.

Serum:

In humanem Serum blieb die Glukose 56 Stunden bei 25°C stabil (BOYANTON und BLICK, 2002). Bei DONNELLY et al. (1995) blieb die Glukose sogar über einen Untersuchungszeitraum von vier Monaten bei Kühlschranks- und Raumtemperatur stabil. SACKS et al. (2002) geben eine Stabilität von acht Stunden bei 25°C und 72 Stunden bei 4°C an.

Im Kamelserum wurde eine Stabilität der Glukose von sechs Tagen bei 4-5°C und von drei Tagen bei 23-25°C ermittelt (SAEED et al., 1995). Im Schafserum blieb die Glukose über sieben Tage bei 4°C stabil (MORRIS et al., 2002). Beim Hund zeigte die Glukose im Serum eine Stabilität von drei Tagen bei Lagerung bei Raumtemperatur (THORESEN et al., 1992).

Für Rinderserum wird eine höchstzulässige Untersuchungszeit von 36 Stunden bei 4°C angegeben (GRÜNDER, 1991). VON BENTEN (1972) wies einen geringgradigen Anstieg der Glukose im bovinen Serum nach, konnte dies jedoch nicht erklären.

Mögliche Störfaktoren:

Eine Hämolyse in den Proben hat keinen Einfluss auf die Messergebnisse (TASKER, 1978; SONNTAG, 1986).

Hohe Bilirubinwerte können die Glukosebestimmung stören, da Bilirubin als reduzierende Substanz bei der Oxidase-Peroxidase-Methode wirken kann (GRAFMEYER et al., 1995).

2.3.5.11 Natrium

(siehe Tabelle 2.14)

Vollblut:

Bei der Lagerung von humanem Vollblut blieb Natrium über 24 Stunden bei Temperaturen von 3 bis 38°C stabil (REHAK und CHIANG, 1988). BOYANTON und BLICK (2002) fanden einen insignifikanten Anstieg der Natriumkonzentration von 2% nach 24 Stunden, der auf der Bewegung von Wasser in die Zellen und damit einhergehender Hämokonzentration beruht. Bei O'KEANE und CUNNINGHAM (2006) stieg der Natriumgehalt nur um 1% über 48 Stunden an. HEINS et al. (1995) beobachteten einen Abfall der Werte, was sich mit der geringen Molekularmasse von Natrium und dem Eindringen in die Zellen auf Grund des Konzentrationsgradienten erklären lässt. Bei den Untersuchungen von ONO et al. (1981) fiel der Natriumgehalt bei Lagerung als Vollblut ab. Insgesamt zeigte sich Natrium im humanen Vollblut jedoch als stabiler Parameter (KELLER, 1975; LAESSIG et al., 1976a; ZHANG et al., 1998).

Im equinen Vollblut war über einen Untersuchungszeitraum von vier Tagen keine signifikante Änderung des Natriumgehaltes zu beobachten (LINDNER; 1991). Beim Hund konnte ein nicht signifikanter Anstieg im Vollblut nachgewiesen werden (THORESEN et al., 1992).

Natrium blieb bei der Lagerung von bovinem Vollblut stabil (TASKER, 1978; WITTEWITZ et al., 1986; FONTAINE et al., 1987b).

Serum:

Die Lagerung von humanem Serum zeigte Natrium als stabilen Analyten (VOIT, 1993; DONNELLY et al., 1995; HEINS et al., 1995; O'KEANE und CUNNINGHAM, 2006).

Im caninen Serum stellte sich Natrium ebenfalls als stabiler Parameter dar, jedoch wurden im Vergleich zu Heparinplasma niedrigere Werte ermittelt (THORESEN et al., 1992).

Im bovinem Serum verhielt sich Natrium stabil (TASKER, 1978). Als höchstzulässige Untersuchungszeit werden fünf Tage angegeben (GRÜNDER, 1991).

Tab. 2.14: Literaturangaben zur Stabilität von Natrium in Blutproben.

Autor (en)	Spezies	Material	RT	KT
FONTAINE et al. (1987b)	Rind	Vollblut	96 h*	96 h*
GRÜNDER (1991)	Rind	Serum	k.A.	5 d
TASKER (1978)	Rind	Vollblut Serum	3 d* 10 d*	3 d* 10 d*
WITTWER et al. (1986)	Rind	Vollblut	72 h*	72 h*
BOYANTON und BLICK (2002)	Mensch	Vollblut Serum	56 h* 56 h*	n.u. n.u.
DONNELLY et al. (1995)	Mensch	Serum	4 Monate*	4 Monate*
HEINS et al. (1995)	Mensch	Vollblut Serum	7 d* 7 d*	1 d 7 d*
KELLER (1975)	Mensch	Heparin-Vollblut Heparin-Plasma	96 h* 96 h*	n.u. n.u.
LAESSIG et al. (1976a)	Mensch	Vollblut	48 h*	48 h*
O'KEANE und CUNNINGHAM (2006)	Mensch	Serum	48 h*	48 h*
ONO et al. (1981)	Mensch	Vollblut	6 h	48 h
REHAK und CHIANG (1988)	Mensch	Vollblut	24 h*	24 h*
VOIT (1993)	Mensch	Serum	n.u.	7 d*
THORESEN et al. (1992)	Hund	Vollblut Serum Heparin-Plasma	2 d** 3 d*/** 3 d*/**	n.u. n.u. n.u.
LINDNER (1991)	Pferd	Vollblut Heparin-Plasma	4 d* 4 d*	4 d* 4 d*

* = Versuchsende; ** = Lagerung Tag 0 bis Tag 1 bei 4°C;

n.u. = nicht untersucht; k.A. = keine Angaben

Mögliche Störfaktoren:

Eine Hämolyse hat keinen Effekt auf das Untersuchungsergebnis (TASKER, 1978; SONNTAG, 1986). Bei EL-SEBAIE und HOFMANN (1981) verursachte jedoch eine starke Hämolyse einen signifikanten Anstieg des Natriumgehaltes im Rinderserum, während geringgradige Hämolysen ohne Auswirkungen blieben.

2.3.5.12 Kalium

(siehe Tabelle 2.15)

Vollblut:

Im humanen Vollblut steigt der Kaliumgehalt bei Lagerung bei Kühlschrank- oder Raumtemperatur an (HEINS et al., 1995). Signifikante Änderungen konnten bei 4°C schon nach vier Stunden und bei 23°C nach 24 Stunden beobachtet werden (KELLER, 1975; ONO et al., 1981; BOYANTON und BLICK, 2002). Bei ZHANG et al. (1998) überschritt Kalium bereits nach drei Stunden bei 4°C die klinisch akzeptable Grenze. Nach 24 Stunden konnte bei dieser Temperatur ein Anstieg von 100% ermittelt werden (GUDER und WISSER, 1990).

