

## 3 MATERIAL UND METHODEN

Zur Untersuchung, ob der Umgang mit Blutproben oder die Wahl des Blutentnahmesystems zu *ex vivo*-bedingten Veränderungen von Stoffwechselfparametern führen können, wurden drei Versuchsreihen mit unterschiedlichen Versuchsanordnungen durchgeführt.

In der ersten Versuchsreihe wurde der Einfluss verschiedener Transportbedingungen auf ausgewählte Parameter der klinischen Chemie im Rinderblut untersucht. Die zweite Versuchsreihe diente dazu, den Einfluss verschiedener Blutentnahmesysteme auf ausgewählte Parameter der klinischen Chemie zu prüfen. Die dritte Versuchsreihe wurde auf Grund der bisherigen Ergebnisse zusätzlich eingefügt. Hier wurde untersucht, ob es Wechselwirkungen zwischen den Freien Fettsäuren im Serum und dem Trenngel in den Vacutainern<sup>®</sup> oder dem Röhrchenmaterial der Vacutainer<sup>®</sup> gibt.

Die Untersuchung der Blutproben erfolgte durch das Veterinärmedizinisch-Diagnostische Institut (VMDI Berlin). Dieses Labor befand sich zum Zeitpunkt der Versuche in Vorbereitung der Akkreditierung nach DIN EN ISO/IEC 17025. Nach der Richtlinie der Bundesärztekammer werden dort täglich interne Qualitätskontrollen durchgeführt. Zusätzlich erfolgt über die Teilnahme an nationalen und internationalen Ringversuchen die externe Qualitätssicherung der Laborergebnisse.

### 3.1 Material

In der Zeit von Mai 2006 bis Juli 2007 wurden von insgesamt 67 Kühen, die in der Klinik für Klauentiere der Freien Universität Berlin aufgestellt waren, Blutproben gezogen. Davon gehörten 61 zur Rasse Deutsche Schwarzbunte und drei zur Rasse Deutsche Rotbunte. Bei einer Kuh handelte es sich um einen Gelbvieh-Mix und bei zweien um einen Rotbunt-Mix. Alle verwendeten Kühe waren klinikeigene Rinder oder Patienten dieser Klinik.

In den Tabellen 3.1 bis 3.3 werden die verwendeten Materialien für die einzelnen Versuche aufgelistet.

**Tab. 3.1: Material zur Untersuchung des Verhaltens der Parameter unter verschiedenen Transportbedingungen.**

<b>Material</b>	<b>Bezeichnung (Hersteller)</b>
Serum-Röhrchen mit Trenngel	SST™ II Advance, 8,5 ml (Becton Dickinson)
Röhrchen mit Natrium-Fluorid und Kalium-Oxalat	FX 5 mg / 4 mg PLUS, 2,0 ml (Becton Dickinson)
Kanülen	1,8 mm x 43 mm, Straußkanülen (Dispomed)
Verwendung des Vacutainer®-Systems	Röhrchenhalter (Becton Dickinson), Luer-Adapter (Becton Dickinson)
Auffangröhrchen	5 ml Röhren (Sarstedt), mit Deckel verschließbar

**Tab. 3.2: Material zum Vergleich verschiedener Blutentnahmesysteme.**

<b>Material</b>	<b>Bezeichnung (Hersteller)</b>
Serum-Röhrchen mit Trenngel	SST™ II Advance, 8,5 ml (Becton Dickinson)
Serum-Röhrchen ohne Trenngel	CAT PLUS, 10 ml (Becton Dickinson)
Serum-Monovetten®	9,0 ml (Sarstedt)
Kanülen	0,9 mm x 25 mm (Becton Dickinson), 1,8 mm x 43 mm, Straußkanülen (Dispomed)
Verwendung des Vacutainer®-Systems	Röhrchenhalter (Becton Dickinson)
Auffangröhrchen	5 ml Röhren (Sarstedt), mit Deckel verschließbar

**Tab. 3.3: Material zur Untersuchung der Freien Fettsäuren.**

<b>Material</b>	<b>Bezeichnung (Hersteller)</b>
Serum-Röhrchen mit Trenngel	SST™ II Advance, 8,5 ml (Becton Dickinson)
Serum-Röhrchen ohne Trenngel	CAT PLUS, 10 ml (Becton Dickinson)
Serum-Monovetten®	9,0 ml (Sarstedt)
Kanülen	0,9 mm x 25 mm (Becton Dickinson), 1,6 mm x 25 mm (Sarstedt)
Verwendung des Vacutainer®-Systems	Röhrchenhalter (Becton Dickinson)

## 3.2 Methoden

Da es sich bei der geplanten Blutentnahme um die teilweise Entnahme von Organmaterial bei Wirbeltieren handelte und dies laut §6(1) des Tierschutzgesetzes (Fassung vom 18.12.2007) verboten ist, wurden alle Versuche fristgerecht dem Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit (LaGetSi) in Berlin angezeigt.

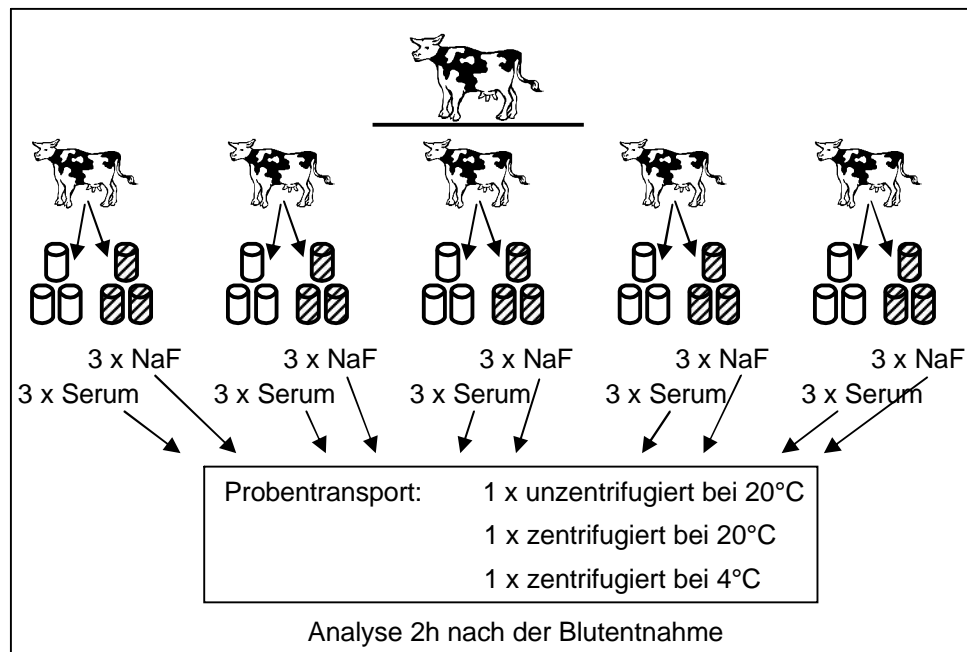
### 3.2.1 Verhalten der Parameter unter verschiedenen Transportbedingungen

Mit Hilfe von vier Vorversuchen wurde die Durchführung des Hauptversuches geplant.

In den ersten beiden Vorversuchen wurden durch die Blutentnahme von 2 x 3 Kühen der bestmögliche Versuchsablauf im Stall und der Umgang mit den Proben im Labor getestet. Des Weiteren wurde die endgültige Wahl des zu verwendenden Materials festgelegt.

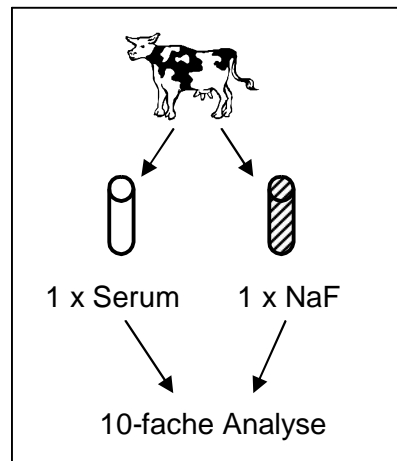
Der dritte Vorversuch diente der Ermittlung der Variation, die durch den Umgang mit den Proben generell erzeugt wird (Handling-VK). Dazu wurden von einer Kuh entsprechend viele Blutproben abgenommen, als würde es sich um fünf Kühe dieses Versuches handeln. Der Versuchsaufbau zu diesem Vorversuch wird in Abbildung 3.1 dargestellt.

