

5 DISKUSSION

Faktoren, die die Präanalytik beeinflussen, umfassen unter anderem die Wahl des Blutentnahmesystems, die Verwendung von Röhrcchen mit Zusätzen und den Transport der Proben zum Labor (siehe Abb. 2.3). Eine Potentierung der Fehler z.B. durch falsche Röhrcchenwahl, mangelnde Quantität der Probe, zu lange Transportdauer und fehlerhafte Dokumentation erscheint möglich (siehe Kapitel 2.3.2). Im Folgenden soll der Einfluss verschiedener Blutentnahmesysteme, Blutzusätze und Transportbedingungen auf die Stabilität klinisch chemischer Parameter im Rinderblut diskutiert werden. Zusätzlich wird auf die Probleme beim Zentrifugieren der Proben und einer eintretenden Hämolyse eingegangen.

5.1 Verschiedene Blutentnahmesysteme

Bei der Untersuchung zum Einfluss verschiedener Blutentnahmesysteme auf ausgewählte Parameter der klinischen Chemie (siehe Kapitel 4.2 und 4.3) wurden bei mehreren Parametern signifikante Unterschiede zwischen den Messergebnissen der verschiedenen Systeme ermittelt. Es wurden offene und geschlossene Systeme, Röhrcchen mit und ohne Vakuum und Röhrcchen mit und ohne Trenngel untersucht.

5.1.1 Offene versus geschlossene Systeme

In dieser Studie wurde beim Vergleich von offenen und geschlossenen Serum-Monovetten[®] bei keinem der untersuchten Parameter ein signifikanter Unterschied im Serumgehalt nachgewiesen (siehe Abb. 4.32). Vergleichende Untersuchungen von offenen und geschlossenen Blutentnahmesystemen sind bisher nicht durchgeführt worden.

5.1.2 Vergleich von geschlossenen Systemen

Innerhalb der geschlossenen Systeme wurden von ausgewählten Parametern der klinischen Chemie die Serumgehalte aus Vacutainern[®] mit und ohne Trenngel mit den Konzentrationen im Serum aus Monovetten[®] verglichen.

Vergleich von Monovetten[®] und Vacutainern[®] ohne Trenngel:

Nur bei der Bestimmung des anorganischen Phosphats wurde ein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen. Dieser war jedoch klinisch nicht so bedeutsam, dass er zu einer fehlerhaften Interpretation des Laborbefundes hätte führen können (siehe Tabellen 4.19 und 4.20). Als klinisch bedeutsam werden die ermittelten Differenzen der Parameter AST, BHBS und Kalium bewertet (siehe Abb. 4.32 und Tab. 4.20). Diese waren jedoch statistisch nicht signifikant.

Vergleich von Monovetten[®] und Vacutainern[®] mit Trenngel:

Für die Parameter AST, BHBS, NEFA, Natrium und anorganisches Phosphat zeigten sich statistisch signifikante Differenzen (siehe Tab. 4.19). Diese Abweichungen waren jedoch nur für die Parameter BHBS und anorganisches Phosphat klinisch bedeutsam, da die anderen Differenzen zu gering waren, um zu einer fehlerhaften Interpretation des Laborbefundes zu führen (siehe Tab. 4.20). Die mittlere Differenz der Kaliumgehalte dieser beiden Systeme von -0,55 bis 0,79 mmol/l war statistisch nicht signifikant, wird jedoch bei einem Referenzbereich von 3,5 - 4,5 mmol/l als klinisch bedeutsam bewertet (siehe Abb. 4.32 und Tab. 4.20).

Die zum Teil signifikanten Unterschiede zwischen den Analyseresultaten aus Monovetten[®] und Vacutainern[®] können durch das unterschiedliche Material der Systeme bedingt sein. Die Monovetten[®] bestehen aus Polypropylen (PP) und beinhalten Polystyrol-Granulat, das mit Kaolin als Gerinnungsaktivator beschichtet ist¹. Die Vacutainer[®] werden aus glasklarem Polyethylenterephthalat (PET) gefertigt, auf deren Innenwand Silikapartikel als Gerinnungsaktivator aufgesprüht sind. Als Trenngel wird in den Vacutainern[®] inertes Polyestergerel verwendet (BECTON DICKINSON, 2005). Aus der Lebensmittelindustrie ist bekannt, dass PET mit der Zeit Acetaldehyd abgibt (BFR, 2007). Übertragen liegt daher die Vermutung nahe, dass es durch bestimmte Enzyme des Blutes oder Umweltbedingungen (z.B. heißer Sommer und Alter der Röhrchen) zu Loslösungen von Bestandteilen des Kunststoffes aus Wandmaterial, Beschichtung, Trenngel oder Granulat der Röhrchen kommt, was zu Konzentrationsänderungen der Parameter im Serum führen kann. Möglicherweise gehen einige Stoffe wie z.B. Elektrolyte durch ihre Ladungen Bindungen mit dem Wandmaterial, dem Trenngel oder losgelösten Kunststoffanteilen wie z.B. Acetaldehyd ein und so der Analyse verloren.

Die Ursache für die Variationen der Parameterkonzentrationen im Serum unterschiedlicher Blutentnahmesysteme kann jedoch auch in der Methode der Blutentnahme liegen, da das Blut bei einigen Kühen durch einen höheren Druckunterschied zwischen Blutgefäß und dem verwendeten Blutentnahmesystem in die Röhrchen einspritzte. Zusätzlich versiegte bei einigen Kühen der Blutstrom während der Entnahme auf Grund von Abwehrbewegungen der Kuh und dem Unvermögen, das Blutentnahmesystem dabei an Ort und Stelle zu halten, so dass Neueinstiche in die Schwanzgefäße nötig waren. Auf diese Weise kann es sowohl lokal in der Vene als auch im Röhrchen zu Membranschädigungen der Blutzellen und Hämolysen gekommen sein, die Verschiebungen in der Zusammensetzung des Serums verursachten. Hämolysen konnten in den Blutproben nach der Entnahme jedoch nicht beobachtet werden. Da diese allerdings erst ab einer Konzentration von 200 mg/l Hämoglobin (KROLL und ELIN, 1994; HAGEMANN, 2005; YOUNG et al., 2006) bzw. 300 mg/l (GUDER, 1986; GUDER et al., 2002; LIPPI et al., 2006a) in Blutproben mit dem bloßen Auge erkennbar werden, können leichte Hämolysen unerkannt geblieben sein.

¹ Persönliche Mitteilung von W. Brand, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, 2008.

