

Aus der Klinik für Kleintiere des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

---

***Ex vivo*-Veränderungen von Parametern des Stoffwechselprofils  
im Rinderblut – Ein Beitrag zur Entwicklung von Qualitätsstandards  
für die Blutentnahme beim Rind**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin  
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Birgit Schulze  
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2008

Journal-Nr.: 3278

## **Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;  
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2009

© 2009 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen  
Printed in Germany

ISBN 978-3-941703-29-2

Verlag: DVG Service GmbH  
Friedrichstraße 17  
35392 Gießen  
0641/24466  
[geschaeftsstelle@divg.net](mailto:geschaeftsstelle@divg.net)  
[www.dvg.net](http://www.dvg.net)

Aus der Klinik für Klautiere des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

---

***Ex vivo*-Veränderungen von Parametern des Stoffwechselprofils  
im Rinderblut – Ein Beitrag zur Entwicklung von Qualitätsstandards  
für die Blutentnahme beim Rind**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin  
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Birgit Schulze  
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2008

Journal-Nr.: 3278

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg

Erste Gutachterin: Univ.-Prof. Dr. Kerstin E. Müller (Freie Universität Berlin)

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Helmut Hartmann (Freie Universität Berlin)

Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Klaus Doll (Justus-Liebig-Universität Giessen)

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

cattle, metabolism, blood, blood chemistry, blood sampling, blood specimen collection,  
haemolysis, accuracy, quality assurance, laboratory diagnosis, diagnostic techniques

Tag der Promotion: 14.07.2009

*„Cuiusvis hominis est errare; nullius nisi insipientis perseverare in errore.“*

Jeder Mensch kann sich irren, doch nur ein Narr verharrt im Irrtum.

Cicero, „Philippicae Orationes XII“, 43 v.Chr.



## INHALT

	<b>VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN .....</b>	<b>IV</b>
	<b>VERZEICHNIS DER TABELLEN.....</b>	<b>VI</b>
	<b>VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT: DER FORTSCHRITT DER BLUTUNTERSUCHUNG UND DEREN QUALITÄT .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Historische Entwicklung der Blutuntersuchung .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Relevanz der Blutuntersuchung beim Rind.....</b>	<b>8</b>
2.2.1	Herdenbestandsbetreuung .....	9
2.2.2	Stoffwechselprofil .....	9
2.2.3	Parameter .....	11
<b>2.3</b>	<b>Qualitätssicherung bis zum Labor (Präanalytik).....</b>	<b>19</b>
2.3.1	Der Qualitätsbegriff im Zusammenhang mit der Blutuntersuchung .....	20
2.3.2	Einflussgrößen innerhalb der Präanalytik .....	21
2.3.2.1	Vorgang der Blutentnahme .....	22
2.3.2.2	Blutentnahmesystem .....	23
2.3.2.3	Blutzusätze .....	26
2.3.2.4	Transport der Probe .....	27
2.3.2.5	Kennzeichnung der Probe.....	28
2.3.2.6	Präanalytische Schritte innerhalb des Labors .....	28
2.3.3	Möglichkeiten der Standardisierung der Präanalytik .....	29
2.3.4	Hämolytische Proben .....	30
2.3.5	Stabilität ausgewählter Parameter der klinischen Chemie .....	31
2.3.5.1	Aspartat-Amino-Transferase (AST) .....	31
2.3.5.2	$\gamma$ -Glutamyl-Transferase ( $\gamma$ -GT).....	34
2.3.5.3	Glutamat-Dehydrogenase (GLDH).....	36
2.3.5.4	Bilirubin.....	37
2.3.5.5	Gesamteiweiß.....	39
2.3.5.6	Cholesterin .....	42
2.3.5.7	Harnstoff im Serum .....	45
2.3.5.8	$\beta$ -Hydroxybuttersäure (BHBS) .....	46
2.3.5.9	Freie Fettsäuren (NEFA).....	48
2.3.5.10	Glukose .....	50
2.3.5.11	Natrium .....	53
2.3.5.12	Kalium.....	55
2.3.5.13	Kalzium.....	57
2.3.5.14	Anorganisches Phosphat .....	59