Der vierte Vorversuch wurde durchgeführt, um die Variation zu bestimmen, die durch die Analyse an sich und durch die Chargen der verwendeten Reagenzien erzeugt wurde (Analyse-VK). Es wurden daher von einer Kuh eine Serum- und eine Natrium-Fluorid-Probe (NaF) entnommen und eine Zehnfach-Bestimmung dieser Proben durchgeführt (Abb. 3.2).



**Abb. 3.1: Ermittlung des Handling-Variationskoeffizienten.**

Von einer Kuh wurden Blutproben in einer Menge, die fünf Kühen entsprechen würde, gewonnen und analog zu den Bedingungen des Hauptversuches zum Labor transportiert.



**Abb. 3.2: Ermittlung des Analyse-Variationskoeffizienten.**

Von einer Kuh wurden eine Serum- und eine Natrium-Fluorid-Probe für eine Zehnfach-Bestimmung gewonnen.

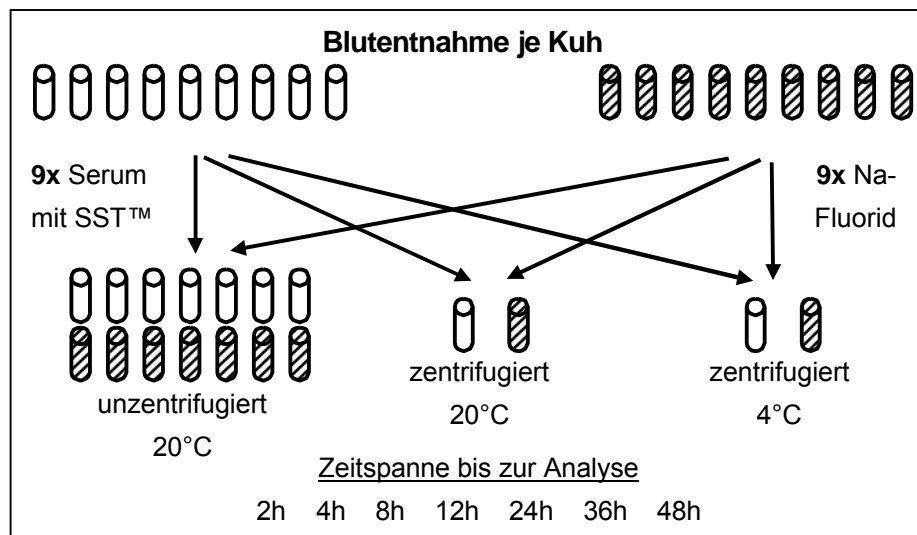
#### Hauptversuch:

Es wurden von insgesamt 23 Kühen zu festgelegten Zeiten je 18 Blutproben aus der Drosselvene (Vena jugularis externa) entnommen. Der Kopf wurde dazu seitlich ausgebunden und fixiert. Die Vene wurde mit einer Staukette angestaut und nacheinander wurden neun Serum- und neun NaF-Proben gezogen. Alle Röhrchen wurden sofort nach der Entnahme geschwenkt. Nach der letzten NaF-Probe wurde die Staukette gelöst, die Vene oberhalb der Einstichstelle komprimiert und die Straußkanüle samt Luer-Adapter und Röhrchenhalter entfernt.

Das weitere Vorgehen mit den Proben ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Vor dem Transport zum Labor wurden je zwei Serum- und NaF-Proben von jeder Kuh nach 30 Minuten Gerinnungszeit bei 3000g über 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Von den NaF-Röhrchen wurde vor dem Transport das Plasma in Sarstedt-Röhrchen abpipettiert und mit Eindrückstopfen verschlossen, da hier kein Trenngel wie in den Serum-Röhrchen vorhanden war. Je eine dieser zentrifugierten Serum- und Plasma-Proben pro Kuh wurde zusammen mit den restlichen sieben unzentrifugierten Serum- und NaF-Proben bei Raumtemperatur (~20°C) zum Labor transportiert. Die andere zentrifugierte Serum- und NaF-Probe wurde bei Kühlschranktemperatur (~4°C) transportiert.

Im Labor erfolgte die Analyse zu sieben festgelegten Zeitpunkten (2h, 4h, 8h, 12h, 24h, 36h, 48h) nach der Blutentnahme. Bis dahin wurden die Proben entsprechend ihrer Transporttemperatur auch innerhalb des Labors bei Raum- oder Kühlschranktemperatur dunkel gelagert, um eine längere Transportdauer vorzutäuschen. Bei den unzentrifugierten Blutproben wurde für jeden Bestimmungzeitpunkt eine neue Blutprobe der entsprechenden Kuh verwendet, da die Proben direkt vor der Analyse bei 3000g über 15 Minuten zentrifugiert wurden und somit dann nicht mehr unzentrifugiert gelagert werden konnten. Bei den zentrifugierten Proben wurde dagegen eine Probe für alle sieben Bestimmungzeitpunkte verwendet und zu jedem Untersuchungszeitpunkt die zur Analyse nötige Menge Serum (250µl) und NaF-Plasma (100µl) abpipettiert.

Mit den Serum-Proben wurde im Analysegerät Konelab®30i der Firma Thermo Electron Corporation ein metabolisches Profil erstellt. Dieses beinhaltete die Parameter Aspartat-Aminotransferase (AST),  $\gamma$ -Glutamyl-Transferase ( $\gamma$ -GT), Glutamat-Dehydrogenase (GLDH), Bilirubin, Harnstoff, Cholesterin, Gesamteiweiß, Natrium, Kalium, Kalzium, anorganisches Phosphat, Glukose,  $\beta$ -Hydroxy-Buttersäure (BHBS) und Freie Fettsäuren (NEFA). Mit dem Plasma aus den NaF-Proben wurde eine Zweitbestimmung der Glukose durchgeführt.



**Abb. 3.3: Übersicht der entnommenen Blutproben bei jeder Kuh im Hauptversuch.**  
Erläuterungen siehe Text.

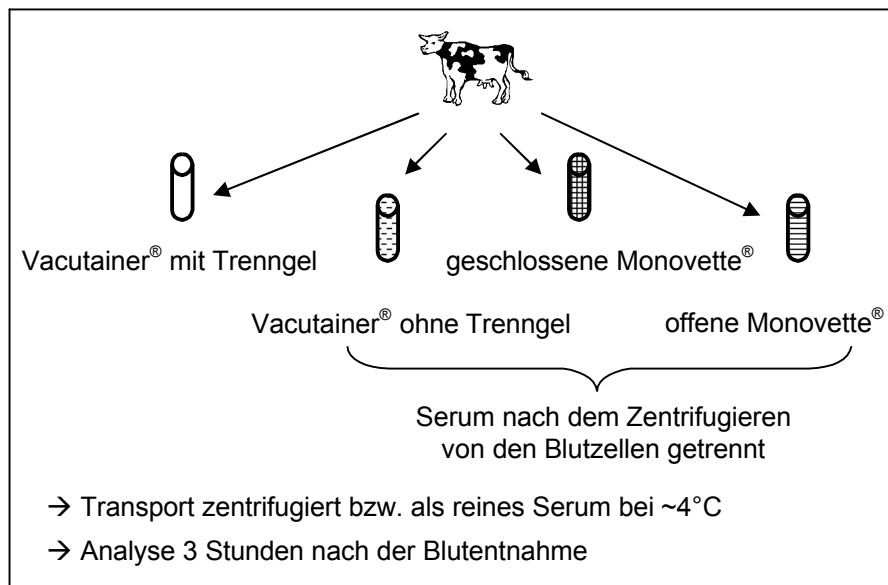
### 3.2.2 Vergleich verschiedener Blutentnahmesysteme

Um einen eventuellen Einfluss verschiedener Blutentnahmesysteme auf ausgewählte Parameter der klinischen Chemie zu untersuchen, wurden von 30 Kühen je vier Blutproben mit unterschiedlichen Blutentnahmesystemen aus der Schwanzvene (Vena caudalis mediana) entnommen. Als Blutentnahmesysteme wurden ein offenes System, ein geschlossenes System und das Vacutainer®-System ausgewählt. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

Als erstes wurden mit dem Vacutainer®-System eine Serum-Probe ohne Trenngel und eine mit Trenngel gewonnen. Dann erfolgte ein erneuter Einstich in die Vene mit der Straußkanüle und das Blut wurde in einer offenen Serum-Monovette® aufgefangen. Direkt danach wurde eine weitere Serum-Monovette® auf die Kanüle gesetzt und durch Aspiration des Blutes eine vierte Serumprobe gewonnen.