Im equinen Vollblut konnte ein Anstieg der Kaliumgehalte im Serum erst zwei Tage nach der Blutentnahme festgestellt werden, während sie bei Kühlschranktemperatur schon einen Tag nach der Blutentnahme deutlich angestiegen waren (LINDNER, 1991). Im caninen Vollblut blieb Kalium bei 4°C keine 24 Stunden stabil (THORESEN et al., 1992).

Im Vollblut von Rindern war ein progressiver Anstieg der Kaliumkonzentration während der Lagerung zu beobachten, der bei Raumtemperatur stärker war (TASKER, 1978; WITTEWITZ et al., 1986). Bei FONTAINE et al. (1987b) blieb Kalium im bovinen Vollblut sowohl bei Raum- als auch bei Kühlschranktemperatur über 24 Stunden stabil.

Serum:

Im abzentrifugierten humanen Serum verhält sich Kalium sowohl bei Raum- als auch bei Kühlschranktemperatur stabil (DONNELLY et al., 1995; HEINS et al., 1995; BOYANTON und BLICK, 2002). Bei der Lagerung bei 4°C in Trennröhrchen konnte VOIT (1993) eine Zunahme der Kaliumkonzentration von 77% innerhalb von sieben Tagen nachweisen. Bei einer schichtartigen Analyse zeigte sich, dass der Kaliumgehalt innerhalb dieser Röhrchen zum Trenngel hin anstieg. Bei O'KEANE und CUNNINGHAM (2006) zeigte sich Kalium als stabiler Parameter bei der Lagerung des Serums auf dem Gel von Trennröhrchen.

Im caninen Serum blieb Kalium über eine Untersuchungszeit von drei Tagen stabil, wobei die Serumgehalte im Vergleich zu Heparinplasma klinisch relevant höher lagen (THORESEN et

al., 1992). Diese Diskrepanz könnte mit der Gerinnung, die vor der Abzentrifugation des Serums stattfindet, zusammenhängen (KALSHEKER und JONES, 1984).

Im separierten bovinen Serum konnte über zehn Tage hinweg bei Raumtemperatur ein moderater und bei Kühlschranktemperatur ein schwacher Anstieg des Kaliumgehaltes nachgewiesen werden (TASKER, 1978). Als höchstzulässige Untersuchungszeit von bovinem Serum werden fünf Tage bei 4°C angegeben (GRÜNDER, 1991).

Tab. 2.15: Literaturangaben zur Stabilität von Kalium in Blutproben.

Autor (en)	Spezies	Material	RT	KT
FONTAINE et al. (1987b)	Rind	Vollblut	24 h	24 h
GRÜNDER (1991)	Rind	Serum	k.A.	5 d
WITTEWERT et al. (1986)	Rind	Vollblut	< 24 h	< 24 h
BOYANTON und BLICK (2002)	Mensch	Vollblut Serum	24 h 56 h*	n.u. n.u.
DONNELLY et al. (1995)	Mensch	Serum	4 Monate*	4 Monate*
HEINS et al. (1995)	Mensch	Vollblut Serum	1 d 7 d*	1 d 7 d*
KELLER (1975)	Mensch	Heparin-Vollblut Heparin-Serum	< 24 h 96 h*	n.u. n.u.
LAESSIG et al. (1976a)	Mensch	Vollblut	8 h	n.u.
O'KEANE und CUNNINGHAM (2006)	Mensch	Serum	48 h*	48 h*
ONO et al. (1981)	Mensch	Vollblut	24 h	4 h
THORESEN et al. (1992)	Hund	Vollblut Serum Heparin-Plasma	n.u. 3 d ^{*/**} 3 d ^{*/**}	< 24 h n.u. n.u.
LINDNER (1991)	Pferd	Vollblut Heparin-Plasma	1 d 4 d*	< 24 h 4 d*

* = Versuchsende; ** = Lagerung Tag 0 bis Tag 1 bei 4°C;

n.u. = nicht untersucht; k.A. = keine Angaben

Mögliche Störfaktoren:

Ein Kaliumanstieg im Serum kann *in vivo* durch Stress und Angst vor der bevorstehenden Blutentnahme erzeugt werden (STANKOVIC und SMITH, 2004).

Die Messwerte von Kalium werden durch alle Grade von Hämolyse beeinflusst (EL-SEBAIE und HOFMANN, 1981; SONNTAG, 1986; STANKOVIC und SMITH, 2004). Der Effekt einer Hämolyse auf die Kaliumkonzentration wurde vor allem bei Großtieren beobachtet, da die Erythrozyten von kleineren Tieren wie Hunde und Katzen geringere Konzentrationen an Kalium beinhalten (TASKER, 1978). Beim Rind kann daher auch eine geringfügige Hämolyse, die im klinischen Alltag übersehen wird, eine erhebliche Erhöhung der Kaliumkonzentration verursachen (MARTENS, 1995).

Eine Erhöhung der Kaliumkonzentration kann neben einer Hämolyse auch auf der Lysis anderer Zellen wie Thrombozyten und Leukozyten beruhen (STANKOVIC und SMITH, 2004).

Die Rezentrifugation von Blutproben kann den Kaliumgehalt im Serum erhöhen (VOIT, 1993; HIRA et al., 2001; O'KEANE und CUNNINGHAM, 2006).

2.3.5.13 Kalzium

(siehe Tabelle 2.16)

Vollblut:

Bei vielen Untersuchungen von humanem Vollblut verhielt sich Kalzium stabil (LAESSIG et al., 1976a; HEINS et al., 1995; ZHANG et al., 1998; BOYANTON und BLICK, 2002). Ein Temperatureinfluss war innerhalb von 24 Stunden nicht nachweisbar (REHAK und CHIANG, 1988). ONO et al. (1981) stellten nach 24 Stunden einen temperaturabhängigen Anstieg des Kalziumgehaltes in Vollblutproben fest. HEINS et al. (1995) beobachteten nach drei Tagen bei Raumtemperatur einen Abfall, der mit der geringen Molekularmasse erklärt wurde, wodurch Kalzium mit dem Konzentrationsgefälle in die Erythrozyten diffundiert.

Im equinen Vollblut blieb Kalzium bei der Lagerung stabil (LINDNER, 1991). Im Vollblut von Hunden war innerhalb von 24 Stunden ein signifikanter Abfall nachweisbar (THORESEN et al., 1992).

Bei der Lagerung von bovinem Vollblut über mehrere Tage blieb Kalzium sowohl bei Raum- als auch bei Kühlschranktemperatur stabil (TASKER, 1978; WITTEWITZ et al., 1986; FONTAINE et al., 1987b). Als höchstzulässige Untersuchungszeit werden fünf Tage angegeben (GRÜNDER, 1991).

Tab. 2.16: Literaturangaben zur Stabilität von Kalzium in Blutproben.