<b>2.4</b>	<b>Bestimmungsmethoden .....</b>	<b>62</b>
2.4.1	Aspartat-Amino-Transferase (AST) .....	63
2.4.2	$\gamma$ -Glutamyl-Transferase ( $\gamma$ -GT) .....	63
2.4.3	Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) .....	64
2.4.4	Bilirubin .....	64
2.4.5	Gesamteiweiß .....	66
2.4.6	Cholesterin.....	67
2.4.7	Harnstoff .....	67
2.4.8	$\beta$ -Hydroxybuttersäure (BHBS).....	68
2.4.9	Freie Fettsäuren (NEFA) .....	69
2.4.10	Glukose.....	71
2.4.11	Natrium .....	71
2.4.12	Kalium.....	72
2.4.13	Kalzium .....	72
2.4.14	Anorganisches Phosphat .....	73
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>74</b>
<b>3.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>74</b>
<b>3.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>76</b>
3.2.1	Verhalten der Parameter unter verschiedenen Transportbedingungen.....	76
3.2.2	Vergleich verschiedener Blutentnahmesysteme .....	78
3.2.3	Untersuchungen zu den Freien Fettsäuren .....	79
3.2.4	Bestimmungsmethoden in den Versuchen .....	80
<b>3.3</b>	<b>Datenauswertung und Statistik.....</b>	<b>83</b>
3.3.1	Verhalten der Parameter unter verschiedenen Transportbedingungen.....	83
3.3.1.1	Relativer Verlauf über 48 Stunden .....	83
3.3.1.2	Variationskoeffizienten.....	84
3.3.1.3	Festlegung von Grenzwerten .....	84
3.3.1.4	Kumulative Kreuztabellen .....	88
3.3.1.5	Fehlerbalken-Diagramme.....	89
3.3.1.6	Statistisches Testverfahren.....	90
3.3.1.7	Zweifaktorielle Varianzanalyse.....	91
3.3.2	Vergleich verschiedener Blutentnahmesysteme .....	92
3.3.2.1	Entscheidung über das Bezugssystem .....	92
3.3.2.2	Vergleich der Blutentnahmesysteme.....	94
3.3.3	Untersuchungen zu den Freien Fettsäuren .....	95
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>96</b>
<b>4.1</b>	<b>Verhalten der Parameter unter verschiedenen Transportbedingungen.....</b>	<b>96</b>
4.1.1	Aspartat-Amino-Transferase (AST) .....	96
4.1.2	$\gamma$ -Glutamyl-Transferase ( $\gamma$ -GT) .....	99
4.1.3	Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) .....	101

4.1.4	Bilirubin .....	104
4.1.5	Harnstoff .....	106
4.1.6	Cholesterin .....	109
4.1.7	Gesamtprotein.....	111
4.1.8	Natrium .....	114
4.1.9	Kalium .....	116
4.1.10	Kalzium .....	118
4.1.11	Anorganisches Phosphat .....	120
4.1.12	Glukose.....	122
4.1.13	$\beta$ -Hydroxy-Buttersäure (BHBS) .....	128
4.1.14	Freie Fettsäuren (NEFA) .....	130
4.1.15	Vertretbare Transportdauer .....	135
4.1.16	Vergleich der Einflussfaktoren beim Transport .....	136
<b>4.2</b>	<b>Vergleich verschiedener Blutentnahmesysteme .....</b>	<b>137</b>
<b>4.3</b>	<b>Untersuchungen zu den Freien Fettsäuren (NEFA) .....</b>	<b>140</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>143</b>
<b>5.1</b>	<b>Verschiedene Blutentnahmesysteme .....</b>	<b>143</b>
5.1.1	Offene versus geschlossene Systeme .....	143
5.1.2	Vergleich von geschlossenen Systemen .....	143
5.1.3	NEFA-Gehalte in geschlossenen Systemen.....	145
5.1.4	Folgerung aus dem Vergleich verschiedener Blutentnahmesysteme.....	146
<b>5.2</b>	<b>Blutzusätze .....</b>	<b>146</b>
<b>5.3</b>	<b>Zentrifugation.....</b>	<b>147</b>
<b>5.4</b>	<b>Hämolyse .....</b>	<b>148</b>
<b>5.5</b>	<b>Verschiedene Transportbedingungen .....</b>	<b>150</b>
5.5.1	Variationskoeffizienten .....	150
5.5.2	Zentrifugation versus Temperatur.....	152
5.5.3	Stabilität der Parameter in unzentrifugierten Blutproben.....	153
5.5.4	Stabilität der Parameter in zentrifugierten Blutproben.....	165
<b>5.6</b>	<b>Schlussfolgerungen.....</b>	<b>171</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>173</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>174</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>175</b>
	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN.....</b>	<b>201</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>202</b>
	<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>203</b>

## VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abb. 2.1: Viersäftelehre.....	4
Abb. 2.2: Strukturierte Darstellung des Prozessweges einer Blutprobe .....	19
Abb. 2.3: Einflussgrößen auf die präanalytische Phase der Blutuntersuchung .....	22
Abb. 2.4: Variablen bei der Wahl des Blutentnahmesystems.....	24
Abb. 3.1: Ermittlung des Handling-Variationskoeffizienten .....	76
Abb. 3.2: Ermittlung des Analyse-Variationskoeffizienten.....	77
Abb. 3.3: Übersicht der entnommenen Blutproben bei jeder Kuh im Hauptversuch.....	78
Abb. 3.4: Versuchsaufbau zum Vergleich verschiedener Blutentnahmesysteme.....	79
Abb. 3.5: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Freien Fettsäuren .....	80
Abb. 3.6: Beispiel für die Darstellung der relativen Differenzen vom Ausgangswert .....	83
Abb. 3.7: Beispiel eines Fehlerbalken-Diagrammes .....	89
Abb. 3.8: Histogramme zur Ermittlung der Normalverteilung der Daten.....	91
Abb. 3.9: Differenzen der Blutentnahmesysteme zum individuellen Mittelwert .....	93
Abb. 4.1: Relative Differenz der AST vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Transportzuständen .....	97
Abb. 4.2: Mittelwerte der relativen Abweichungen der AST .....	98
Abb. 4.3: Relative Differenz der $\gamma$ -GT vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Transportzuständen .....	99
Abb. 4.4: Mittelwerte der relativen Abweichungen der $\gamma$ -GT .....	100
Abb. 4.5: Relative Differenz der GLDH vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Transportzuständen .....	102
Abb. 4.6: Mittelwerte der relativen Abweichungen der GLDH .....	103
Abb. 4.7: Relative Differenz des Bilirubins vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Transportzuständen .....	104
Abb. 4.8: Mittelwerte der relativen Abweichungen des Bilirubins .....	105
Abb. 4.9: Relative Differenz des Harnstoffs vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Transportzuständen .....	107
Abb. 4.10: Mittelwerte der relativen Abweichungen des Harnstoffs .....	108
Abb. 4.11: Relative Differenz des Cholesterins vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Transportzuständen .....	109
Abb. 4.12: Mittelwerte der relativen Abweichungen des Cholesterins.....	110
Abb. 4.13: Relative Differenz des Gesamtproteins vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Transportzuständen .....	112
Abb. 4.14: Mittelwerte der relativen Abweichungen des Gesamtproteins .....	113
Abb. 4.15: Relative Differenz des Natriums vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Transportzuständen .....	114
Abb. 4.16: Mittelwerte der relativen Abweichungen des Natriums .....	115