Nach 30 Minuten Gerinnungszeit wurden die Proben bei 3000g über 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das weitere Probenhandling erfolgte anlehnend an übliche Praxisbedingungen. Daher wurde das Serum aus den drei Proben, in denen keine Separierung der Blutzellen

mittels Trenngel erfolgte, in Sarstedt-Röhren ohne Zusatz abpipettiert. Der Transport der Serum-Proben zum Labor erfolgte gekühlt. Im Labor wurden im Serum die Parameter Aspartat-Amino-Transferase (AST),  $\beta$ -Hydroxy-Buttersäure (BHBS), Freie Fettsäuren (NEFA), Glukose, anorganisches Phosphat, Kalium und Natrium spätestens drei Stunden nach der Blutentnahme mit dem Konelab<sup>®</sup>30i der Firma Thermo Electron Corporation bestimmt.



**Abb. 3.4: Versuchsaufbau zum Vergleich verschiedener Blutnahmesysteme.**

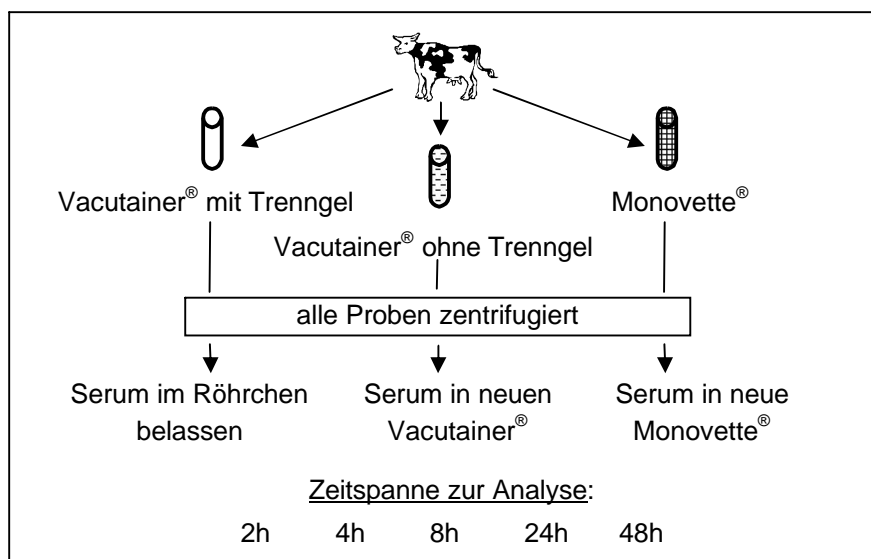
Die Blutentnahme erfolgte mit vier verschiedenen Systemen. Nach der Zentrifugation wurde das Serum aus den Proben ohne Trenngel vor dem Transport abpipettiert.

### 3.2.3 Untersuchungen zu den Freien Fettsäuren

Auf Grund der Ergebnisse der vorangegangenen Versuche wurde vermutet, dass Wechselwirkungen zwischen dem Probenmaterial der Vacutainer<sup>®</sup> und den Freien Fettsäuren stattgefunden haben könnten. Um dies näher zu untersuchen wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, in dem das Serum in den verschiedenen Blutnahmesystemen zusätzlich gelagert wurde. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

Für diesen Versuch wurden von neun Kühen je drei Blutproben aus der Schwanzvene (Vena caudalis mediana) entnommen. Als erstes wurden mit dem Vacutainer<sup>®</sup>-System eine Serum-Probe ohne Trenngel und eine Serum-Probe mit Trenngel gewonnen. Zum Vergleich wurde eine weitere Serum-Probe mit der Sarstedt-Monovette<sup>®</sup> und aufgesetzter Kanüle durch Aspiration des Blutes entnommen. Nach 30 Minuten Gerinnungszeit wurden sie bei 3000g über 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Um einen möglichen Einfluss des Probenmaterials während der Lagerung untersuchen zu können, wurde das Serum diesmal nicht in neutrale Auffang-

röhrchen umpipettiert. Stattdessen wurde das Serum aus Vacutainern<sup>®</sup> ohne Trenngel zur Lagerung in frische Vacutainer<sup>®</sup> ohne Trenngel umpipettiert und das Serum aus den Monovetten<sup>®</sup> in neue Serum-Monovetten<sup>®</sup>. Das Serum in den Vacutainern<sup>®</sup> mit Trenngel wurde in diesen Röhrchen zur Lagerung belassen, um einen möglichen Einfluss des Trenngel zu untersuchen zu können. Die Bestimmung der Freien Fettsäuren in den 27 Serum-Proben erfolgte zu fünf Untersuchungszeitpunkten (2h, 4h, 8h, 24h, 48h) nach der Blutentnahme. Für die Analyse wurde die nötige Serum-Menge (~200µl) in Eppendorf-Röhrchen pipettiert, während der Rest der Proben weiterhin dunkel im Kühlschrank gelagert wurde. Die Bestimmung der Freien Fettsäuren im Serum erfolgte mit dem NEFA-Kit von Randox Laboratories (Crumlin, UK) im Analyse-Gerät Cobas Mira Plus<sup>®</sup> der Firma Roche Diagnostics (Rotkreuz, Schweiz).



**Abb. 3.5: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Freien Fettsäuren.**  
Erläuterungen im Text.

#### 3.2.4 Bestimmungsmethoden in den Versuchen

Die Analysen wurden mit Hilfe des Konelab<sup>®</sup>30i der Firma Thermo Electron GmbH (Dreieich, Deutschland) durchgeführt. Bis auf GLDH, BHBS und NEFA wurden für alle Parameter die vom Gerätehersteller produzierten Reagenzien bzw. dessen angebotene Bestimmungsmethoden im Analysegerät verwendet. Die Bestimmung der GLDH erfolgte im Konelab<sup>®</sup>30i mit LT-SYS<sup>®</sup> der Firma Labor + Technik Eberhard Lehmann (Berlin, Deutschland). BHBS und NEFA wurden mit Reagenzien der Firma Wako Chemicals GmbH (Neuss, Deutschland) bestimmt. Des Weiteren wurde von allen untersuchten Proben ein Hämolyseindex erstellt. Die verwendeten Bestimmungsmethoden werden nachfolgend wiedergegeben.

Aspartat-Amino-Transferase (AST):

Die Bestimmung der AST-Aktivität erfolgt nach der Referenzmethode des IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) (siehe Kapitel 2.4.1).

$\gamma$ -Glutamyl-Transferase ( $\gamma$ -GT):

Die  $\gamma$ -GT wird in den Blutproben nach der Referenzmethode des IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) analysiert (siehe Kapitel 2.4.2).

Glutamat-Dehydrogenase:

Die Bestimmung der GLDH erfolgt photometrisch nach der Standardmethode der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin eV. (siehe Kapitel 2.4.3).

Bilirubin:

Das indirekte (unkonjugierte) Bilirubin wird durch ein Tensid und Salzsäure freigesetzt. Das Gesamtbilirubin wird mit p-Nitro-Benzendiazonsalz (NBD) zu einem entsprechenden Azobilirubin gekuppelt. Die Farbintensität des gelösten Farbstoffes verhält sich proportional zur Konzentration des Gesamtbilirubins.

Bei diesem Test handelt es sich um eine Abwandlung des Diazo-Verfahrens nach Malloy-Evelyn (siehe Kapitel 2.4.4).