Autor (en)	Spezies	Material	RT	KT
FONTAINE et al. (1987b)	Rind	Vollblut	96 h*	96 h*
GRÜNDER (1991)	Rind	Serum	k.A.	5 d
TASKER (1978)	Rind	Vollblut Serum	3 d* 10 d*	3 d* 10 d*
WITTEWERT et al. (1986)	Rind	Vollblut	72 h*	72 h*
BOYANTON und BLICK (2002)	Mensch	Vollblut Serum	56 h* 56 h*	n.u. n.u.
DONNELLY et al. (1995)	Mensch	Serum	4 Monate*	4 Monate*
GUDER et al. (1996)	Mensch	Serum	7 d	3 Wochen
HEINS et al. (1995)	Mensch	Vollblut Serum	3 d 7 d*	7 d* 7 d*
LAESSIG et al. (1976a)	Mensch	Vollblut	48 h*	n.u.
ONO et al. (1981)	Mensch	Vollblut	24 h	24 h
REHAK und CHIANG (1988)	Mensch	Vollblut	24 h*	24 h*
VOIT (1993)	Mensch	Serum	n.u.	7 d*
THORESEN et al. (1992)	Hund	Vollblut Serum / Plasma	n.u. 3 d ^{*/**}	< 24 h n.u.
LINDNER (1991)	Pferd	Vollblut Heparin-Plasma	4 d* 4 d*	4 d* 4 d*
SAEED et al. (1995)	Kamel	Serum	9 d*	9 d*

* = Versuchsende; ** = Lagerung Tag 0 bis Tag 1 bei 4°C;

n.u. = nicht untersucht; k.A. = keine Angaben

Serum:

Im humanen Serum blieb der Kalziumgehalt bei Lagerung bei Raum- oder Kühlschranktemperatur unverändert (VOIT, 1993; DONNELLY et al., 1995; HEINS et al., 1995; BOYANTON und BLICK, 2002).

Im cameliden (SAEED et al., 1995) und caninen Serum (THORESEN et al., 1992) zeigte sich Kalzium als sehr stabiler Parameter.

Für bovines Serum wird eine Kalzium-Stabilität von fünf Tagen angegeben (GRÜNDER, 1991).

Mögliche Störfaktoren:

Im Heparinplasma konnte eine niedrigere Kalziumkonzentration als im Serum nachgewiesen werden, da Heparin mit Kalziumionen Komplexe bildet, die der Analyse entgehen (SCHEIBENHOFFER, 1984). THORESEN et al. (1992) konnten jedoch im Heparinplasma eine höhere Konzentration als im Serum beobachten. Auf Grund der differierenden Ergebnisse zur Serumanalyse erklärte TASKER (1978) ohne mögliche Ursachen zu diskutieren, dass EDTA- und NaF-Plasma für die Kalziumanalyse ungeeignet sind.

Die Bestimmung des Kalziumgehaltes bleibt von einer Hämolyse der Proben unbeeinflusst (SONNTAG, 1986; JACOBS et al., 1992; GRAFMEYER et al., 1995).

2.3.5.14 Anorganisches Phosphat

(siehe Tabelle 2.17)

Vollblut:

Bei Raumtemperatur-Lagerung von humanem Vollblut stieg der Phosphatgehalt nach 24 Stunden kontinuierlich an (KELLER, 1975; ONO et al., 1981; HEINS et al., 1995; BOYANTON und BLICK, 2002). Der Anstieg bei 4°C war dagegen verzögert (ONO et al., 1981; HEINS et al., 1995). Bei LAESSIG et al. (1976a) blieb Phosphat über 48 Stunden bei Raumtemperatur stabil. Bei Lagerung bei 32°C war der Phosphatanstieg schon nach drei Stunden signifikant (ZHANG et al., 1998).

Im caninen Vollblut stieg der Phosphatgehalt nach einem Tag bei 4°C signifikant an (THORESEN et al., 1992). Im equinen Vollblut war für diesen Parameter erst nach zwei Tagen bei Raumtemperatur ein Anstieg zu beobachten, während die Konzentration bei Kühlschranktemperatur nur innerhalb der ersten 24 Stunden anstieg (LINDNER, 1991).

Im bovinen Vollblut zeigten sich ein moderater Anstieg bei Kühlschrank- und ein starker Anstieg bei Raumtemperatur (WITTEWERT et al., 1986). Bei FONTAINE et al. (1987b) blieb der Phosphatgehalt über 96 Stunden stabil. TASKER (1978) konnte einen leichten Abfall während der Lagerung von bovinem Vollblut nachweisen.

Serum:

Im humanen Serum zeichnete sich Phosphat durch seine Langzeitstabilität sowohl bei Raum- als auch bei Kühlschranktemperatur aus (DONNELLY et al., 1995). HEINS et al. (1995) stellten jedoch bei Kühlschranktemperatur nach sieben Tagen und bei Raumtemperatur nach zwei Tagen einen Anstieg fest.

Der Phosphatgehalt im Kamelserum zeigte eine Stabilität über neun Tage (SAEED et al., 1995). Im caninen Serum (THORESEN et al., 1992) und Pferdeplasma (LINDNER, 1991) wurde Phosphat ebenfalls als stabiler Parameter ermittelt.

Im Rinderserum bleibt Phosphat über fünf Tage stabil (GRÜNDER, 1991).

Mögliche Störfaktoren:

Durch Hämolyse kommt es zu einer Erhöhung der Serumgehalte, da in den Erythrozyten größere Phosphatmengen vorliegen (KRAFT, 2005a). Andere Untersuchungen zeigten keine Störungen durch Hämolyse (TASKER, 1978; SONNTAG, 1986; JACOBS et al., 1992). Auch eine spektrale Interferenz ist möglich, da die meisten Methoden mit Phosphomolybdat bei 340 nm arbeiten, wodurch diese anfällig gegenüber Trübungen sind (GRAFMEYER et al., 1995).

Durch Rezentrifugation von Röhrchen mit Trenngel steigt der Phosphatgehalt, da dabei die Gelbarriere undicht wird und der Überstand mit Zytoplasma aus dem Sediment kontaminiert wird (VOIT, 1993).

Die Phosphatgehalte im NaF-Plasma (TASKER, 1978) und Heparinplasma (THORESEN et al., 1992) sind signifikant niedriger als im Serum. Beim Vergleich verschiedener Antikoagulantien wurden keine Unterschiede im Phosphatgehalt festgestellt (WITTEWERT et al., 1986).

Tab. 2.17: Literaturangaben zur Stabilität von anorganischem Phosphat in Blutproben.