Die ermittelten Differenzen zwischen den untersuchten Blutentnahmesystemen können möglicherweise auch durch unterschiedlich lange Gerinnungszeiten der Proben bis zu ihrer Zentrifugation verursacht worden sein. Für diesen Versuch wurden an jedem Untersuchungstag von drei bis fünf Kühen hintereinander die Blutproben entnommen. Da für jedes Probenröhrchen mindestens 30 Minuten Gerinnungszeit vor der Zentrifugation eingeräumt wurde und alle Proben gleichzeitig zentrifugiert wurden, standen die Proben der ersten Kuh vergleichsweise länger bis zur Zentrifugation. Bei angenommener Schädigung der Blutzellen durch die Entnahmen hätte es dann bis zur Zentrifugation zu einem verstärkten Austausch zwischen Zytosol und Blutplasma kommen können.

Untersuchungen zum Vergleich von Monovetten[®] mit Vacutainern[®] oder anderen Blutentnahmesystemen sind bisher nur in geringem Umfang durchgeführt worden. So empfehlen O'KEANE und CUNNINGHAM (2006) Serum-Röhrchen mit Gel für die Blutentnahme, da bei diesen im Vergleich zu Röhrchen ohne Gel das Umfüllen des Serums unnötig ist und das damit verbundene Risiko einer möglichen Kontamination der Probe oder des Untersuchers minimiert wird. Auch in der vorliegenden Studie konnte festgestellt werden, dass es bei der Verwendung von Röhrchen mit Trenngel zu einem geringeren Material- und Zeitaufwand bei der Verarbeitung der Proben kommt, da das Serum auf dem Trenngel stehen bleiben kann und keine weiteren Röhrchen zur Verwahrung bzw. Versendung des Serums benötigt werden.

5.1.3 NEFA-Gehalte in geschlossenen Systemen

Bei den Untersuchungen zu den Freien Fettsäuren (siehe Kapitel 4.3) konnte nachgewiesen werden, dass die NEFA-Gehalte aus Vacutainern[®] zu jedem Untersuchungszeitpunkt bei über 50% der analysierten Proben unabhängig vom Vorhandensein eines Trenngels niedriger lagen als im korrespondierenden Serum aus Monovetten[®] (siehe Abb. 4.34). Die mittleren Differenzen waren hier zu fast allen Zeitpunkten mit $p \leq 0,05$ statistisch signifikant (siehe Tab. 4.21). Bei einer mittleren Differenz von 0,05 - 0,08 mmol/l und einem Referenzbereich von $< 0,5$ mmol/l ergab sich jedoch keine klinische Bedeutsamkeit, da die Möglichkeit einer Fehlinterpretation des Laborbefundes nicht gegeben war. Diese geringfügige Differenz kann dadurch verursacht sein, dass Vacutainer[®] und Monovetten[®] aus verschiedenen Materialien gefertigt sind. Möglicherweise kommt es durch das Granulat in den Monovetten[®] zur Loslösung von Freien Fettsäuren oder Blutfetten, was die geringfügig höheren NEFA-Werte im Serum aus Monovetten[®] verglichen mit den Daten aus Vacutainern[®] zur Folge hat. Andererseits wäre eine mögliche Verdünnung des Serums in Vacutainern[®] durch die Loslösung von Kunststoffanteilen wie z.B. Acetaldehyd aus dem Wandmaterial und eine damit falsch-niedrige Analyse der NEFA-Gehalte denkbar. Zu diesen Theorien gibt es jedoch bisher keine Untersuchungen.

In der vorliegenden Studie wurden keine generell höheren Konzentrationen im Serum aus Vacutainern[®] mit Trenngel im Vergleich zu Vacutainern[®] ohne Trenngel ermittelt. Wie Abbil-

dung 4.34 zeigt, liegen die Boxplots der beiden Vacutainer[®] zu jedem Analysezeitpunkt eng beieinander. Die statistische Prüfung dieses graphischen Eindrucks zeigte geringfügig höhere Gehalte in Vacutainern[®] mit Trenngel im Bereich von 0,01 bis 0,02 mmol/l im Vergleich zu Vacutainern[®] ohne Trenngel (siehe Tab. 4.22). Diese Differenzen waren jedoch alle statistisch nicht signifikant. Auch in der Studie von STOKOL und NYDAM (2005) lagen die NEFA-Gehalte in Vacutainern[®] mit Trenngel höher als in Vacutainern[®] ohne Trenngel. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie waren die Differenzen jedoch signifikant.

5.1.4 Folgerung aus dem Vergleich verschiedener Blutentnahmesysteme

Durch den Vergleich verschiedener Blutentnahmesysteme ergibt sich die Empfehlung, Referenzbereiche immer im Zusammenhang mit dem verwendeten Blutentnahmesystem anzugeben. Des Weiteren sollten für jedes Blutentnahmesystem eigene Referenzbereiche etabliert werden. YUCEL et al. (2007) empfehlen auf Grund der möglichen Effekte durch das verwendete Material, alle Blutproben mit demselben Blutentnahmesystem zu gewinnen, um damit fehlerfreie Analysen zu ermöglichen.

5.2 Blutzusätze

Der Einfluss verschiedener Blutzusätze auf Parameter der klinischen Chemie wurde in dieser Studie nur bezüglich der Verwendung von NaF/KOx-Röhrchen zur Glukose-Bestimmung näher untersucht. Eine Untersuchung verschiedener Blutentnahmesysteme mit NaF-Zusätzen wurde nicht durchgeführt, da die Verwendung von Vacutainern[®] als sinnvoll erachtet wurde. So kann mit Vacutainern[®] eine standardisierte Blutmenge gewonnen werden, wodurch ein korrektes Mischungsverhältnis mit dem Röhrchenzusatz möglich ist (BANFI, 1995). Bei der Blutentnahme mit Systemen ohne Vakuum wird diese manuell beendet, wodurch die Blutmenge in den Röhrchen variiert.

Beim Vergleich der Glukose-Ausgangswerte im Serum und NaF-Plasma zeigte sich, dass die Gehalte im NaF-Plasma meist niedriger waren als im Serum (siehe Abb. 4.26). Es handelte sich dabei um eine mittlere Differenz von 0,202 mmol/l, die statistisch signifikant war (siehe Tab. 4.14) und bei einem Referenzbereich von 2,21 - 3,61 mmol/l auch als klinisch bedeutsam bewertet wurde. Eine ähnliche Differenz der Glukosegehalte zum Serum konnten mit 0,23 mmol/l von WARING et al. (2007) im humanen NaF-Plasma ermittelt werden. Auch in anderen Studien konnten systematisch niedrigere Werte in Blutproben mit dem Zusatz von NaF nachgewiesen werden (CUSTER et al., 1983; FERRANTE und KRONFELD, 1994; CHRISTOPHER und O'NEILL, 2000). Natrium-Fluorid und Kalium-Oxalat, welches zusätzlich als Antikoagulant in den Röhrchen enthalten war, beeinflussen die Integrität der Zellmembranen (CASTELLINI et al., 1992; FERRANTE und KRONFELD, 1994; CHRISTOPHER und O'NEILL, 2000). Dadurch kommt es auf Grund von osmotischen Effekten zu Wasserverschiebungen aus den Blutzellen ins Plasma, wodurch Makromoleküle wie Glukose im Plasma verdünnt werden

(CASTELLINI et al., 1992; AUFENANGER und ZAWTA, 1999). Auf diese Art und Weise kommt es zu artifiziell geringeren Konzentration der Glukose im NaF-Plasma. Im Gegensatz dazu ermittelten MORRIS et al. (2002) im NaF-Plasma von Schafen höhere Glukosewerte als im Serum. Dieses differierende Ergebnis könnte mit einer erhöhten Gerinnungszeit der Vollblutproben bis zur Abzentrifugation zusammenhängen, während der es zu einem fortschreitenden Glukose-Verbrauch durch die Blutzellen kam.