Gesamteiweiß:

Das Gesamteiweiß wird in den Blutproben mit der Standardmethode, der sogenannten Biuret-Reaktion, analysiert (siehe Kapitel 2.4.5).

Proteine bilden in alkalischen Lösungen einen farbigen Komplex mit Kupfer-Ionen. Die Bildung des Komplexes wird bei 540 nm gemessen. Bei dieser Methode wird EDTA als komplexbildendes und stabilisierendes Mittel für Kupferionen eingesetzt. Die Reagenzlösung enthält daher Natriumhydroxid (NaOH), Kupfersulfat (CuSO<sub>4</sub>), Kaliumiodid (KI) und EDTA (Na<sub>2</sub>-EDTA).

Cholesterin:

Die Bestimmung des Cholesterins erfolgt vollenzymatisch mit der Standardmethode (siehe Kapitel 2.4.6).

Harnstoff:

Harnstoff wird mit der optimierten Standardmethode nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie, folglich mit dem Urease-GLDH-UV-Test, bestimmt (siehe Kapitel 2.4.7). Dabei ist die Abnahme der Absorption von NADH bei 340 nm proportional zur Harnstoffkonzentration in der Probe.

$\beta$ -Hydroxy-Buttersäure (BHBS):

Die Bestimmung der BHBS im Serum erfolgt mit der zyklisch-enzymatischen Methode (siehe Kapitel 2.4.8).



#### Freie Fettsäuren (NEFA):

Die Messung der Freien Fettsäuren wird enzymatisch mit der ACS/ACOD-Methode durchgeführt (siehe Kapitel 2.4.9).

#### Glukose:

Die Blutglukose wird enzymatisch mit Hilfe der Hexokinase-Methode bestimmt (siehe Kapitel 2.4.10).

#### Natrium:

Die Bestimmung des Natriumgehaltes erfolgt im Konelab<sup>®</sup>30i nach dem Prinzip der Potentiometrie mit ionenselektiver Elektrode.

#### Kalium:

Auch die Bestimmung des Kaliumgehaltes erfolgt im Konelab<sup>®</sup>30i mit der ionenselektiven Elektrode (siehe Kapitel 2.4.12).

#### Kalzium:

Der Kalziumgehalt wird komplexometrisch gemessen (siehe Kapitel 2.4.13). Dabei wird Arsenazo III verwendet. Dieser Indikator bildet mit Kalziumionen bei neutralem pH einen stark gefärbten Komplex, der bei 660 nm gemessen wird.

#### Anorganisches Phosphat:

Die Konzentration des anorganischen Phosphats wird in den Proben mit Hilfe der direkten Methode bestimmt, bei der die Intensität der Gelbfärbung des Phosphomolybdat-Komplexes gemessen wird, die proportional zum Phosphatgehalt ist (siehe Kapitel 2.4.14).

#### Hämolyseindex:

Der Hämolyseindex wurde im Serum von den Laborantinnen mit dem bloßen Auge auf einer Skala von 0-3 eingeschätzt. Dabei bedeutet 0 keine Hämolyse und 3 starke Hämolyse.

### 3.3 Datenauswertung und Statistik

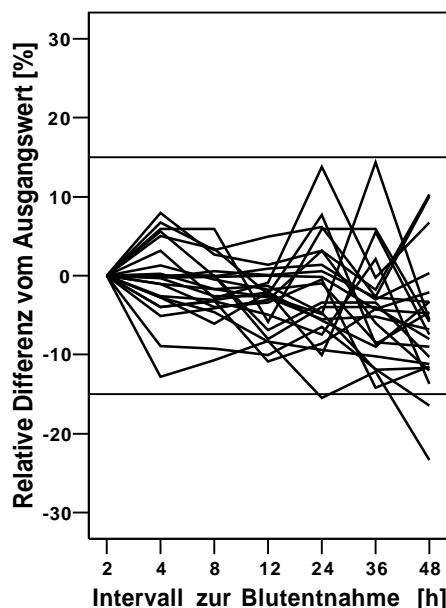
Die Dateneingabe erfolgte mit MS-Excel für Windows und die statistische Analyse mit dem Statistikprogramm SPSS 12.0 für Windows. Nachfolgend wird die statistische Auswertung der drei Versuchsreihen erläutert.

#### 3.3.1 Verhalten der Parameter unter verschiedenen Transportbedingungen

In diesem Versuch wurden die Blutproben unterschiedlichen Transportbedingungen hinsichtlich Temperatur und Zentrifugationsstatus ausgesetzt und zu unterschiedlichen Zeiten analysiert.

##### 3.3.1.1 Relativer Verlauf über 48 Stunden

Anlehnend an die Publikation von HEINS et al. (1995) wurden die Ergebnisse dieser Studie auf relativer Basis ausgewertet. Zwei Stunden nach der Blutentnahme erfolgte die erste Analyse, so dass dieser Wert als Bezugswert bzw. Ausgangswert definiert wurde. Zu jedem Analyse-Zeitpunkt wurde die relative Abweichung bzw. Differenz von diesem Ausgangswert berechnet und graphisch dargestellt. In diesen Graphiken (siehe Abb. 3.6) wurde das relative Verhalten der einzelnen Parameter über den Untersuchungszeitraum hinweg beim jeweiligen Transportzustand dargestellt. Jede einzelne Linie entspricht dabei den Daten von einer Kuh. Weiterhin wurden die festgelegten Grenzwerte (siehe Kapitel 3.3.1.3) als horizontale Linien in die Diagramme eingefügt.



**Abb. 3.6:** Beispiel für die Darstellung der relativen Differenzen vom Ausgangswert. Erläuterungen im Text.

### **3.3.1.2 Variationskoeffizienten**

Es wurde die Variation der Messdaten, die durch den Umgang mit den Proben von der Blutentnahme bis zur Analyse im Labor erzeugt wird (Handling-VK), bestimmt. Des Weiteren wurde die Variation, die durch die Messgeräte und die Chargen der jeweiligen Reagenzien beeinflusst wird (Analyse-VK), ermittelt. Diese Variationskoeffizienten (VK) werden in Tabelle 3.5 wiedergegeben.

Für die Ermittlung des Handling-VK's wurden von einer Kuh entsprechend viele Blutproben abgenommen, als würde es sich um fünf Kühe handeln (siehe Kapitel 3.2.1). Alle Proben wurden zwei Stunden nach der Blutentnahme analysiert, da dies dem Zeitpunkt der ersten Analyse im Hauptversuch entsprach. Mit den Daten wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Bei diesem statistischen Verfahren wird mit Hilfe der Stichprobe der Mittelwert der angenommenen Grundgesamtheit geschätzt und so die Variation in der Grundgesamtheit berechnet (BACKHAUS et al., 2003).

Zur Ermittlung des Analyse-VK's wurden von einer Kuh eine Serum- und eine Natrium-Fluorid-Probe entnommen und eine Zehnfach-Bestimmung dieser Proben durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.1). Der Analyse-VK wurde nach der Formel

$$VK = s / \bar{x}$$

ermittelt.  $\bar{x}$  gibt dabei den arithmetischen Mittelwert und  $s$  die Standardabweichung der Einzelwerte von diesem Mittelwert an. Da die Analyse-Automaten und Reagenzien-Chargen in diesem Versuch nicht variierten, wurde kein statistisches Schätzverfahren herangezogen.

### **3.3.1.3 Festlegung von Grenzwerten**

Um die Stabilität der verschiedenen Parameter zu beurteilen, wurden Grenzwerte für die maximal vertretbare Abweichung vom Ausgangswert (2h-Wert) für jeden untersuchten Parameter festgelegt. Dies erfolgte auf relativer Basis, da in dieser Studie sowohl Blut von gesunden als auch von kranken Kühen verwendet wurde (Tabelle 3.5).