Autor (en)	Spezies	Material	RT	KT
FONTAINE et al. (1987b)	Rind	Vollblut	96 h*	96 h*
GRÜNDER (1991)	Rind	Serum	n.u.	5 d
WITTEWER et al. (1986)	Rind	Vollblut Vollblut+EDTA	< 24 h < 24 h	48 h 72*
BOYANTON und BLICK (2002)	Mensch	Vollblut Serum	24 h 56 h*	n.u. n.u.
DONNELLY et al. (1995)	Mensch	Serum	4 Monate*	4 Monate*
GUDER et al. (1996)	Mensch	Serum	1 d	4 d
HEINS et al. (1995)	Mensch	Vollblut Serum	1 d 2 d	4 d 7 d*
LAESSIG et al. (1976a)	Mensch	Vollblut	48 h*	n.u.
ONO et al. (1981)	Mensch	Vollblut	24 h	48 h*
THORESEN et al. (1992)	Hund	Vollblut Serum / Plasma	n.u. 3 d ^{*/**}	1 d* n.u.
LINDNER (1991)	Pferd	Vollblut Heparin-Plasma	1 d 4 d*	< 24 h 4 d*
SAEED et al. (1995)	Kamel	Serum	9 d*	9 d*

* = Versuchsende; ** = Lagerung Tag 0 bis Tag 1 bei 4°C; n.u. = nicht untersucht

2.4 Bestimmungsmethoden

Die quantitative Bestimmung von klinisch-chemischen Analyten in Proben kann mit direkten oder indirekten Methoden erfolgen. Eine direkte Messung erfolgt über die spezifischen Eigenschaften eines Stoffes wie z.B. den spektralen Eigenschaften von ionisierten Atomen. Die indirekte Messung erfolgt dagegen über chemische Indikatorreaktionen, bei denen entweder der Analyt zu einem Produkt mit Indikatoreigenschaften umgewandelt wird oder ein solches während der Reaktion entsteht (HAECKEL, 1995).

Verschiedene Methoden sind möglich. Im Folgenden werden gängige Methoden erläutert.

1. *Elektromagnetische Methoden bzw. Photometrie:*

Hierbei wird Licht (elektromagnetische Strahlung) genutzt. Licht besteht aus einer Mischung vieler Wellenlängen, so dass für photometrische Analysen monochromatisches Licht verwendet wird (HAECKEL und SCHUMANN, 1995). Zu diesen Methoden gehören u.a.

- die Atomabsorptionsphotometrie, wobei die Atome des Analyten Lichtenergie aufnehmen (Absorption) (KRAFT und DÜRR, 2005d),
- die Flammenemissionsphotometrie, die auf der charakteristischen Färbung metallischer Atome in einer Flamme beruht (KRICKA, 2006),
- die Fluorimetrie, bei der durch den Analyten Sekundärstrahlung (Fluoreszenz) abgegeben wird (KRAFT und DÜRR, 2005d).

2. *Elektrochemische Verfahren:*

Diese Verfahren beruhen darauf, dass sich in Elektroden ein Potential bildet, das über eine Elektrodenkette (elektrochemische Zelle) gemessen werden kann (HAECKEL und SCHUMANN, 1995). Zu diesen Methoden gehören u.a.

- die ionenselektive Elektrode, bei der durch eine Membran nur das zu messende Ion in das Innerelektrolyt der Messelektrode gelangt (THOMAS, 2005g),
- die Coulometrie, bei der die elektrische Aufladung zwischen zwei Elektroden in einer elektrochemischen Zelle gemessen wird (HAECKEL und SCHUMANN, 1995),
- das voltametrische Verfahren, bei dem eine externe Spannung an elektrochemische Zellen angelegt und der Strom gemessen wird (D'ORAZIO und MEYERHOFF, 2006).

3. *Analytik mit trägergebundenen Reagenzien bzw. Trockenchemie:*

Die Reaktionen laufen hierbei auch in wässriger Lösung ab, wobei die Wasserphase der Probe als Lösungsmittel dient (SONNTAG, 1995). Die Reagenzien sind in einem Trockenreagenzträger enthalten, der durch seinen inneren Aufbau und die Verteilung der Reagenzien den Reaktionsablauf steuert. Die Auswertung erfolgt reflektionsphotometrisch (KRAFT und DÜRR, 2005d). Zu diesen Systemen gehören u.a.

- die Mehrschichten-Filmtechnologie, bei der der Reagenzträger aus verschiedenen Filmschichten besteht und die Probe durch alle Schichten diffundiert (SONNTAG, 1995),
- die imprägnierten Teststreifen, bei denen die aus Papier oder synthetischem Faserstoff bestehende Matrix mit den Reagenzien durchtränkt wurde (WALTER, 1983 + 1988).

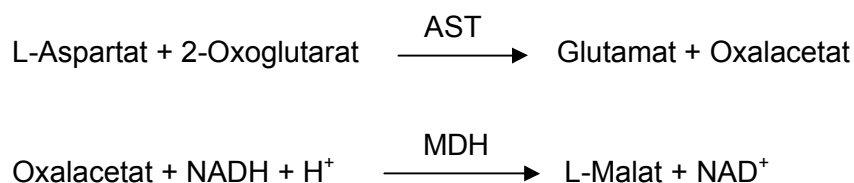
Weitere Bestimmungsmethoden wie Elektrophorese, Chromatographie, Titrimetrie, Osmometrie, Radioaktivitätsmessungen, immunologische und molekularbiologische Verfahren sind ebenfalls möglich (RICK, 1990b; HAECKEL und SCHUMANN, 1995).

Nachfolgend werden die unterschiedlichen Bestimmungsmethoden zu den ausgewählten Parametern dieser Studie (siehe Kapitel 2.3.5) näher erläutert.

2.4.1 Aspartat-Amino-Transferase (AST)

Für die Bestimmung der AST sind Testkombinationen der Nass- und Trockenchemie verfügbar (KRAFT und DÜRR, 2005c). Das IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) hat die Referenzmethode bei 37°C festgelegt (SCHUMANN et al., 2002a):

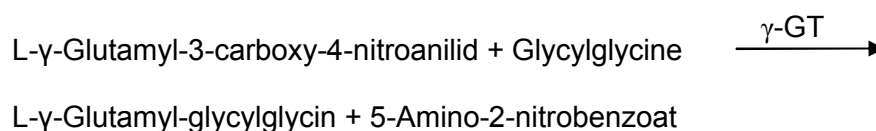
Die AST katalysiert den Transfer einer Aminogruppe vom Aspartat zum Oxoglutarat, wobei Glutamat und Oxalacetat gebildet werden. Letzteres wird im optischen Test mit der Malatdehydrogenase (MDH)-Reaktion bestimmt. Dabei wird Oxalacetat zu Malat reduziert. Bei der gleichen Reaktion wird eine äquivalente Menge NADH zu NAD oxidiert. Daraus resultiert eine Abnahme der Extinktion bei 340 nm, die direkt proportional zur AST-Aktivität im Serum ist.