THORESEN et al. (1992) konnten für verschiedene Parameter signifikante Unterschiede im Serum und Heparin-Plasma feststellen. So ist z.B. Kalium in höheren Konzentrationen in Erythrozyten und Thrombozyten als im Plasma vorhanden. Bei der Blutgerinnung tritt es aus den Thrombozyten aus, wodurch eine höhere Konzentration im Serum als im Plasma resultiert (KRAFT und DÜRR, 2005d). Da die etablierten Referenzwerte meist auf Serumanalysen beruhen (THORESEN et al., 1992), erklärten GELFERT und STAUFENBIEL (1998), dass zur Blutentnahme für die klinische Chemie nur Serumproben zur Standardisierung der Methodik und zur Gewährleistung einer guten Vergleichbarkeit genutzt werden sollten. Des Weiteren würden Gerinnungshemmer durch abweichende Parameterkonzentrationen eine Gefahr der diagnostischen Fehlinterpretation in sich bergen.

Ähnlich legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass für Glukose im Serum und Plasma eigenständige Referenzbereiche festgelegt werden sollten, um eine diagnostisch verwertbare Aussage zu erhalten.

5.3 Zentrifugation

Die Zentrifugation wird zur Plasma- und Serumgewinnung genutzt, um die Absinkgeschwindigkeit und die Ausbeute zu erhöhen (HAGEMANN, 2005). Gegebenenfalls vorhandene Trenngele gelangen bei der Zentrifugation auf Grund ihrer Dichte zwischen Serum und korpuskuläre Bestandteile des Blutes, so dass der Einsatz als Primärgefäß in der Analytik ermöglicht wird (KRAFT und DÜRR, 2005d).

Bei der Entwicklung der Methodik zur vorliegenden Studie stellte sich heraus, dass in der Veterinärmedizin bisher keine Vorgaben zur Art und Weise der Zentrifugation von Blutproben festgelegt wurden. Während für die Humanmedizin vom NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) eine Zentrifugation von Vollblutproben bei 1000-1200 x g über 10 ± 5 Minuten empfohlen wird (BERMES et al., 2006), können für die Veterinärmedizin unterschiedliche Angaben gefunden werden. KRAFT und DÜRR (2005d) empfehlen eine Zentrifugation mit einer Drehzahl von 3000 Umdrehungen / Minute über 5 – 10 Minuten. Dies ist jedoch ohne Angabe des Zentrifugenradius' keine standardisierbare Vorgabe. So ergeben sich aus der Drehzahl abhängig vom Radius der Zentrifuge variierende Zentrifugalbeschleunigungen, während die direkte Festlegung der Zentrifugalbeschleunigung als ein Vielfaches der Erdbeschleunigung g ohne Angabe des Zentrifugenradius' wie vom NCCLS eine für

Laboratorien standardisierbare Angabe darstellt. Dies wird gefolgert aus der Formel

$$a = r \times \omega^2,$$

wobei a für die Zentrifugalbeschleunigung, r für den Radius der Zentrifuge und ω für die Winkelgeschwindigkeit steht, die sich wiederum aus der Drehzahl [Umdrehung / Minute] berechnen lässt. Durch Substitution ergibt sich dann folgende Beziehung zwischen Zentrifugalbeschleunigung a und Drehzahl rpm (LOTTSPREICH und ENGELS, 2006):

$$a = 1,118 \times 10^{-5} \times r \times (rpm)^2.$$

Aus dieser Tatsache heraus hat sich die Erkenntnis ergeben, dass die bisher durchgeführten Untersuchungen zur Thematik der Parameterstabilität bei der Lagerung von Blutproben nur eingeschränkt vergleichbar sind, da keine einheitliche Zentrifugation der Blutproben vor der Analyse stattfand. Meist erfolgten keine oder nur unzureichende Angaben zur Zentrifugationsmethodik der Studien. Variierende Umdrehungszahlen und Dauern bei der Zentrifugation können jedoch einen Einfluss auf die Integrität der Blutzellen und damit auf die Konzentration einiger Blutparameter haben (LIPPI et al., 2006b).

In wenigen Untersuchungen zu Rinderblut konnten Angaben zur Zentrifugationsmethodik gefunden werden. Dabei variierten die Drehzahlen von 2000 – 3000 Umdrehungen / Minute (FREITAG, 1964; TOLLERSRUD, 1969; KELLER, 1971; VON BENTEN, 1972; KLOENE, 1974) und die Zentrifugalbeschleunigungen von 2000 – 3000 x g (JONES, 1985; STOKOL und NYDAM, 2005). Studienübergreifend wurde über 10 – 30 Minuten (FREITAG, 1964; HAGEMEISTER und UNSHELM, 1968; TOLLERSRUD, 1969; KELLER, 1971; KLOENE, 1974; JONES, 1985; STOKOL und NYDAM, 2005) oder „so lange bis klares Serum entsteht“ (VON BENTEN, 1972) zentrifugiert. Nur selten wurde wie bei KELLER (1971), JONES (1985) und STOKOL und NYDAM (2005) eine Angabe zur Temperatur während der Zentrifugation getätigt.

Auf Grund der fehlenden standardisierten Vorgaben wurde in der vorliegenden Studie aus der klinischen Erfahrung mit Trenngel-Röhrchen heraus und anlehnend an die Studie von STOKOL und NYDAM (2005), die in ihren Untersuchungen dieselben Röhrchen verwendeten, eine Zentrifugation der Proben bei 3000 x g über 15 Minuten bei 4°C durchgeführt. Dies entsprach bei der verwendeten Zentrifuge ca. 4000 Umdrehungen / Minute. Die im Vergleich zur Humanmedizin nötige höhere Zentrifugalbeschleunigung ergibt sich aus dem viskösen Blut der Rinder mit einem fast doppelt so hohem Fibrinogengehalt (MESSOW, 1959).