Unter Stabilität wird die Fähigkeit eines Probenmaterials verstanden, bei Lagerung unter definierten Bedingungen den anfänglichen Wert einer zu messenden Größe für eine definierte Zeitspanne innerhalb festgelegter Grenzen zu halten. Als maximal zulässige Instabilität wird eine Abweichung definiert, die der maximal zulässigen relativen Unpräzision der Analytik entspricht (GUDER et al., 2002). Diese Unpräzision wird in der Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen wiedergegeben (BUNDESÄRZTEKAMMER, 2003). Eine vergleichbare Richtlinie für die Veterinärmedizin existiert derzeit noch nicht, daher wurde diese Richtlinie aus der Humanmedizin als Anhaltspunkt zur Festlegung der Grenzwerte verwendet.

Für jeden Parameter wurde ermittelt, ab welcher prozentualen Abweichung es zu einer fehlerhaften Interpretation des Laborbefundes kommen könnte. So wurde mit Hilfe der Richtlinie der Bundesärztekammer, der ermittelten Variationskoeffizienten (VK), der Referenzbereiche und der klinischen Bedeutsamkeit der endgültige Grenzwert für den jeweiligen Parameter festgelegt.

Für Gesamteiweiß wurde z.B. auf Grund des Handling-VK's von 1,60%, einem Analyse-VK von 1,76% und einer maximal zulässigen Instabilität von 3% der Grenzwert für die vertretbare Abweichung vom Ausgangswert auf 6% festgelegt (gerundet  $1,60+1,76+3,00$ ).

Bei anderen Parametern wurden die rechnerisch ermittelten Grenzwerte mit Hilfe der Referenzbereiche und an Hand der klinischen Bedeutsamkeit einer Abweichung vom „wahren“ Wert korrigiert und damit der endgültige Grenzwert für den jeweiligen Parameter festgelegt. So wurde z.B. für die AST bei einem Handling-VK von 2,66%, einem Analyse-VK von 1,46% und einer maximal zulässigen Instabilität von 6% rechnerisch ein Grenzwert von 10% ermittelt. Dieser wurde für diesen Versuch auf 20% nach oben korrigiert, da es erst ab dieser Abweichung vom „wahren“ Wert zu einer fehlerhaften Aussage des Praktikers durch Interpretation des Laborbefundes kommen könnte. Damit würde es sich erst dann um eine klinisch relevante Abweichung handeln.

Für die GLDH, die BHBS und die NEFAs waren in der Richtlinie der Bundesärztekammer keine Angaben zur maximal zulässigen Unpräzision zu finden, so dass hier der Grenzwert nur mit Hilfe der Variationskoeffizienten und an Hand der klinischer Bedeutsamkeit festgelegt werden konnte.

So wurde für die GLDH eine Gesamtvariation von 2,5% ermittelt, klinisch relevant wäre aber erst eine Abweichung von 20% vom „eigentlichen“ Wert, die zu einer fehlerhaften Diagnose führen könnte.

Bei der Bestimmung des Grenzwertes für die BHBS konnte der Handling-VK nicht berücksichtigt werden. Dieser war sehr hoch, da im Verlauf der Blutentnahme ein Anstieg der BHBS-Konzentration im Serum zu beobachten war.

Der Grenzwert für Harnstoff wurde anlehnend an die Richtlinie der Bundesärztekammer festgelegt, da größere Abweichungen vom „eigentlichen“ Wert zu einer fehlerhaften Diagnose für das Tier führen könnten. Der hohe Analyse-VK lässt jedoch den ermittelten Handling-VK als fragwürdig erscheinen, da zur Ermittlung des Handling-VK auch eine Analyse durchgeführt werden musste.

**Tab. 3.5: Variationskoeffizienten und festgelegte Grenzwerte.**

Die Grenzwerte für die maximal vertretbare Abweichung vom Ausgangswert wurden mit Hilfe der Richtlinie der Bundesärztekammer, den ermittelten Variationskoeffizienten (VK) und an Hand der klinischen Bedeutsamkeit definiert (Erläuterungen im Text).

Parameter	Maximal zulässige Instabilität <sup>1</sup>	Handling-VK <sup>2</sup>	Analyse-VK <sup>4</sup>	Referenzbereich <sup>3</sup>	Grenzwert <sup>4</sup>
AST	6 %	2,66 %	1,46 %	< 1,34 µkat/l	20 %
γ-GT	6 %	0,00 %	1,08 %	< 0,64 µkat/l	20 %
GLDH	–	1,69 %	0,79 %	< 310 nkat/l	20 %
Gesamteiweiß	3 %	1,60 %	1,76 %	60-80 g/l	6 %
Bilirubin	7 %	2,83 %	7,22 %	< 6,67 µmol/l	15 %
Cholesterin	4 %	3,26 %	0,00 %	2,05-4,47 mmol/l	10 %
BHBS	–	15,74 %	2,03 %	312-733 µmol/l	10 %
NEFA	–	5,28 %	0,73 %	< 0,5 mmol/l	20 %
Glukose (Serum)	5 %	2,42 %	1,68 %	2,21-3,61 mmol/l	8 %
Glukose (NaF-Plasma)	5 %	2,70 %	1,68 %	2,21-3,61 mmol/l	8 %
Harnstoff	7 %	3,18 %	7,31 %	3,34-6,51 mmol/l	8 %
Natrium	1,8 %	0,30 %	0,00 %	134-157 mmol/l	8 %
Kalium	2,5 %	1,78 %	0,27 %	3,5-4,5 mmol/l	8 %
Kalzium	3 %	1,64 %	0,84 %	2,2-2,9 mmol/l	5 %
Phosphat	5 %	1,30 %	1,09 %	1,61-2,30 mmol/l	5 %

<sup>1</sup> Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (Fassung vom 14.11.2003)

<sup>2</sup> Eigene Analyse (siehe Kapitel 3.3.1.2)

<sup>3</sup> Referenzbereiche des kooperierenden Labors (VMDI Berlin)

<sup>4</sup> Eigene Festlegung (Erläuterungen im Text)

Nach der Durchführung dieser Studie wurde eine überarbeitete Fassung der Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (Fassung vom 23.11.2007, gültig ab 01.04.2008) veröffentlicht, in der keine Angaben zur maximal zulässigen Unpräzision bzw. Instabilität der einzelnen Parameter im Blut angegeben werden. Dahingegen werden überarbeitete Werte für die zulässige relative Abweichung des Einzelwertes angegeben. Diese kommen in vielen Fällen den festgelegten Grenzwerten dieser Studie nahe, liegen jedoch in manchen Fällen auch höher als der festgelegte Grenzwert (siehe Tab. 3.6). Da diese überarbeitete Fassung der Richtlinie erst nach der Auswertung der Daten dieser Studie veröffentlicht wurde, konnte sie bei der Festlegung der Grenzwerte nicht mehr berücksichtigt werden.

**Tab. 3.6: Vergleich der Angaben aus der Richtlinie der Bundesärztekammer (RiliBÄK) mit den festgelegten Grenzwerten.**

In der neueren Fassung der RiliBÄK wurden andersartige Angaben zur Abweichung der Einzelwerte veröffentlicht (Erläuterungen im Text).

Parameter	Maximal zulässige Instabilität (RiliBÄK 2003)	Zulässige relative Abweichung des Einzelwertes (RiliBÄK 2007)	Festgelegter Grenzwert (eigene Analyse)
AST	6 %	11,5 %	20 %
$\gamma$ -GT	6 %	11,5 %	20 %
GLDH	–	–	20 %
Gesamteiweiß	3 %	6 %	6 %
Bilirubin	7 %	13 %	15 %
Cholesterin	4 %	7 %	10 %
BHBS	–	–	10 %
NEFA	–	–	20 %
Glukose	5 %	11 %	8 %
Harnstoff	7 %	10,5 %	8 %
Natrium	1,8 %	3 %	8 %
Kalium	2,5 %	4,5 %	8 %
Kalzium	3 %	6 %	5 %
Phosphat	5 %	9 %	5 %

### 3.3.1.4 Kumulative Kreuztabellen

An Hand von Kreuztabellen wurde ermittelt, wie viele Proben bei dem jeweiligen Transportzustand zu den einzelnen Bestimmungszeitpunkten schon außerhalb des festgelegten relativen Grenzbereiches lagen. Diese Tabellen wurden in kumulativer Form angefertigt, damit eine Aussage darüber getroffen werden konnte, wie viele Proben bis zu einem bestimmten Zeitpunkt den festgelegten Grenzwert schon überschritten hatten.