2.4.2 γ -Glutamyl-Transferase (γ -GT)

Sowohl für die Nass- als auch für die Trockenchemie sind zahlreiche fertige Testpackungen für die Bestimmung der γ -GT-Aktivität erhältlich (KRAFT und DÜRR, 2005c). Die Referenzmethode wurde vom IFCC bei 37°C festgelegt (SCHUMANN et al., 2002b):

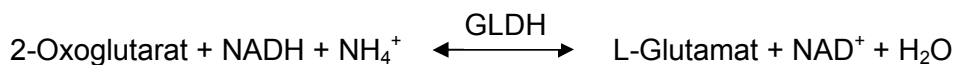
Die γ -GT katalysiert die Übertragung des Glutamylrestes von γ -Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid auf Glycylglycine. Dieser Vorgang setzt 5-Amino-2-nitrobenzoat frei, das Licht bei 405 nm absorbiert. Der Anstieg der Absorption bei dieser Wellenlänge ist direkt proportional der Enzymaktivität im Ansatz.



2.4.3 Glutamat-Dehydrogenase (GLDH)

Für die Bestimmung der GLDH-Aktivität stehen nasschemische Tests zur Verfügung (KRAFT und DÜRR, 2005c). In der Standardmethode erfolgt die Bestimmung bei 37°C nach folgendem Prinzip (GERMAN SOCIETY FOR CLINICAL CHEMISTRY, 1992):

Die GLDH katalysiert die NADH-abhängige Übertragung von Ammoniak auf 2-Oxoglutarat unter Bildung von Glutamat und NAD. Dabei wird die Absorptionsabnahme von NADH pro Zeiteinheit photometrisch registriert. Diese wird bei den Wellenlängen 334, 340 oder 366 nm gemessen und verhält sich proportional zur GLDH-Aktivität.



2.4.4 Bilirubin

Die Bestimmung des Gesamtbilirubins ist enzymatisch, spektrophotometrisch, mit trägergebundenen Reagenzien und mit der Diazo-Reaktion möglich. Enzymatische oder spezielle manuelle Methoden werden von keinem der führenden Hersteller für klinisch-chemische Großgeräte vertrieben, so dass vorwiegend mit den Diazo-Reaktionen gearbeitet wird (THALER et al., 2008). Nachfolgend werden einzelne Methoden erläutert.

1. Kupplung mit Diazoniumsalzen (Diazo-Methode):

Dies ist die klassische Methode zur Bilirubinbestimmung. Bei der Reaktion zwischen Bilirubin und diazotierter Sulfanilsäure entstehen Azopigmente, die Indikatoreigenschaften aufweisen. Um den Gesamtbilirubingehalt zu bestimmen, werden Akzeleratoren zugesetzt, die das unkonjugierte Bilirubin vom Albumin lösen (THALER et al., 2008).

Prinzip nach Malloy-Evelyn:

Als Akzelerator wird Methanol verwendet, welches zusätzlich das entstehende Azobilirubin besser in Lösung hält. Methanol kann jedoch falsch-niedrige Messwerte erzeugen, da durch diesen Alkohol Proteine ausgefällt werden (MALLOY und EVELYN, 1937; THALER et al., 2008).

Prinzip nach Jendrassik und Gróf:

Als Akzeleratoren werden Coffein und Natriumbenzoat verwendet (JENDRASSIK und GROF, 1938). Dieses Verfahren liefert dadurch eine höhere Präzision und Zuverlässigkeit der Messergebnisse (THALER et al., 2008). Unkonjugiertes, konjugiertes und δ -Bilirubin reagieren mit diazotierter p-Aminobenzolsulfonsäure zu Azobilirubin, dessen Konzentration proportional zur Gesamtbilirubin-Konzentration ist. Dieser Azofarbstoff ist in neutraler Lösung rot und wird bei Zugabe von alkalischem Tartrat blau, wodurch das Absorptionsmaximum von 530 nm auf 598 nm verschoben wird (THOMAS, 2005c).

Die Methode von JENDRASSIK und GRÓF wurde hinsichtlich der Konzentration der Reagenzien, der Reaktionszeit und einer Reihe von Randbedingungen optimiert und inzwischen als Referenzmethode anerkannt (THALER et al., 2008).

Dichlorophenyldiazonium-Methode (DPD):

Bilirubin bildet im sauren Milieu mit 2,5-Dichlorophenyldiazoniumsalz einen Azofarbstoff, dessen Extinktion proportional zum Bilirubingehalt ist und bei 546 nm gemessen wird. Um den Gehalt an Gesamtbilirubin zu messen, wird unkonjugiertes Bilirubin durch das Detergens Triton X-100 freigesetzt (KRAFT und DÜRR, 2005c). Diese Methode weist im Vergleich zum Jendrassik-Grof-Prinzip einen geringeren Arbeitsaufwand auf (THALER et al., 2008).

2. Enzymatische Methode:

Bei dieser Methode wird Bilirubin durch die Bilirubinoxidase zu Biliverdin oxidiert. Die entstehenden purpurfarbenen Pigmente werden bei 450 nm gemessen (THOMAS, 2005c).



3. Direkte photometrische Methoden:

Diese Methoden sind mit und ohne Verdünnung der Probe möglich.

Mit Verdünnung:

Die Serumprobe wird mit Boratpuffer verdünnt und die Messung erfolgt bei 466 und 522 nm. Der Bilirubingehalt wird mit den zwei ermittelten Extinktionen an Hand einer Formel berechnet. Die Übereinstimmung mit der Referenzmethode ist ausgezeichnet, jedoch ist diese Methode nicht automatisierbar (THALER et al., 2008).

Ohne Verdünnung („Bilimeter“):

Diese Methode ist nur bei Neugeborenen durchführbar, da schon nach wenigen Lebensstagen fälschlich zu hohe Bilirubinspiegel durch den zunehmenden Gehalt an Lipochromen im Plasma ermittelt werden (RICK, 1990a). Im Bilimeter wird die Extinktion der Plasmaprobe direkt gemessen. Die Probe befindet sich in einer Kapillare und die Messung erfolgt im Absorptionsmaximum für Bilirubin (460 nm). Durch eine zusätzliche Messung bei 550-580 nm wird eine spektrale Interferenz durch Hämoglobin kompensiert. Die Absorption von Hämoglobin ist bei beiden Wellenlängen identisch, so dass die Absorptionsdifferenz die reine Absorption durch Bilirubin repräsentiert (THOMAS, 2005c).

4. Multilayer-Filmtechnik (Trockenchemie):

Bei dieser Methode wird ein Reagenzträger genutzt, der aus drei Schichten besteht. Die obere enthält Koffein und Natriumbenzoat zur Abtrennung des unkonjugierten Bilirubins vom

Albumin, während die zweite Schicht Proteine zurück hält. In der dritten Schicht läuft die Reaktion ab. Diese enthält ein kationisches Polymer, das Bilirubin bindet. Die Messung erfolgt reflektrometrisch (THOMAS, 2005c).

2.4.5 Gesamteiweiß

Die quantitative Bestimmung von Gesamteiweiß im Serum ist durch verschiedene Methoden möglich. Die Biuret-Reaktion hat sich jedoch bei der Untersuchung von Serum bewährt (THOMAS, 2005b). Ausgewählte Methoden werden nachfolgend vorgestellt.