5.4 Hämolyse

Eine Hämolyse wird mit der Zerstörung der Zellmembran der roten Blutkörperchen und der daraus resultierenden Abgabe von erythrozytären Inhaltsstoffen ins Plasma definiert (HEINS et al., 1995; STANKOVIC und SMITH, 2004; YOUNG et al., 2006). Sie 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 oder zu lange Stauung des Gefäßes verursacht werden. *In vitro* kann sie durch

viele verschiedene Einflüsse entstehen, wie z.B. starkes Schütteln der Probe, hochtouriges oder langdauerndes Zentrifugieren und zu lange Lagerung als Vollblut (siehe Kapitel 2.3.4). Bei den beiden erstgenannten Ursachen handelt es sich um eine direkte mechanische Schädigung der Zellen. Im Gegensatz dazu kommt es bei der andauernden Lagerung von Vollblutproben zu einer Dysfunktion des Zellstoffwechsels durch den Verbrauch an Metaboliten wie Glukose, wodurch es zu einer erhöhten Zellpermeabilität und der Aufhebung der Membranstabilität und schließlich zur Zelllyse kommt (ZHANG et al., 1998; BOYANTON und BLICK, 2002). Der Grad der Zelllyse ist daher indirekt vom Glukosegehalt der Blutprobe abhängig, da bei erhöhter Glukosekonzentration der Zellstoffwechsel später sistiert und die Zelllyse damit später einsetzt als bei niedrigen Glukosekonzentrationen (SACKS, 2006).

Eine Hämolyse kann die Analytik durch die Freisetzung von intrazellulären Bestandteilen in den Extrazellularraum und eine Beeinträchtigung der analytischen Methode stören (SONNTAG, 1986; GUDER et al., 2002).

Veränderung der Zusammensetzung des Serums bzw. Plasmas:

Bei der Hämolyse werden Zellinhaltsstoffe freigesetzt, wodurch die Stoffe, die in den Blutzellen niedriger konzentriert sind, verdünnt werden. Die Konzentration der Parameter, die in den Blutzellen in höheren Konzentrationen als im Plasma vorhanden sind, steigt hingegen im hämolytischen Serum an (SONNTAG, 1986; KROLL und ELIN, 1994; GRAFMEYER et al., 1995; HEINS et al., 1995; GUDER et al., 2002; LIPPI et al., 2006a; LIPPI et al., 2006b; YOUNG et al., 2006).

Analytische Interferenzen:

Eine Hämolyse kann auch analytische Interferenzen erzeugen (LIPPI et al., 2006a; YOUNG et al., 2006). Es sind sowohl optische als auch chemische Interferenzen möglich (GUDER, 1986). Die Stärke der optischen bzw. chemischen Interferenz hängt dabei individuell von der Methode (Wellenlänge, Nutzung von Leerproben, Reagenzien) und dem Instrumentarium ab (GUDER, 1986; KROLL und ELIN, 1994; GRAFMEYER et al., 1995; HEINS et al., 1995).

Photometrische Methoden können durch Extinktionsabweichungen gestört werden (SONNTAG, 1986; HEINS et al., 1995; CARRARO et al., 2000; GUDER et al., 2002; DÜRR und KRAFT, 2005; LIPPI et al., 2006a). Hämoglobin beginnt mit der Absorption von Licht bei einer Wellenlänge um 340 nm und stört damit Methoden, die mit der Bestimmung der Absorption von NADH oder NADPH arbeiten (KROLL und ELIN, 1994). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Hämoglobin einen starken Absorptionspeak bei 415 nm und zwei weitere kleinere Peaks bei 530 nm und 600 nm aufweist, was zu einer Interferenz bei Untersuchungen mit Wellenlängen in diesen Bereichen (z.B. bei Bilirubin und Protein) führen kann (GRAFMEYER et al., 1995).

Zusätzlich zu den optischen Interferenzen kann Hämoglobin durch seine oxidativen Fähigkeiten chemische und biochemische Reaktionen stören (GUDER, 1986; SONNTAG, 1986). Die Pseudoperoxidaseaktivität des freien Hämoglobins ist verantwortlich für die Störung der Bilirubinbestimmung durch Hemmung der Diazofarbstoffbildung (GUDER et al., 2002). Auch können aus den Zellen freigesetzte Stoffe direkt oder indirekt die Messung der gewünschten Komponente stören (GUDER et al., 2002). So steigt z.B. die Kreatinkinase-Aktivität im Serum durch die aus den Erythrozyten freigesetzte Adenylatkinase an (GUDER, 1986).

In der vorliegenden Studie wurde in keiner Probe mit dem bloßen Auge eine Hämolyse deutlich. Unerkannt konnten jedoch leichte Hämolysen vorliegen, da diese erst ab einer Konzentration von 200 mg/l Hämoglobin (KROLL und ELIN, 1994; HAGEMANN, 2005; YOUNG et al., 2006) bzw. 300 mg/l (GUDER, 1986; GUDER et al., 2002; LIPPI et al., 2006a) mit dem bloßen Auge erkennbar werden.

5.5 Verschiedene Transportbedingungen

Zur Untersuchung des Effektes verschiedener Transportzustände auf ausgewählte Parameter der klinischen Chemie wurden die Blutproben vor dem Transport zum Labor zentrifugiert oder nicht zentrifugiert. Der Transport erfolgte bei Raum- oder Kühlschranktemperatur und die Analyse wurde zu sieben Zeitpunkten innerhalb von 48 Stunden durchgeführt (siehe Kapitel 4.1). Um den reinen Einfluss der Transportbedingungen untersuchen zu können, wurden zusätzlich die Variationskoeffizienten, die durch den Umgang mit den Proben von der Entnahme bis zur Analyse (Handling-VK) und durch die Analyse an sich (Analyse-VK) erzeugt werden, bestimmt.

Es zeigte sich, dass im Vollblut nur die Natriumgehalte über 48 Stunden hinweg stabil blieben. In den zentrifugierten Proben, die bei Raumtemperatur transportiert wurden, blieben auch die Parameter Aspartat-Amino-Transferase (AST), γ -Glutamyl-Transferase (γ -GT), Cholesterin, Gesamteiweiß, Kalium, Kalzium, anorganisches Phosphat und Freie Fettsäuren (NEFA) stabil. Zusätzlich verhielten sich in den zentrifugierten Proben, die bei Kühlschranktemperatur transportiert wurden, auch die Glukose im Serum und NaF/KOx-Plasma über 48 Stunden hinweg stabil (siehe Tab. 4.17).

5.5.1 Variationskoeffizienten

Die Ermittlung von Variationskoeffizienten (VK) weist auf die Zuverlässigkeit bzw. Glaubwürdigkeit von Analyseresultaten hin und deren Angabe wird der angestrebten Qualitätsforderung gerecht (COSKUN, 2005). Es handelt sich dabei um die Standardisierung von Standardabweichungen, wodurch ein Vergleich der Variabilität von Testverfahren unabhängig von der Größenordnung der Analytenkonzentration möglich wird (REED et al., 2002). Der VK ist di-

mensionslos und wird in Prozent wiedergegeben (COSKUN, 2005). In der vorliegenden Studie wurden die Variationskoeffizienten, die durch den Umgang mit den Blutproben von der Entnahme bis zur Analyse (Handling-VK) und durch die Analyse mit den jeweiligen Reagenzienchargen (Analyse-VK) erzeugt werden, bestimmt.