Tabelle 3.7 verdeutlicht beispielhaft dieses Vorgehen. Hier zeigt sich, dass 48 Stunden nach der Blutentnahme beim Transportzustand KT-Z (zentrifugiert bei 4°C) insgesamt sechs Proben den Grenzwert überschritten hatten. In Klammern wird diese absolute Zahl relativ ausgedrückt, bezogen auf die Proben, die bei diesem Zustand transportiert wurden. In der letzten Zeile der Tabelle wird die Zahl der Proben angegeben, die innerhalb des Untersuchungszeitraumes nie den Grenzwert überschritten haben.

**Tab. 3.7: Beispiel einer kumulativen Kreuztabelle.**

Erläuterungen siehe Text.

n=23			Zustand		
			KT-Z	RT-Z	RT-UZ
Proben über festgelegtem Grenzwert	4 h	Anzahl (% von Zustand)	1 (4,3%)	1 (4,3%)	2 (8,7%)
	8 h	Anzahl (% von Zustand)	3 (13,0%)	3 (13,0%)	3 (13,0%)
	12 h	Anzahl (% von Zustand)	4 (17,4%)	5 (21,7%)	4 (17,4%)
	24 h	Anzahl (% von Zustand)	5 (21,7%)	5 (21,7%)	4 (17,4%)
	36 h	Anzahl (% von Zustand)	6 (26,1%)	7 (30,4%)	6 (26,1%)
	48 h	Anzahl (% von Zustand)	6 (26,1%)	8 (34,8%)	6 (26,1%)
nach 48 Stunden noch bestimmbar	Anzahl	17	15	17	
	% von Zustand	73,9%	65,2%	73,9%	

Mit Hilfe der Kreuztabellen wurde die Stabilität der untersuchten Parameter ermittelt. Diese entspricht der maximal zulässigen Lagerungszeit und wird von GUDER et al. (2002) mit der Zeitspanne definiert, bei der die Stabilitätsforderung (siehe Kapitel 3.3.1.3) von 95% der Proben nicht verletzt wird.

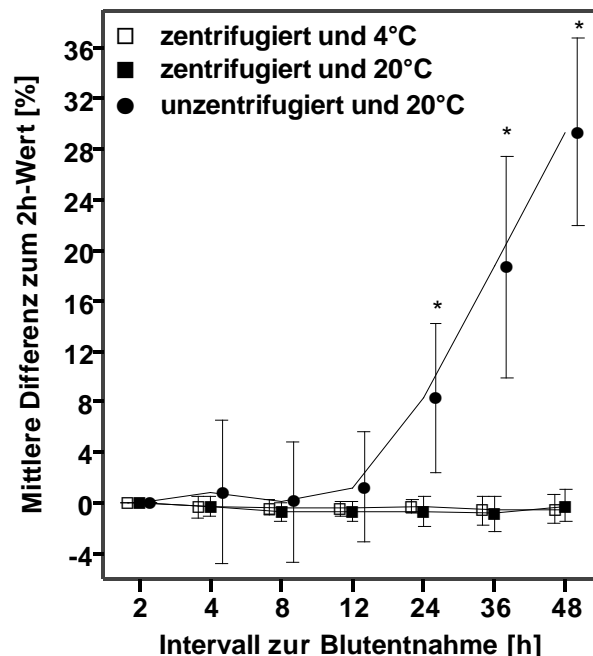
Übertragen auf diesen Versuch bedeutet dies, dass 5% der Proben den jeweiligen festgelegten Grenzwert für die vertretbare Abweichung vom Ausgangswert überschreiten durften. So wie mehr als 5% der Proben den festgelegten Grenzwert überschritten hatten, bildete der davor gelegene Analysezeitpunkt das Ergebnis für die Stabilität des Parameters in dieser Studie. Dies ist der Zeitpunkt, bis zu dem mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Analyseergebnis erzielt wird, das dem „wirklichen“ Befund nahe kommt und legt somit die vertretbare Transportdauer fest. Laut GUDER et al. (2002) ist bei Überschreiten der vertretbaren Transport-

dauer bzw. maximal zulässigen Lagerungszeit der Probe von einer medizinisch relevanten Verfälschung des Ergebnisses auszugehen.

Die zu ermittelnde vertretbare Transportdauer aus der Beispieltabelle (Tab. 3.7) liegt daher bei vier Stunden für Proben, die zentrifugiert bei 4°C oder 20°C (KT-Z und RT-Z) transportiert werden, und bei weniger als vier Stunden für unzentrifugierte Proben (RT-UZ).

### **3.3.1.5 Fehlerbalken-Diagramme**

Um einen Überblick über die Variabilität der Messdaten zu erhalten, wurden die einzelnen relativen Verläufe (siehe Kapitel 3.3.1.1) in Fehlerbalken-Diagrammen zusammengefasst. Hier wurden die Mittelwerte der relativen Abweichungen vom Ausgangswert für jeden Transportzustand der Proben dargestellt. Der Übersichtlichkeit wegen wurden die Daten der zentrifugierten Proben mit einem Kästchen und die Daten der Raumtemperatur-Proben mit einem schwarz ausgemalten Symbol in den Graphiken gekennzeichnet. Die Länge der Fehlerbalken zeigt die Höhe der einfachen Standardabweichung und stellt damit die Stärke der Streuung der Einzelwerte um den jeweiligen Mittelwert dar. Des Weiteren wurden oben auf den Fehlerbalken diejenigen Mittelwerte mit einem Sternchen markiert, für die eine signifikante Differenz ( $p \leq 0,05$ ) zum Ausgangswert bestimmt werden konnte (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7: Beispiel eines Fehlerbalken-Diagrammes.**

Erläuterungen siehe Text.



### **3.3.1.6 Statistisches Testverfahren**

Um der zentralen Frage nachzugehen, ob der Transportzustand und die Transportdauer Einfluss auf ausgewählte klinisch chemische Parameter haben, wurde folgende Nullhypothese ( $H_0$ ) aufgestellt:

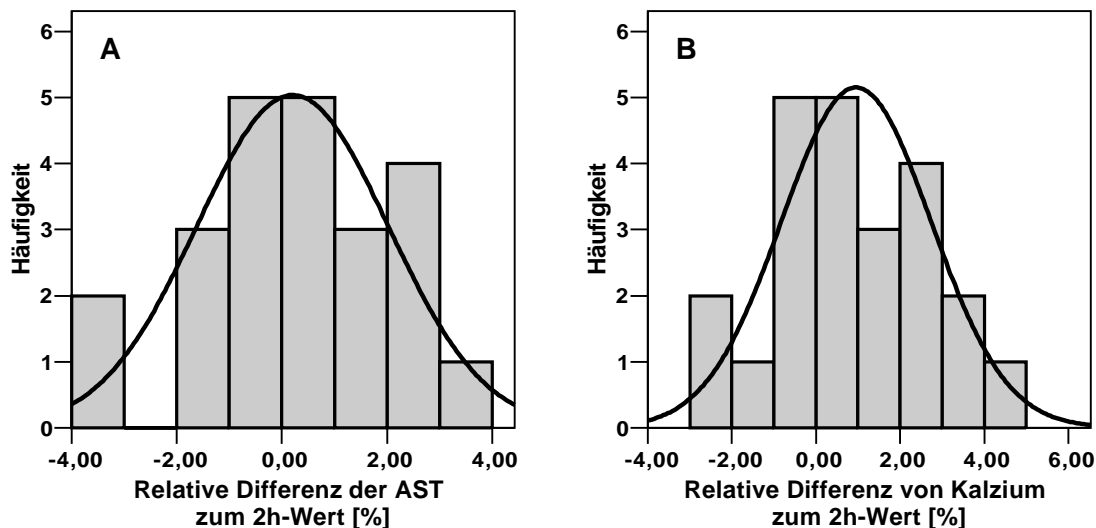
Die Transportbedingungen (Zustand und Dauer) haben keinen Einfluss auf klinisch-chemische Parameter im Rinderblut. Das heißt, nach 48 Stunden Transport / Lagerung sind unabhängig von den Transportbedingungen keine Unterschiede zum Ausgangswert (2h-Wert) feststellbar bzw. die festgestellten Unterschiede sind zufällig.