1. Biuret-Reaktion:

Diese Methode wird als Standardmethode angesehen (KRAFT und SCHILLINGER, 1989). In alkalischer Lösung lagern sich Kupfer(II)-Ionen an die Peptidbindungen von Proteinen. Die Intensität der dabei entstehenden Violettfärbung ist proportional zur Zahl der Peptidbindungen und wird bei 546 nm gemessen (KRAFT und DÜRR, 2005b).

2. Refraktometer:

Dies ist ein optisches Instrument, das den Proteingehalt in der Probe durch ein Prisma mit Hilfe einer Lichtquelle misst. Durch den spezifischen Brechungsindex von Protein kann die Konzentration direkt abgelesen werden (KRAFT und SCHILLINGER, 1989). Die Werte liegen jedoch etwas niedriger als bei der Biuret-Methode (KRAFT und DÜRR, 2005b).

3. Streulicht-Methode:

Mit Trichloressigsäure werden die Proteine in der Probe denaturiert, die dann das Licht mit niedriger Wellenlänge streuen. In einem bestimmten Konzentrationsbereich ist das Streulichtsignal proportional der Proteinkonzentration. Daher eignet sich diese Methode nur für eiweißarme Lösungen wie Liquor und Harn (THOMAS, 2005b).

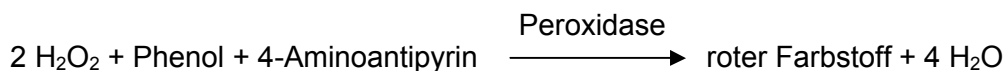
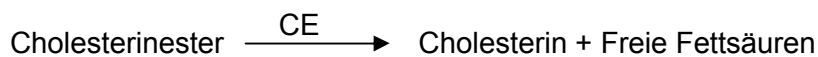
4. Kjeldahl-Methode:

Dies ist die erste Methode gewesen, mit der der Gehalt an Gesamteiweiß in einer Probe bestimmt wurde (JOHNSON, 2006). Die Probe wird mit konzentrierter Schwefelsäure verascht. Dabei werden bis auf Stickstoff alle anderen Bestandteile der Proteine in eine höhere Oxidationsstufe versetzt. Stickstoff bleibt in Form von Ammoniumionen in Lösung. Durch Alkalisieren der Lösung werden die Ammoniumionen als Ammoniak freigesetzt, der dann in eine Säure bekannter Konzentration überdestilliert wird und diese neutralisiert. Die nicht verbrauchte Säure wird zurücktitriert. Die neutralisierte Säure entspricht dem gebildeten Ammoniak, aus dem sich der Stickstoffgehalt und damit die Proteinkonzentration der Probe zurückrechnen lassen (RICK, 1990a).

2.4.6 Cholesterin

Verschiedene Bestimmungsmethoden sind möglich, jedoch handelt es sich bei der enzymatischen Methode um die Referenzmethode (RIESEN, 2005):

Um den Gesamtcholesteringehalt in der Probe zu bestimmen, werden zunächst die Cholesterinester von der Cholesterin-Esterase (CE) zu Cholesterin und Freien Fettsäuren hydrolysiert. Das freie Cholesterin wird dann, zusammen mit dem bereits vorhandenen Freien Cholesterin, durch die Cholesterin-Oxidase (CO) zu Δ^4 -Cholestenon und Wasserstoffperoxid oxidiert. Die Bestimmung der Menge des gebildeten Wasserstoffperoxides erfolgt dann mit der Trinder-Reaktion, bei der Peroxidase-katalysiert aus Phenol, 4-Aminoantipyrin und Wasserstoffperoxid ein roter Farbstoff gebildet wird, dessen Extinktion bei 500-550 nm gemessen werden kann (RICK, 1990a; KRAFT, 2005c).

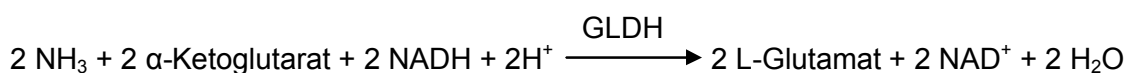
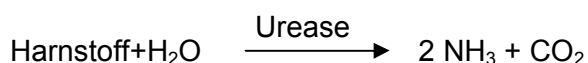


2.4.7 Harnstoff

Mehrere Methoden sind möglich, wovon einige nachfolgend beschrieben werden.

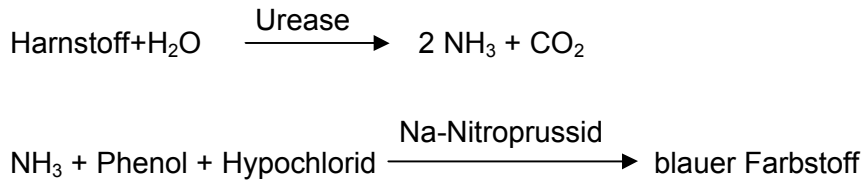
1. Urease-GLDH-UV-Test:

Harnstoff wird durch das pflanzliche oder bakterielle Enzym Urease zu Ammoniak und Kohlenstoffdioxid hydrolysiert. In Gegenwart von Glutamatdehydrogenase (GLDH) und NADH bindet sich das Ammoniak an α -Ketoglutarat, wobei L-Glutamat entsteht. Die daraus resultierende Abnahme der Extinktion bei 340 nm, da NADH zu NAD umgewandelt wird, ist proportional zur Harnstoffkonzentration in der Probe (RICK, 1990a).



2. Urease-Berthelot-Reaktion:

Urease spaltet Harnstoff in Ammoniak und Kohlenstoffdioxid. Bei Anwesenheit von Natrium-nitroprussid ergibt Ammoniak mit Phenol und Hypochlorid eine blaue Farbe, deren Intensität der Konzentration von Ammoniak und damit von Harnstoff proportional ist. Die Extinktion dieses Farbstoffs wird bei 530-570 nm bestimmt (KRAFT und DÜRR, 2005a)



3. Diacetylmonoxim-Methode:

In Gegenwart von Thiosemicarbazid und Eisen-III-Chlorid reagiert Harnstoff mit Diacetylmonoxim zu einem rosa Farbstoff, der photometrisch bestimmt wird (THOMAS, 2005h).

4. Teststreifen (Trockenchemie):

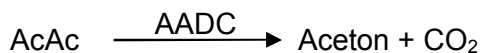
Dieses Verfahren beruht ebenfalls auf der Spaltung von Harnstoff mittels Urease. Das entstehende Ammoniak erhöht den pH-Wert, was einen Farbumschlag von gelb nach blau zur Folge hat (KRAFT und SCHILLINGER, 1989).