Handling-Variationskoeffizienten:

Die Handling-VKs waren für die meisten Parameter mit 0 bis 3,26% sehr gering (siehe Tab. 3.5). Diese gute Präzision weist auf einen geringen Einfluss durch den Umgang mit den Blutproben von der Entnahme bis zur Analyse hin. Das bedeutet, dass Blutproben, die unter denselben Bedingungen entnommen und transportiert werden, in ihren Analyseresultaten nur gering streuen. Lediglich die Freien Fettsäuren (NEFA) und die β -Hydroxybuttersäure (BHBS) zeigten eine höhere Variation.

Die handlingbedingte Variation der NEFAs von 5,28% (siehe Tab. 3.5) hatte auf die Auswertung der Daten keinen Einfluss. Dieser erhöhte Wert ergab sich mathematisch bedingt, da bei sehr niedrigen Werten schon geringe Abweichungen große prozentuale Differenzen erzeugen. So wurde dieser VK mit den Proben von einer Kuh bestimmt, die einen mittleren NEFA-Gehalt von 0,60 mmol/l aufwies (Referenzbereich: < 0,50 mmol/l). Es handelte sich also bei einem VK von 5,28% um eine Schwankung der Werte von $\pm 0,03$ mmol/l, die vernachlässigbar gering ist.

Der Handling-VK der BHBS von 15,74% (siehe Tab. 3.5) war methodisch bedingt. Für die Ermittlung der Variationskoeffizienten musste eine große Menge an Blutproben von einer Kuh gewonnen werden (siehe Kapitel 3.2.1). Über die ganze Dauer der Blutentnahme wurde die Drosselvene mit einer Staukette angestaut. Durch einen ansteigenden intravaskulären Druck kommt es zu einer vermehrten Abfiltration von Plasma in den interstitiellen Raum, wodurch es zu einer Aufkonzentration hochmolekularer Bestandteile des Blutes kommt (JUNGE et al., 1978; GUDER et al., 1996; LIPPI et al., 2006b). Dies wurde in diesem Versuch durch stetig ansteigende BHBS-Gehalte mit der Zahl der Blutproben deutlich. Daher wurde dieser Variationskoeffizient bei der Auswertung der Daten nicht berücksichtigt.

Analyse-Variationskoeffizienten:

Die Analyse-VKs lagen in dieser Studie bis auf die Parameter Bilirubin und Harnstoff zwischen 0 und 2,03% (siehe Tab. 3.5). Da es sich bei den VKs um ein Maß der Präzision handelt (REED et al., 2002), kann hier auf einen äußerst geringen Einfluss der Analyse auf die Höhe der Messwerte geschlossen werden.

Die analysebedingte Variation von Bilirubin von 7,22% (siehe Tab. 3.5) hatte auf die Auswertung der Daten nur einen geringen Einfluss, da der Grenzwert für die maximale Abweichung vom Ausgangswert, der auch nach klinischen Gesichtspunkten festgelegt wurde, im Vergleich höher lag. Trotzdem wird dies bei der nachfolgenden Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt (siehe Kapitel 5.5.3 und 5.5.4).

Der Analyse-VK von Harnstoff von 7,31% (siehe Tab. 3.5) ist hingegen als kritisch zu sehen, da bereits eine Abweichung von 8% als klinisch relevant angesehen und somit als Grenzwert für die maximal vertretbare Abweichung vom Ausgangswert festgelegt wurde. Daher konnte bei der Lagerung der Blutproben nicht festgestellt werden, ob die Variation allein auf dem

Effekt der unterschiedlichen Lagerungszustände beruhte oder analysebedingt war (siehe Abb. 4.9). Auf Grund des beschriebenen Vorgehens bei der Auswertung der Daten (siehe Kapitel 3.3.1.4) konnte für Harnstoff bei keinem der drei untersuchten Transportzustände eine Zeitspanne für dessen Stabilität angegeben werden (siehe Tab. 4.17), da schon vier Stunden nach der Blutentnahme mehr als 5% der Proben den festgelegten Grenzwert überschritten hatten. Zusätzlich zur Analyse-Problematik von Harnstoff unterliegt dieser Parameter starken Schwankungen im Blut durch Fütterung (STÖBER und GRÜNDER, 1990; GRÜNDER, 1991; OCHRIMENKO et al., 1998), sowie Milchmenge und Alter des Rindes (KITCHENHAM et al., 1975; DOORNENBAL et al., 1988). Dies lässt die Harnstoffbestimmung in Milchproben vorteilhafter erscheinen². Harnstoff wurde daher nicht in die nachfolgenden Diskussionen zur Stabilität der Parameter unter den einzelnen Transportzuständen mit eingeschlossen.

Bei der zusätzlichen Untersuchung speziell zu den Freien Fettsäuren (siehe Kapitel 4.3) wurde mit 2,12% ein höherer Analyse-VK ermittelt als bei der ersten Untersuchung zu den verschiedenen Transportzuständen (VK = 0,73%) (siehe Tab. 3.5). Dies ergab sich aus dem niedrigen NEFA-Gehalt der Blutprobe, die bei der Untersuchung zu den Freien Fettsäuren zur Ermittlung des Analyse-VKs verwendet wurde. So schwankte der NEFA-Gehalt in dieser Probe zwischen 0,14 und 0,15 mmol/l, wodurch ein im Vergleich hoher VK von 2,12% ermittelt wurde. Dies ist jedoch ein mathematisch bedingtes Problem, da eine Variation von 2,12% bei der verwendeten Blutprobe eine analysebedingte Variation von nur 0,003 mmol/l darstellt, die vernachlässigbar gering ist.

5.5.2 Zentrifugation versus Temperatur

Für die meisten der untersuchten Parameter zeigte sich, dass die Zentrifugation der Blutproben vor dem Transport für die Stabilität der Parameter wichtiger ist als das Kühlen während des Transportes (siehe Tab. 4.18).

Beim Zentrifugieren der Blutproben wird das Serum von den lebenden Zellen getrennt, weshalb keine metabolischen Prozesse mehr ablaufen können (KRAFT und DÜRR, 2005d). In der vorliegenden Studie verblieb das Serum in den Entnahmeröhrchen, da in den Röhrchen ein Trenngel vorhanden war, das sich beim Zentrifugieren auf Grund seiner Dichte zwischen Blutkuchen und Serum ablagerte (BECTON DICKINSON, 2005). Im Serum konnten dann nur noch Wechselwirkungen zwischen den Inhaltsstoffen des Serums, dem Röhrchenmaterial oder äußeren Faktoren stattfinden.