Mit Hilfe eines statistischen Testverfahrens wird die Entscheidung getroffen, ob das erzielte Stichprobenergebnis  $H_0$  stützt oder nicht. Wird die Nullhypothese abgelehnt, so wird daraus abgeleitet, dass die Alternativhypothese ( $H_1$ ) gültig ist, die in dem vorliegenden Fall besagt: Die Transportbedingungen (Zustand und Dauer) haben einen Einfluss auf klinisch-chemische Parameter im Rinderblut und die Unterschiede sind nicht mehr als zufällig anzusehen bzw. ein signifikanter Effekt liegt vor.

Es wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% gewählt. Diese gibt den Grenzwert für die Entscheidung an, wo die zufallsbedingten Unterschiede aufhören. Ein Befund von Nichtsignifikanz bedeutet nicht, dass die Nullhypothese richtig ist, sondern nur, dass sie nicht abgelehnt werden kann. Dies ergibt sich daraus, dass das Risiko für das Auftreten von einem Fehler 1. Art (unberechtigte Ablehnung der Nullhypothese) oder 2. Art (unberechtigte Beibehaltung der Nullhypothese) auch vom Stichprobenumfang abhängt (LOZÁN, 1992).

Um ein Testverfahren auszuwählen, wurde zuerst eine Überprüfung auf Normalverteilung der ermittelten Differenzen vom Ausgangswert durchgeführt. Hierzu wurde zu jedem Analysezeitpunkt beim jeweiligen Transportzustand für jeden Parameter ein Histogramm erstellt, das die Verteilung der relativen Differenzen zu diesem Zeitpunkt anzeigt. In Abbildung 3.8 sind zwei von ihnen beispielhaft aufgeführt. Über diese Histogramme konnte das Statistikprogramm eine Gauß-Glockenkurve legen, womit visuell eine annähernde Normalverteilung der Stichprobe nachgewiesen wurde.

Auf Grund der annähernden Normalverteilung der Daten wurde der t-Test als statistisches Testverfahren ausgewählt. Hierbei wird die Nullhypothese verworfen, wenn die obere Grenze der Irrtumswahrscheinlichkeit (Signifikanzniveau,  $p$ ) von 5% überschritten wird. Ein Ergebnis von  $p \leq 0,05$  wird daher als signifikant angesehen bei einer Vertrauenswahrscheinlichkeit von 95%. Diese 95% geben das Konfidenzintervall an, welches aus den vorliegenden Stichprobenwerten ein geschätztes Intervall aus der Grundgesamtheit darstellt, in dem der untersuchte Wert (hier die relative Differenz vom Ausgangswert) mit der vorgegebenen Vertrauenswahrscheinlichkeit liegt (SACHS und HEDDERICH, 2006). Das heißt, wenn  $p \leq 0,05$ , wird in etwa 95% der Fälle die relative Differenz vom Ausgangswert innerhalb dieses Konfidenzintervalls liegen, und ist damit nicht mehr als zufällig anzusehen.



**Abb. 3.8: Histogramme zur Ermittlung der Normalverteilung der Daten.**

A: AST nach 8h in zentrifugierten Proben bei 4°C (KT-Z),

B: Kalzium nach 24h in zentrifugierten Proben bei 20°C (RT-Z).

Mit Hilfe des t-Tests für einzelne Stichproben wurde daher das Signifikanzniveau der Mittelwerte der relativen Differenzen vom Ausgangswert für jeden Parameter bei jedem Transportzustand und jeder Transportdauer berechnet. Damit wurde untersucht, ob sich der Mittelwert dieser konkreten Stichprobe nur zufällig oder statistisch signifikant von dem geschätzten Erwartungswert der Grundgesamtheit unterscheidet. Ergebnisse mit  $p \leq 0,05$  wurden als signifikant bewertet und in den Fehlerbalken-Diagrammen mit Hilfe von Sternchen gekennzeichnet (siehe Abb. 3.7). Für die ermittelten Daten zu diesen Zeitpunkten konnte die Differenz vom Ausgangswert nicht mehr als zufällig angesehen werden, so dass dann in diesem Falle die Nullhypothese abgelehnt wurde.

### 3.3.1.7 Zweifaktorielle Varianzanalyse

Unter Verwendung der zweifaktoriellen Varianzanalyse erfolgte die Untersuchung, ob die Temperatur oder die Zentrifugation den größeren Einfluss auf die Stabilität der einzelnen Parameter hat.

Hierbei handelt es sich um ein statistisches Analyseverfahren, das die Wirkung zweier unabhängiger nichtmetrischer Variablen auf eine abhängige metrische Variable (hier der jeweilige Parameter) untersucht (BACKHAUS et al., 2003). Demnach musste diese Analyse für die formulierte Fragestellung in zwei Schritten durchgeführt werden.

Im ersten Schritt wurden alle Proben, die bei 20°C transportiert wurden, untersucht. Die zwei unabhängigen nichtmetrischen Variablen, die hierbei untersucht wurden, waren der Zentrifugationsstatus, also zentrifugiert oder unzentrifugiert, und die Transportdauer.

Im zweiten Durchgang wurden alle zentrifugierten Proben für eine weitere zweifaktorielle Varianzanalyse herangezogen. Als unabhängige nichtmetrische Variablen wurden nun die Temperatur, also 4°C oder 20°C, und wiederum die Transportdauer eingesetzt.

Die Ergebnisse dieser Varianzanalysen wurden in Form von Variationskoeffizienten wiedergegeben.

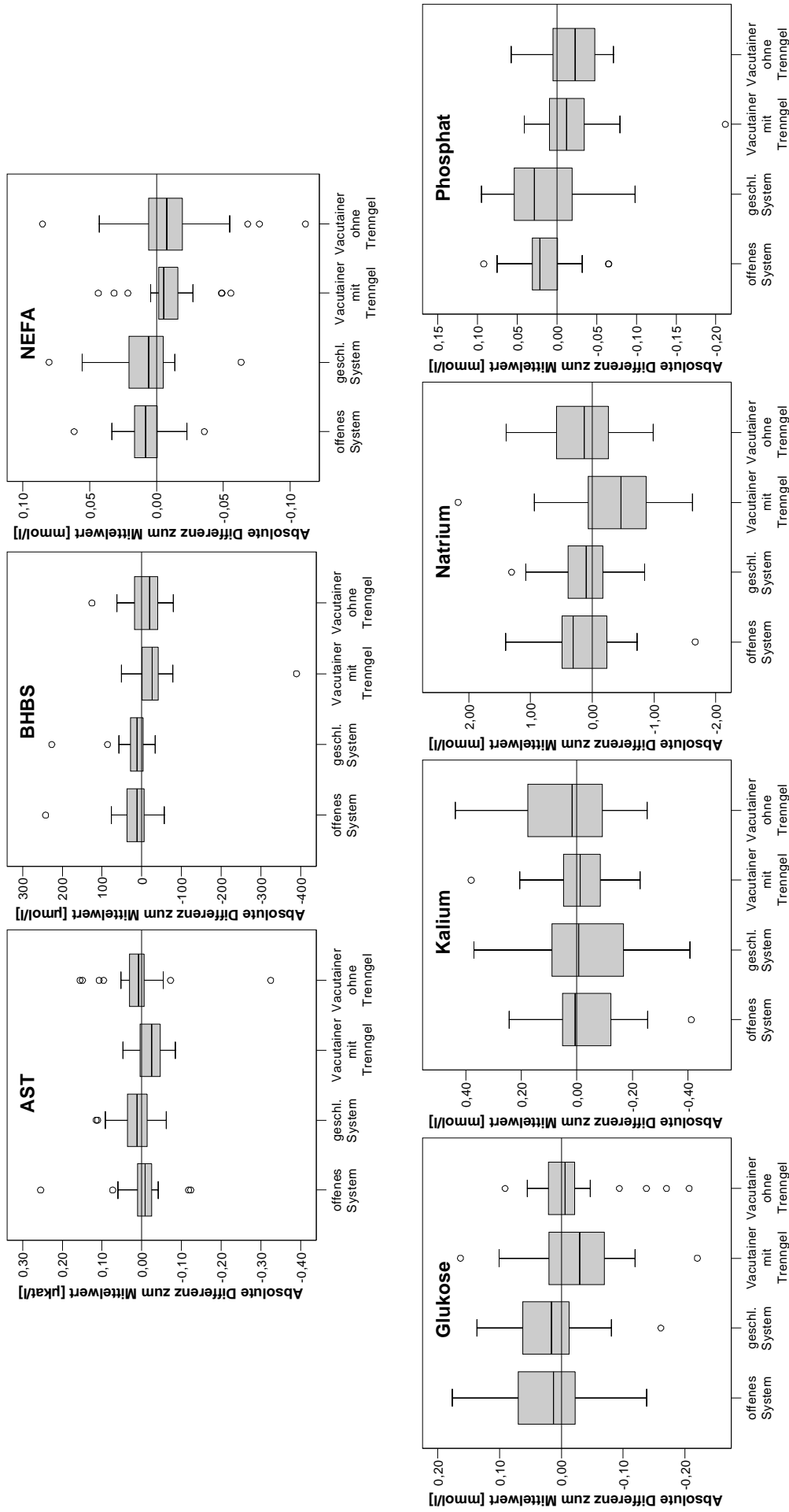
### **3.3.2 Vergleich verschiedener Blutentnahmesysteme**