2.4.8 β -Hydroxybuttersäure (BHBS)

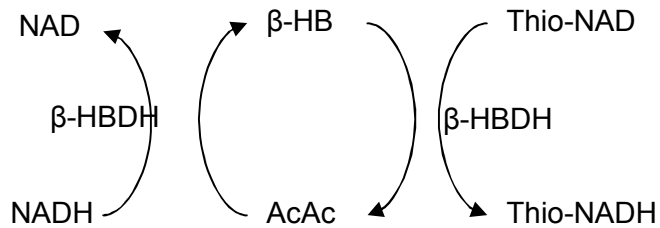
Die BHBS kann mit unterschiedlichen Methoden im Serum bestimmt werden. Nachfolgend werden zwei davon beispielhaft aufgeführt.

1. Zyklisch-enzymatische Methode:

Zunächst wird in Gegenwart von Acetoacetatdecarboxylase (AADC) vorhandenes Acetoacetat (AcAc) zu Aceton abgebaut.

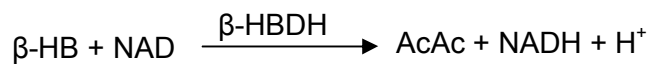


Es folgt eine zyklische Reaktion. In Gegenwart von β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (β -HBDH) wird vorhandenes β -Hydroxybutyrat (β -HB) in Acetoacetat (AcAc) unter Bildung von Thio-NADH umgewandelt. Im weiteren Verlauf werden β -HB und AcAc kontinuierlich ineinander umgewandelt, unter fortlaufendem Verbrauch von NADH und Bildung von Thio-NADH. Durch photometrische Messung der Bildungsgeschwindigkeit von Thio-NADH kann die Konzentration von β -HB in der Probe ermittelt werden (THOMAS, 2005a).



2. Einfache quantitative Bestimmung:

Hierbei katalysiert die β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (β -HBDH) den Umsatz von β -Hydroxybutyrat (β -HB) und NAD zu Acetoacetat (AcAc) und NADH. Die Zunahme von NADH wird im optischen Test gemessen (THOMAS, 2005a).



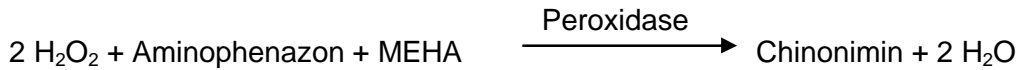
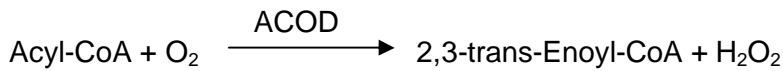
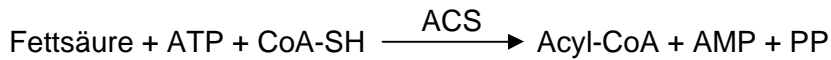
Dieser Reaktion bedient sich auch ein aus der Humanmedizin stammendes elektronisches Messgerät (Precision Xceed[®], Firma Abbott Diabetes Care), das zur Messung nur 1,5 μ l Vollblut benötigt. Die bei der chemischen Reaktion freigesetzten Elektronen werden hierbei mittels eines Mediators zu einer Elektrode übertragen und erzeugen einen Strom, der proportional zur BHBS-Konzentration ist (IWERSEN et al., 2008).

2.4.9 Freie Fettsäuren (NEFA)

Der Gehalt an Freien Fettsäuren im Blut lässt sich mit verschiedenen Methoden bestimmen, wobei die enzymatische Methode als Methode der Wahl gilt (MULDER, 1983).

1. Enzymatisches Testverfahren (ACS/ACOD-Methode):

Die Freien Fettsäuren werden zunächst mit der Acyl-CoA-Synthetase (ACS) in Acyl-Co-enzymA (Acyl-CoA) überführt. Dieses reagiert mit Sauerstoff in einer Reaktion, die durch die Acyl-CoA-Oxidase (ACOD) katalysiert wird, zu 2,3-trans-Enoyl-CoA und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Die Bestimmung der Menge des gebildeten Wasserstoffperoxides erfolgt mit einer weiteren Reaktion, bei der Peroxidase-katalysiert aus Aminophenazon und 3-Methyl-N-Ethyl-N- β -hydroxyethylanilin (MEHA) ein roter Farbstoff (Chinonimin) gebildet wird, dessen Intensität proportional zur Konzentration der Freien Fettsäuren in der Probe ist. Das Extinktionsmaximum liegt bei 550 nm (AUFENANGER und KATTERMANN, 1995).



Flüchtige Fettsäuren wie Azetat, Butyrat und Propionat haben keinen Einfluss auf die enzymatische Bestimmung der Freien Fettsäuren, da sie keine Substrate für diese Untersuchung darstellen (JOHNSON und PETERS, 1993).

2. Kolorimetrisches Verfahren:

Die Freien Fettsäuren werden aus dem Serum oder Plasma mit organischen Lösungsmitteln extrahiert und chemisch in Kobalt- oder Kupfersalze umgewandelt. Die Farbintensität dieser Reaktion ist proportional zur NEFA-Konzentration (EVANS und DUNCAN, 2003).

In den letzten Jahren ist ein portables Messgerät (DVM NEFA[®]) entwickelt worden, das die Bestimmung der Freien Fettsäuren im Stall ermöglicht. Die Bestimmung des NEFA-Gehalts im Serum erfolgt hierbei spektrophotometrisch durch Lichtabsorption (LESLIE et al., 2004). Dieses Handgerät liefert sehr präzise Messergebnisse, die mit den Laborergebnissen gut übereinstimmen (GOOIJER et al., 2004; SCHRÖDER und STAUFENBIEL, 2006). GAAL und RIBICZEY (2008) konnten jedoch mit dem DVM NEFA[®] signifikant höhere Werte ermitteln, die mehr als doppelt so hoch waren wie die korrespondierenden Laborergebnisse.

3. Gaschromatographische Methode:

Hierbei werden die Fettsäuren als Methylester auf einer Säule aus Kieselerde aufgetragen. Ein Gas-Chromatograph mit Flammenionisationsdetektor analysiert die Säule und gibt ein chromatographisches Profil der Fettsäuremethylester heraus. Die Peaks der Fettsäuren werden dabei von einem Integrator bestimmt, mit denen die Konzentration jeder einzelnen Fettsäure berechnet wird (LEPAGE und ROY, 1986).

4. Titrimetrisches Verfahren:

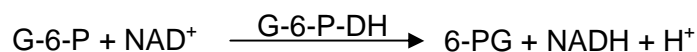
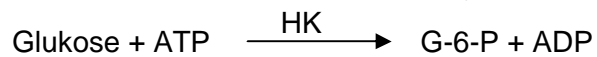
Die Freien Fettsäuren werden hierbei mit einem Isopropanol-Heptan-Gemisch, das zusätzlich Schwefelsäure enthält, aus dem Serum oder Plasma extrahiert. Die Titration der Fettsäuren erfolgt dann mit Lauge und Thymolphthalein als Indikator (HENRY, 1964).