---

Abb. 4.17: Relative Differenz des Kaliums vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Transportzuständen .....	116
Abb. 4.18: Mittelwerte der relativen Abweichungen des Kaliums.....	117
Abb. 4.19: Relative Differenz des Kalziums vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Transportzuständen .....	118
Abb. 4.20: Mittelwerte der relativen Abweichungen des Kalziums .....	119
Abb. 4.21: Relative Differenz des anorganischen Phosphats vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Transportzuständen.....	120
Abb. 4.22: Mittelwerte der relativen Abweichungen des anorganischen Phosphats.....	121
Abb. 4.23: Relative Differenz der Glukose im Serum vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Transportzuständen.....	123
Abb. 4.24: Relative Differenz der Glukose im NaF-Plasma vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Transportzuständen.....	124
Abb. 4.25: Mittelwerte der relativen Glukoseabweichungen im Serum und NaF-Plasma ...	125
Abb. 4.26: Glukosegehalte im Serum und Plasma 2 Stunden nach der Blutentnahme .....	127
Abb. 4.27: Relative Differenz der BHBS vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Transportzuständen .....	128
Abb. 4.28: Mittelwerte der relativen Abweichungen der BHBS .....	129
Abb. 4.29: Relative Differenz der NEFAs vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Transportzuständen .....	131
Abb. 4.30: Absolute Differenz der NEFAs vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Transportzuständen .....	132
Abb. 4.31: Mittelwerte der absoluten Abweichungen der NEFAs .....	133
Abb. 4.32: Vergleich der Differenzen der Blutentnahmesysteme zum Bezugssystem .....	138
Abb. 4.33: Relative Differenz der NEFAs vom Ausgangswert.....	140
Abb. 4.34: Vergleich der NEFA-Differenzen im Serum der Vacutainer® zur Monovette® ....	141

## VERZEICHNIS DER TABELLEN

Tab. 2.1:	Wichtige Stoffwechselkreise und die korrespondierenden Bestands- erkrankungen bei Milchkühen. ....	10
Tab. 2.2:	Derzeit gebräuchliche Zusätze in Röhrchen zur Blutentnahme und deren Indikation. ....	27
Tab. 2.3:	Übersicht über die möglichen Hämolyse verursachenden Einflüsse <i>in vitro</i> . ....	30
Tab. 2.4:	Literaturangaben zur Stabilität der AST in Blutproben. ....	33
Tab. 2.5:	Literaturangaben zur Stabilität der $\gamma$ -GT in Blutproben. ....	35
Tab. 2.6:	Literaturangaben zur Stabilität der GLDH in Blutproben. ....	37
Tab. 2.7:	Literaturangaben zur Stabilität von Bilirubin in Blutproben. ....	38
Tab. 2.8:	Literaturangaben zur Stabilität des Serum-Proteins in Blutproben. ....	40
Tab. 2.9:	Literaturangaben zur Stabilität von Cholesterin in Blutproben. ....	44
Tab. 2.10:	Literaturangaben zur Stabilität von Harnstoff in Blutproben. ....	46
Tab. 2.11:	Literaturangaben zur Stabilität der BHBS in Blutproben. ....	47
Tab. 2.12:	Literaturangaben zur Stabilität der NEFAs in Blutproben. ....	49
Tab. 2.13:	Literaturangaben zur Stabilität der Glukose in Blutproben. ....	51
Tab. 2.14:	Literaturangaben zur Stabilität von Natrium in Blutproben. ....	54
Tab. 2.15:	Literaturangaben zur Stabilität von Kalium in Blutproben. ....	56
Tab. 2.16:	Literaturangaben zur Stabilität von Kalzium in Blutproben. ....	58
Tab. 2.17:	Literaturangaben zur Stabilität von anorganischem Phosphat in Blutproben. ....	61
Tab. 3.1:	Material zur Untersuchung des Verhaltens der Parameter unter verschiedenen Transportbedingungen. ....	75
Tab. 3.2:	Material zum Vergleich verschiedener Blutentnahmesysteme. ....	75
Tab. 3.3:	Material zur Untersuchung der Freien Fettsäuren. ....	75
Tab. 3.5:	Variationskoeffizienten und festgelegte Grenzwerte. ....	86
Tab. 3.6:	Vergleich der Angaben aus der Richtlinie der Bundesärztekammer (RiliBÄK) mit den festgelegten Grenzwerten. ....	87
Tab. 3.7:	Beispiel einer kumulativen Kreuztabelle. ....	88
Tab. 3.8:	Übersicht über die Streuung um den individuellen Mittelwert und den Median. ...	94
Tab. 4.1:	Kumulative Kreuztabelle der AST. ....	98
Tab. 4.2:	Kumulative Kreuztabelle der $\gamma$ -GT. ....	101
Tab. 4.3:	Kumulative Kreuztabelle der GLDH. ....	103
Tab. 4.4:	Kumulative Kreuztabelle von Bilirubin. ....	106
Tab. 4.5:	Kumulative Kreuztabelle von Harnstoff. ....	108
Tab. 4.6:	Kumulative Kreuztabelle des Cholesterins. ....	111
Tab. 4.7:	Kumulative Kreuztabelle des Gesamtproteins. ....	113
Tab. 4.8:	Kumulative Kreuztabelle von Natrium. ....	115
Tab. 4.9:	Kumulative Kreuztabelle von Kalium. ....	117
Tab. 4.10:	Kumulative Kreuztabelle von Kalzium. ....	119