In unzentrifugierten Proben können durch das Vorhandensein der Blutzellen weiterhin metabolische und Diffusionsprozesse ablaufen und dadurch die Zusammensetzung des Serums

² Persönliche Mitteilung von M. Höltershinken, Klinik für Rinder der Tierärztlichen Hochschule Hannover, 2006.

verändern. So verbrauchen die Blutzellen Glukose, um ihren Energiehaushalt aufrecht zu erhalten (siehe Abb. 4.23). Bei fortschreitender Lagerung kommt es zu einem Mangel an Metaboliten, die als Energiequelle dienen, so dass es zu einer Dysfunktion der Zellen und damit zur Lysis kommt (BOYANTON und BLICK, 2002). Die Zellysis verändert wiederum die Zusammensetzung des Serums, da nun Zellinhaltsstoffe dorthin abgegeben werden. Auf Grund der Zellyse bzw. Hämolyse werden Vollblutproben von den Laboratorien häufiger abgelehnt als Serumproben (JONES et al., 1997).

In der Praxis werden Blutproben häufig gekühlt, um sie zu konservieren. Durch die Kühlung werden metabolische Prozesse in der Blutprobe verlangsamt oder sogar unterbunden. Dies führt ebenfalls zu einer Konzentrationsveränderung einiger Parameter im Serum. So wird z.B. die Aktivität der Natrium-Kalium-Pumpe durch Kühlung gestoppt. Daraus resultiert ein Anstieg der Kaliumkonzentration im Serum, da Kalium auf Grund des Konzentrationsgefälles passiv aus den Zellen diffundiert und nun nicht mehr aktiv in die Zellen zurückgepumpt werden kann (ONO et al., 1981; REHAK und CHIANG, 1988).

5.5.3 Stabilität der Parameter in unzentrifugierten Blutproben

In den unzentrifugierten Proben, die bei Raumtemperatur transportiert wurden, blieb allein der Natriumgehalt über die untersuchten 48 Stunden hinweg stabil. Für Kalzium und Cholesterin wurde eine Stabilität von 36 Stunden ermittelt. Die Parameter AST, Bilirubin und NEFAs blieben über 24, 8 bzw. 4 Stunden stabil. Bei allen weiteren untersuchten Parametern (γ -GT, GLDH, Gesamteiweiß, Glukose im Serum und NaF/KOx-Plasma, BHBS, Kalium und Phosphat) hatten nach 4 Stunden schon mehr als 5% der Proben den festgelegten Grenzwert überschritten, so dass keine Stabilitätsgrenze ermittelt werden konnte (siehe Tab. 4.17). Auch BOYANTON und BLICK (2002) weisen darauf hin, dass eine Lagerung von unzentrifugierten Proben für mehr als 24 Stunden in signifikanten Veränderungen der meisten Analyten resultiert. Dies ist auf den Glukoseverbrauch, die Fehlfunktion der Na/K-Pumpe, die Wasserverschiebung in Richtung Zellen und damit einhergehender Hämokonzentration und das Ausströmen von intrazellulären Inhaltsstoffen zurückzuführen (BOYANTON und BLICK, 2002).

Stark abweichende bzw. fragwürdige Werte:

Bei einigen Parametern konnten bestimmte Analysedaten als stark abweichende bzw. fragwürdige Werte identifiziert werden, die durch die Methode bedingt waren. Zum einen wurde für jeden Analysezeitpunkt eine neue Probe verwendet, da das benötigte Serum direkt vor der Analyse abzentrifugiert wurde, und die Probe somit nicht mehr als Vollblut gelagert werden konnte (siehe Kapitel 3.2.1). Auf diese Weise wirkten auf die sieben unzentrifugierten Blutproben, die zu sieben unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert wurden, die entnahmebedingten möglichen Einflüsse wie z.B. Neueinstich in die Drosselvene, schäumendes Blut im Röhrchen, starker Einschuss des Blutes in das Röhrchen, fortdauernder Venenstau und Zellyse bzw. Hämolyse unterschiedlich stark ein. Zum anderen weist Rinderblut den höchst-

ten Fibrinogengehalt im Vergleich zu anderen Haussäugetieren und dem Menschen auf (MESSOW, 1959). Das Analysegerät Konelab[®]30i der Firma Thermo Electron Corporation verfügte über kein Gerinnsel-Warnsystem namens „clot detection“, so dass es möglich wäre, dass aus den Proben unerkannt Fibrinfäden vom Gerät aspiriert wurden. Dadurch werden vom Gerät geringere Serummengen analysiert und es kommt zu einem falschen Mischungsverhältnis mit den Reagenzien. Ähnliche Probleme mit Fibrin bei der Analyse von Serum mit automatischen Analysegeräten wurden auch von O'KEANE und CUNNINGHAM (2006) beschrieben.

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Parameter einzeln in Reihenfolge ihrer Stabilität ausgewertet.

Natrium:

Trotz der ermittelten Stabilität von Natrium über die gesamte Studiendauer hinweg konnte in einigen Proben ein Absinken der Werte im Zeitverlauf beobachtet werden (siehe Abb. 4.15). Dieser Konzentrationsabfall hat jedoch innerhalb der untersuchten 48 Stunden nie den in dieser Studie festgelegten Grenzwert von 8% Abweichung vom Ausgangswert überschritten. Abgesehen von der ermittelten Differenz 24 Stunden nach der Blutentnahme waren die Differenzen zu jedem Untersuchungszeitpunkt statistisch signifikant (siehe Abb. 4.16). Daher kann das ermittelte Verhalten von Natrium bei der Lagerung von Vollblut nicht als zufällig angesehen werden.

Der geringgradige Abfall der Werte bei Vollblut-Lagerung ist vermutlich auf einen Nebeneffekt der Zellyse zurückzuführen, die durch längere Lagerung der Blutproben entsteht. Dabei wird das Serum mit dem Zytoplasma der Zellen angereichert und die Natriumkonzentration nimmt artifiziell ab.

Das Ergebnis dieser Studie deckt sich mit anderen Untersuchungen zu bovinem (TASKER, 1978; WITTWER et al., 1986; FONTAINE et al., 1987b), equinem (LINDNER, 1991) und humanem (REHAK und CHIANG, 1988; KELLER, 1975; LAESSIG et al., 1976a; ZHANG et al., 1998) Vollblut, in denen Natrium ebenfalls als stabiler Parameter beschrieben wird. Einen geringgradigen Abfall des Natriumgehaltes konnten ONO et al. (1981) und HEINS et al. (1995) beobachten. Sie führten dies jedoch nicht auf eine Verdünnung des Serums zurück, sondern auf die Diffusion von Natrium in die Zellen auf Grund des Konzentrationsgradienten. Einige Studien hatten gegensätzliche Ergebnisse; hier wurde ein geringfügiger Anstieg der Natriumkonzentration beobachtet (BOYANTON und BLICK, 2002; O'KEANE und CUNNINGHAM, 2006). Dies wurde auf eine Hämokonzentration zurückgeführt, da Plasmawasser während der Lagerung an die Zellen verloren geht und somit die Natriumkonzentration im Serum artifiziell erhöht wird. Dies wurde hier nicht beobachtet.