In diesem Versuch wurden Blutproben mit unterschiedlichen Blutentnahmesystemen gewonnen und untersucht, ob das Blutentnahmesystem einen Einfluss auf ausgewählte Parameter der klinischen Chemie bei Rinderblutproben hat. Zunächst wurde das Bezugssystem ermittelt, bevor ein Systemvergleich durchgeführt werden konnte.

#### **3.3.2.1 Entscheidung über das Bezugssystem**

Für jede Kuh wurden aus den Daten der vier verwendeten Blutentnahmesysteme die individuellen Mittelwerte für jeden Parameter errechnet und für jedes untersuchte System die absoluten Differenzen zu diesem errechneten Mittelwert bestimmt. Die vergleichende Darstellung dieser Differenzen erfolgte für jeden Parameter mit Boxplot-Diagrammen (Abb. 3.9).

In den Boxplot-Diagrammen ist die Verteilung der absoluten Differenzen zum individuellen Mittelwert graphisch dargestellt. Die Lage der Daten des ersten bis dritten Quartils (mittleren 50% der Daten) werden durch eine Box hervorgehoben. Der Median ist innerhalb der Box mit einem Balken gekennzeichnet und gibt durch seine Lage einen Eindruck darüber, ob die Daten symmetrisch oder schief verteilt sind. Die Länge der Box beschreibt den Interquartilsabstand, der ein Maß für die Streuung ist. Die vertikalen Linien an der Box werden als Whisker bezeichnet und haben die maximale Länge des 1,5-fachen Interquartilsabstandes, wobei die abgetragene Länge durch einen Wert aus den Daten bestimmt wird. Ausreißer (1,5- bis 3-facher Interquartilsabstand) und Extremwerte (größer als dreifacher Interquartilsabstand) werden in dieser Darstellung durch Kreise ober- und unterhalb der Whisker deutlich. Gibt es keine Werte außerhalb der Whisker, wird die Länge der Whisker durch den maximalen bzw. minimalen Wert festgelegt (vgl. SACHS und HEDDERICH, 2006).



**Abb. 3.9: Differenzen der Blutentnahmesysteme zum individuellen Mittelwert.**

Für jede Kuh wurde der individuelle Mittelwert von jedem Parameter aus den Daten der vier Blutentnahmesysteme ermittelt. Dann wurde die absolute Differenz der jeweiligen Daten zu diesem Mittelwert bestimmt und in diesen Diagrammen graphisch dargestellt.

Als Entscheidungskriterium für die Festlegung des Bezugssystems wurde vorrangig die Streuung der Differenzen um ihren Mittelwert betrachtet, da eine kleine Standardabweichung für den jeweiligen Parameter das günstigste Blutentnahmesystem darstellt. Ferner wurde als zusätzliches Auswahlkriterium der Median der Differenzen betrachtet. Hierbei war wiederum interessant, bei welchem System der Median am nächsten beim Wert Null lag, also die Differenz zum Mittelwert am geringsten war.

In Tabelle 3.8 wird für jeden Parameter angegeben, bei welchem Blutentnahmesystem die Streuung der Differenzen um ihren Mittelwert am geringsten war und bei welchem System der Median am nächsten beim Wert Null lag. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die geschlossene Monovette® als Bezugssystem für den Vergleich der vier verschiedenen Blutentnahmesysteme ausgewählt.

**Tab. 3.8: Übersicht über die Streuung um den individuellen Mittelwert und den Median.**

Markiert wurde für jeden Parameter das Blutentnahmesystem, bei dem die geringste Streuung ermittelt wurde und der Median am nächsten bei Null lag.

Parameter	offene Monovette®		geschlossene Monovette®		Vacutainer® mit Trenngel		Vacutainer® ohne Trenngel	
	s	Median	s	Median	s	Median	s	Median
BHBS				x			x	
NEFA	x					x		
AST					x			x
Glukose			x					x
Phosphat	x					x		
Natrium			x	x				
Kalium				x	x			

### 3.3.2.2 Vergleich der Blutentnahmesysteme

Der Vergleich der Blutentnahmesysteme wurde mit den absoluten Differenzen zwischen den Serumgehalten der verschiedenen Blutentnahmesysteme und dem Serumgehalt aus dem festgelegten Bezugssystem (siehe Kapitel 3.3.2.1) für jede Kuh und jeden Parameter einzeln durchgeführt. Diese Differenzen wurden mit Hilfe von Boxplot-Diagrammen veranschaulicht.

Eine statistische Prüfung dieser Ergebnisse wurde wie beim vorangegangenen Versuch (siehe Kapitel 3.3.1.6) nach Prüfung auf annähernde Normalverteilung mit dem t-Test für einzelne Stichproben durchgeführt. Es wurde das Signifikanzniveau der Mittelwerte der absoluten Differenzen des entsprechenden Blutentnahmesystems vom Bezugssystem (geschlossene Monovette®) ermittelt.

### 3.3.3 Untersuchungen zu den Freien Fettsäuren

In dieser Versuchsreihe wurden mögliche Wechselwirkungen zwischen den Freien Fettsäuren im Serum und dem Röhrchenmaterial der Vacutainer® oder dem Trenngel der Vacutainer® untersucht. Dazu wurden verschiedene Blutentnahmesysteme verwendet und die Proben bei 4°C über 48 Stunden gelagert.

Die Ergebnisse dieses Versuches wurden beschreibend mit Hilfe eines Fehlerbalken-Diagramms ausgewertet ähnlich wie in der ersten Versuchsreihe (Verhalten der Parameter unter verschiedenen Transportbedingungen; siehe Kapitel 3.3.1.5). Dazu wurden die relativen Abweichungen vom Ausgangswert (2h-Wert) zu jedem Bestimmungszeitpunkt für jedes Blutentnahmesystem bestimmt und in diesem Diagramm abgetragen.

Nach Prüfung auf Normalverteilung erfolgte die statistische Prüfung der Ergebnisse mit dem t-Test für einzelne Stichproben (Erläuterungen siehe Kapitel 3.3.1.6). Statistisch signifikante Ergebnisse ( $p \leq 0,05$ ) wurden im Fehlerbalken-Diagramm mit einem Sternchen gekennzeichnet.

Zusätzlich konnte mit den vorliegenden Daten ein Systemvergleich ähnlich zur zweiten Versuchsreihe (Vergleich verschiedener Blutentnahmesysteme; siehe Kapitel 3.3.2) durchgeführt werden. Die Darstellung dieser Ergebnisse erfolgte in Boxplot-Diagrammen. Das Signifikanzniveau dieser Ergebnisse wurde mit Hilfe des t-Tests für gepaarte Stichproben ermittelt.