Tab. 4.11: Kumulative Kreuztabelle des anorganischen Phosphats. ....	122
Tab. 4.12: Kumulative Kreuztabelle der Glukose im Serum. ....	126
Tab. 4.13: Kumulative Kreuztabelle der Glukose im NaF-Plasma. ....	126
Tab. 4.14: Vergleich der Glukose-Ausgangswerte. ....	127
Tab. 4.15: Kumulative Kreuztabelle der BHBS. ....	130
Tab. 4.16: Kumulative Kreuztabelle der NEFAs. ....	134
Tab. 4.17: Übersicht über die vertretbare Transportdauer. ....	135
Tab. 4.18: Variationskoeffizienten der verschiedenen Einflussfaktoren. ....	136
Tab. 4.19: Mittlere Differenzen zum Bezugssystem und deren Signifikanzniveau. ....	137
Tab. 4.20: Übersicht über minimale und maximale Differenzen zum Bezugssystem. ....	139
Tab. 4.21: Signifikanzniveau der Mittelwerte der NEFA-Differenzen zur Monovette®. ....	142
Tab. 4.22: Vergleich der NEFA-Werte in Vacutainern® mit und ohne Trenngel. ....	142

## VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

%	Prozent
<	kleiner / weniger als
®	amtlich registriertes Warenzeichen
™	trademark (Warenzeichen im Geschäftsverkehr)
°C	Grad Celsius
γ-GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
μkat	Mikrokatal
μl	Mikroliter
μmol	Mikromol
Abb.	Abbildung
AST	Aspartat-Aminotransferase
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BHBS	β-Hydroxybuttersäure
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa („ungefähr“)
d	Tag(e)
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
d.h.	das heißt
dl	Deziliter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EN	Europäische Norm
et al.	et alii/aliae/alia („und andere“)
EU	Europäische Union
<i>ex vivo</i>	Untersuchungen, die mit lebenden Zellen in einer künstlichen Umgebung außerhalb eines lebenden Organismus durchgeführt werden
g	Erdbeschleunigung ( $g = 9,81\text{m/s}^2$ )
g	Gramm
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
h	Stunde(n)
Hb	Hämoglobin
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry
<i>in vitro</i>	Prozesse, die außerhalb lebender Organismen stattfinden
<i>in vivo</i>	Prozesse, die im lebendigen Organismus ablaufen
ISE	ionenselektive Elektrode
ISO	International Organization for Standardization („Internationale Organisation für Normung“)
Jh.	Jahrhundert
k.A.	keine Angaben

KOx	Kaliumoxalat
KT	Kühlschranktemperatur (~4°C)
l	Liter
Max	Maximum
mg	Milligramm
Min	Minimum
min.	Mindestens
ml	Milliliter
mmol	Millimol
n	Stichprobenzahl
n. Chr.	nach Christus
n.u.	nicht untersucht
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaF	Natriumfluorid
NEFA	non-esterified fatty acids („Freie Fettsäuren“)
nkat	Nanokatal
nm	Nanometer
p	Signifikanzniveau
PET	Polyethylenterephthalat
PP	Polypropylen
RiliBÄK	Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen
RT	Raumtemperatur (~20°C)
s	Standardabweichung
S.	Seite
SST	serum separator tube („Vacutainer <sup>®</sup> mit Trenngel“)
Tab.	Tabelle
U	Unit („Einheit“)
u.a.	unter anderem
V.	Vena („Vene“)
v. Chr.	vor Christus
VK	Variationskoeffizient
vgl.	Vergleiche
$\bar{x}$	arithmetischer Mittelwert
Z	Zentrifugiert
z.B.	zum Beispiel