Kalzium:

In der vorliegenden Studie wurde für Kalzium eine Stabilität von 36 Stunden in bei Raumtemperatur gelagertem Vollblut bestimmt. Bei Betrachtung des relativen Verlaufes über die

Zeit (siehe Abb. 4.19) zeigt sich auch dieser Parameter sehr stabil. Die Ermittlung der Stabilität von 36 Stunden ergibt sich aus der Festlegung, dass maximal 5% der Proben mehr als 5% vom Ausgangswert abweichen dürfen (siehe Kapitel 3.3.1.4). Dies ist durch zwei stark abweichende bzw. fragwürdige Werte zum Analysezeitpunkt 48 Stunden nach der Blutentnahme eingetreten (siehe Tab. 4.10). Trotz des sehr geringen Analyse-VK's von 0,84% (siehe Tab. 3.5) konnten derartige Werte hier methodisch bedingt entstehen (siehe oben: stark abweichende bzw. fragwürdige Werte). Im Fehlerbalken-Diagramm (siehe Abb. 4.20) zeigte sich dieser Parameter im Vollblut sehr stabil mit nur geringer Variation, so dass Kalzium auch über die untersuchten 48 Stunden hinweg als stabil angesehen werden kann, obwohl sich mathematisch nur 36 Stunden Stabilität in dieser Studie ergeben haben.

Das Ergebnis dieser Studie steht im Einklang mit anderen Studien zu bovinem (TASKER, 1978; WITTEWERT et al., 1986; FONTAINE et al., 1987b; GRÜNDER, 1991), equinem (LINDNER, 1991) und humanem (LAESSIG et al., 1976a; REHAK und CHIANG, 1988; HEINS et al., 1995; ZHANG et al., 1998; BOYANTON und BLICK, 2002) Vollblut, in denen sich Kalzium ebenfalls sehr stabil verhielt. Dagegen wiesen andere Untersuchungen einen Abfall in caninem (THORESEN et al., 1992) und humanem (HEINS et al., 1995) Vollblut nach. Dies wurde auf eine passive Diffusion von Kalzium in die Zellen auf Grund des Konzentrationsgradienten zurückgeführt (HEINS et al., 1995). Ein Anstieg der Kalziumkonzentration bei Vollblut-Lagerung wurde von ONO et al. (1981) beobachtet, für den jedoch keine Begründung geliefert wurde. In der vorliegenden Studie wurde, abgesehen von den zwei abweichenden Werten 48 Stunden nach der Blutentnahme, kein Anstieg oder Abfall der Kalziumkonzentrationen im Serum bei Vollblut-Lagerung festgestellt.

Cholesterin:

Ähnlich wie Kalzium blieb auch Cholesterin 36 Stunden im Vollblut stabil. Der relative Verlauf über die Zeit (siehe Abb. 4.11) zeigt jedoch, dass sich dieser Parameter bis auf drei Werte über die gesamte Untersuchungsdauer hinweg beständig verhält. Bei diesen drei Werten handelt es sich daher um stark abweichende bzw. fragwürdige Werte, die durch die Methode des Versuchs entstehen können (siehe oben). Trotzdem zeigt sich im Fehlerbalken-Diagramm (siehe Abb. 4.12) ein stetiger Anstieg auf bis zu 2,7% mittlere Differenz vom Ausgangswert bei den unzentrifugierten Proben. Dieser leichte Anstieg beginnt zwölf Stunden nach der Blutentnahme und ist ab dem 36h-Wert statistisch signifikant, aber auf Grund der Höhe der Differenz nicht klinisch bedeutsam.

Ähnlich zum Ergebnis der vorliegenden Studie konnte VON BENTEN (1972) bis zum zweiten Tag der Lagerung einen allmählichen Anstieg des Cholesteringehaltes im Vollblut von Rindern nachweisen. Auch humane Studien zur Vollblut-Lagerung bei Raumtemperatur zeigten einen Anstieg des Cholesteringehaltes (HEINS et al., 1995; BOYANTON und BLICK, 2002). Dieser wurde auf die kontinuierliche Cholesterinfreisetzung aus den Blutzellen durch Lecithin zurückgeführt (BOYANTON und BLICK, 2002). Dagegen blieb der Cholesteringehalt in anderen Studien zur Lagerung von bovinem (TASKER, 1978; FONTAINE et al., 1987b), equinem (LINDNER, 1991), caninem (THORESEN et al., 1992) und humanem (KELLER, 1975;

LAESSIG et al., 1976a; ONO et al., 1981; REHAK und CHIANG, 1988; ZHANG et al., 1998; CLARK et al., 2003) Vollblut stabil.

Aspartat-Amino-Transferase (AST):

Für diesen Parameter wurde im Vollblut eine Stabilität von 24 Stunden ermittelt. In Abbildung 4.1 wird deutlich, dass die AST über zwölf Stunden einen konstanten Verlauf aufweist. Danach steigt die Aktivität kontinuierlich an, und 36 Stunden nach der Blutentnahme haben bereits mehr als 5% der Proben den festgelegten Grenzwert von 20% maximal vertretbarer Abweichung vom Ausgangswert überschritten. Die relativen Abweichungen vom Ausgangswert sind ab dem 24h-Wert statistisch signifikant (siehe Abb. 4.2). Da die Konzentration der AST in den Zellen höher ist als im Serum (DIRKSEN, 1990; KRAFT und DÜRR, 2005c) und es bei fortdauernder Lagerung zur Zell- bzw. Hämolyse kommt (ONO et al., 1981), steigt die AST-Konzentration im Serum an.

Dieses Ergebnis deckt sich auch mit den Ergebnissen anderen Untersuchungen. Bei der Lagerung von bovinem (VON BENTEN, 1972; TASKER, 1978; FONTAINE et al., 1987b) und caninem (FRIEDEL und MATTENHEIMER, 1970; THORESEN et al., 1992) Vollblut wurde ebenfalls ein Anstieg der AST-Aktivität nachgewiesen. Im Vollblut von Pferden konnte über vier Tage hinweg kein Anstieg der AST-Aktivität nachgewiesen werden (LINDNER, 1991). Im humanen Vollblut zeigte sich ein Anstieg der AST bei der Lagerung, jedoch konnten unterschiedliche Stabilitäten ermittelt werden. So wurden bei der Lagerung bei Raumtemperatur AST-Stabilitäten von 48 Stunden (LAESSIG et al., 1976a), 56 Stunden (BOYANTON und BLICK, 2002) und sieben Tagen (HEINS et al., 1995) beobachtet. Nach CLARK et al. (2003) steigt die AST-Aktivität nach 24 Stunden um 15% und nach drei Tagen um 41% an. Bei ONO et al. (1981) konnte nach 24 Stunden ein Anstieg um 17% verzeichnet werden.