2.4.10 Glukose

Zahlreiche nass- und trockenchemische Tests für die Glukose-Bestimmung im Blut sind erhältlich, wobei Reduktionsverfahren inzwischen von enzymatischen Methoden abgelöst wurden (KRAFT, 2005b). Glukose kann mit zwei verschiedenen enzymatischen Methoden bestimmt werden: Mit der Oxidase-Peroxidase-Methode oder der Hexokinase-Methode (SACKS, 2006). Beide Methoden liefern vergleichbare Ergebnisse (CLARK et al., 1990).

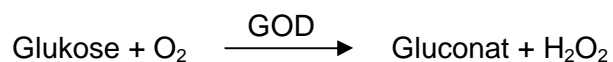
1. Hexokinase-Methode:

Die Glukose wird durch ATP in einer Reaktion phosphoryliert, die durch Hexokinase (HK) katalysiert wird. Das gebildete Glukose-6-Phosphat (G-6-P) wird durch Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-P-DH) zu 6-Phosphogluconat (6-PG) oxidiert. In der gleichen Reaktion wird eine äquimolare Menge an NAD zu NADH reduziert, woraus eine Erhöhung der Extinktion bei 340 nm resultiert (KRAFT, 2005b).



2. Oxidase-Peroxidase-Methode:

Die Glukoseoxidase (GOD) katalysiert die Oxidation von Glukose zu Gluconsäure und H_2O_2 . In der darauffolgenden Reaktion katalysiert die Peroxidase (POD) die Indikatorreaktion, bei der ein reduziertes Chromogen durch H_2O_2 oxidiert wird und einen Farbkomplex bildet, dessen Intensität photometrisch gemessen werden kann (THOMAS, 2005i).



2.4.11 Natrium

Der Natriumgehalt kann mit folgenden Methoden bestimmt werden:

1. Flammenemissionsphotometrie:

Die Probe wird in einer Wasserstoff-, Propan- oder Azetylgasflamme unter Sauerstoffdruck vernebelt. Natrium emittiert dabei Licht charakteristischer Wellenlänge, das mit einem Monochromator selektiert und von einer Fotozelle gemessen wird (KRAFT und WIRTH, 2005).

2. Potentiometrie mit ionenselektiver Elektrode (ISE):

Die elektrochemische Zelle besteht aus einer ionenselektiven Elektrode (innere Elektrode) und einer äußeren Referenzelektrode. Beide Elektroden stehen mit der Probenlösung in Verbindung, und zwar die innere Elektrode über das Innenelektrolyt und die äußere über eine Brückenlösung (z.B. konzentriertes Kaliumchlorid). Voraussetzung für die Funktion ist eine ionenselektive Membran, die die durchfließende Probe vom Innenelektrolyt trennt und nur das zu messende Elektron in das Innenelektrolyt übertreten lässt. Es entsteht ein Membranpotential, das von der inneren Elektrode registriert und gegen das konstante Potential der äußeren Referenzelektrode gemessen wird (THOMAS, 2005g).

3. Enzymatisch spektrometrische Bestimmung:

Das Enzym β -Galactosidase wird durch Natrium-Ionen aktiviert. Dieses Enzym katalysiert die Reaktion von o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) zu Galactose und o-Nitrophenol. Das gebildete Nitrophenol wird kinetisch gemessen. Auf Grund der linearen Beziehung zwischen der Natriumkonzentration der Probe und der kinetischen Aktivität dieses Enzyms kann der Natriumgehalt berechnet werden (THOMAS, 2005g).

2.4.12 Kalium

Kaliumionen können in Blutproben ähnlich wie Natrium-Ionen bestimmt werden.

1. Flammenemissionsphotometrie:

Siehe Kapitel 2.4.11.

2. Potentiometrie mit ionenselektiver Elektrode (ISE):

Siehe Kapitel 2.4.11.

3. Enzymatisch spektrometrische Bestimmung:

Die Pyruvatkinase katalysiert die Umwandlung von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat und wird durch Kalium-Ionen aktiviert. Die Konzentration der Kalium-Ionen ist bestimmend für die kinetische Aktivität dieses Enzyms. In einer weiteren Reaktion wird aus Pyruvat Laktat gebildet, wobei auch NADH verbraucht wird. Dieser Verbrauch wird kinetisch bei 340 nm gemessen, so dass der Kaliumgehalt rechnerisch ermittelt werden kann (THOMAS, 2005j).

2.4.13 Kalzium

Verschiedene Methoden zur Bestimmung des Gesamtkalziumgehaltes im Blut sind möglich.

1. Flammenemissionsphotometrie:

Siehe Kapitel 2.4.11.

2. Atomabsorptionsspektroskopie (AAS):

Hierbei handelt es sich um die Umkehrung des Emissionsverfahrens. Die AAS beruht auf dem Prinzip, dass die Atome von Elementen bei Anregung Strahlung aussenden, die aus einem elementspezifischen Linienspektrum besteht. Bei dieser Technik wird von einer Lichtquelle Licht verschiedener Wellenlänge emittiert. Die zu untersuchende Probe befindet sich im Strahlengang und wird durch eine Flamme oder starkes Erhitzen atomisiert. Der Lichtstrahl wird in der Atomwolke durch deren Absorption geschwächt und dahinter gemessen. Die am Signalanzeigergerät gemessene Absorptionsänderung ist proportional zur Konzentration in der Probe (THOMAS, 2005k).

3. Komplexometrische Methode:

Kalzium bildet mit organischen Molekülen Farbkomplexe. Häufig werden dafür o-Kresolphthalein-Komplexon oder Arsenazo III verwendet. Die Farbintensität dieser Komplexe ist direkt proportional zur Kalziumkonzentration und kann photometrisch gemessen werden (KRAFT, 2005a).

2.4.14 Anorganisches Phosphat

Der Phosphatgehalt im Blut kann mit verschiedenen Methoden bestimmt werden. Einige davon werden nachfolgend beschrieben.

1. Phosphomolybdat-Methode:

Durch Zugabe von Ammoniummolybdat zur Probe wird Ammoniumphosphomolybdat gebildet. Dieses wird durch ein Reduktionsmittel zu Molybdänblau reduziert, dessen Intensität bei 405 nm photometrisch bestimmt werden kann. Die Intensität der Farbe ist der Phosphatkonzentration in der Probe proportional (KRAFT, 2005a).

2. Direkte Methode:

Diese Methode ist eine Abwandlung der Phosphomolybdat-Methode, da hier das unreduzierte Phosphomolybdat bestimmt wird. Phosphat bildet mit Ammoniummolybdat im sauren Medium einen gelben Komplex. Die Intensität dieser Färbung ist proportional zur Konzentration des anorganischen Phosphats in der Probe. Die Färbung wird bei 340 nm gemessen (DALY und ERTINGHAUSEN, 1972).

3. Enzymatische Methoden:

Verschiedene enzymatische Methoden sind möglich. So kann die Bestimmung unter Verwendung der Purinnucleosid-Phosphorylase und Xanthinoxidase (BERTI et al., 1988) oder der Sucrosephosphorylase und Phosphoglucomutase (TEDOKON et al., 1992) erfolgen.