Während ein Anstieg der AST-Aktivität bei der Lagerung von Vollblut der verschiedenen Spezies bei Raumtemperatur regelmäßig beobachtet wird, ist die Dauer der AST-Stabilität umstritten. Dies könnte mit dem Grad der Zellyse in den verwendeten Blutproben und der daraus resultierenden Freisetzung des Enzyms aus den Zellen zusammenhängen. Zusätzlich kommt es während der Gerinnung zum Austritt der Enzyme aus den Thrombozyten (BREUER und STUCKY, 1975). Die höchsten AST-Aktivitäten finden sich in den Leukozyten (FRIEDEL und MATTENHEIMER, 1970). Daher könnte es bei Vollblutproben von Patienten, deren weißes Blutbild eine Leukozytose aufweist, durch die eintretende Zellyse zu einem stärkeren Anstieg der AST-Aktivität im Vergleich zu Blutproben von gesunden Patienten kommen. Diese These wird zusätzlich dadurch gestützt, dass die Glykolyserate bei Leukozytose stark erhöht ist und damit der Glukoseverbrauch in diesen Blutproben beschleunigt wird (ZHANG et al., 1998; SACKS, 2006). In den erwähnten Studien zur Bestimmung der AST-Stabilität wurde nicht näher auf den Leukozytengehalt der Proben eingegangen, so dass dieser Erklärungsansatz nur als Hypothese stehen bleiben kann.

Bilirubin:

Nach zwölf Stunden haben bereits mehr als 5% der Proben den festgelegten Grenzwert von 15% maximal vertretbarer Abweichung vom Ausgangswert überschritten (Abb. 4.7). Für Bilirubin wurde daher eine Stabilität von acht Stunden in unzentrifugierten Proben, die bei Raumtemperatur gelagert wurden, ermittelt. Die starke Variation der Werte wird im Fehlerbalken-Diagramm durch die Länge der Fehlerbalken, die die einfache Standardabweichung repräsentieren, deutlich (siehe Abb. 4.8). Es zeigt sich, dass Bilirubin im Mittel zwölf Stunden nach der Blutentnahme ansteigt, wobei die Differenzen ab dem 24h-Wert statistisch signifikant sind (siehe Abb. 4.8).

Das diskontinuierliche Verhalten von Bilirubin unter diesem Transportzustand könnte analysebedingt sein, da der Analyse-Variationskoeffizient mit 7,22% vergleichsweise hoch lag (siehe Tab. 3.5). Als Bestimmungsmethode wurde eine Abwandlung des Diazo-Verfahrens nach Malloy-Evelyn angewendet (siehe Kapitel 2.4.4). Hierbei wird Methanol als Akzelerator genutzt, von dem bekannt ist, mit Hämoglobin zu interferieren, Trübung auf Grund der Proteinausfällung zu erzeugen und eine lange Reaktionszeit zu haben (HIGGINS et al., 2006). Weiterhin übt Methanol durch sein „Alter“ Einfluss auf das Absorptionsvermögen des gebildeten Azofarbstoffs aus (DOUMAS et al., 1973).

Auch methodisch bedingt stark abweichende bzw. fragwürdige Werte (Erläuterung am Anfang dieses Unterkapitels) ähnlich wie bei Kalzium und Cholesterin sind möglich. Zusätzlich wurden die Röhrchen im dunklen Schrank bis zu ihrer Analyse gelagert, waren jedoch durch das Öffnen und Schließen der Schranktür unterschiedlicher Lichtexposition ausgesetzt. Die Proben standen an unterschiedlichen Positionen im Schrank, wodurch die Lichtexposition jeder Probe variierte. Licht löst in den Proben eine Photooxidation aus, in deren Verlauf Bilirubin abgebaut wird, wodurch der Gehalt im Serum sinkt (VOIT, 1993; KRAFT und DÜRR, 2005c; THOMAS, 2005c; THALER et al., 2008). Die Lichtexposition könnte möglicherweise zu dem diskontinuierlichen Verlauf beigetragen haben.

Im Mittel konnte in dieser Studie ein Anstieg des Bilirubingehaltes nachgewiesen werden. Dieser könnte auf einer Hämolyse der Blutproben durch die fortdauernde Lagerung beruhen. Das dabei freigesetzte Hämoglobin kann sowohl spektral als auch chemisch bei der Analyse stören (GRAFMEYER et al., 1995). So konnte SONNTAG (1986) hämolysebedingt fälschlich erhöhte Bilirubinkonzentrationen im Serum nachweisen, gab aber keinen Hinweis auf die verwendete Bestimmungsmethode. Die in der vorliegenden Studie verwendete Methode, eine Abwandlung des Diazo-Verfahrens nach Malloy-Evelyn, soll jedoch nach Herstellerangaben (Thermo Electron Corporation, 2005) bis zu einer Hämoglobinkonzentration von 3 g/l nicht gestört werden. Keine der analysierten Proben war derartig stark verfärbt. JACOBS et al. (1992) konnten im bovinen Serum keinen Einfluss durch die Zugabe von Hämoglobin auf die Bilirubin-Messergebnisse nachweisen. Andere Untersuchungen weisen dagegen auf einen störenden Einfluss bei der Bestimmung des Bilirubins durch Hämolyse der Proben hin (EL-SEBAIE und HOFMANN, 1981; SONNTAG, 1986; THALER et al., 2008), so dass diese Möglichkeit nicht komplett ausgeschlossen werden kann.

Im Gegensatz zur vorliegenden Studie verhielt sich Bilirubin bei der Lagerung in anderen Studien zu bovinem (TASKER, 1978), equinem (LINDNER, 1991), caninem (THORESEN et al., 1992) und humanem (KELLER, 1975; LAESSIG et al., 1976a; ONO et al., 1981; REHAK und

CHIANG, 1988; ZHANG et al., 1998) Vollblut stabil. Dies könnte auf niedrigere Analyse-Variationskoeffizienten, geringere Interferenzen durch Hämoglobin durch weniger Hämolyse in den Proben oder auch der Anwendung anderer Bestimmungsmethoden zurückzuführen sein. BOYANTON und BLICK (2002) beobachteten im humanen Vollblut ähnlich zur vorliegenden Studie nach 24 Stunden bei Raumtemperatur einen Anstieg des Bilirubingehaltes von 17% und führten dies auf Hämokonzentration zurück.

Freie Fettsäuren (NEFA):

Dieser Parameter wies in dieser Studie meistens sehr niedrige Werte auf (Datenbereich: 0,00 - 2,13 mmol/l). Die Auswertung über die relativen Differenzen führte daher zu unklaren graphischen Darstellungen mit dem Risiko der fehlerhaften Interpretation (siehe Abb. 4.29). Dies liegt in der mathematischen Ursache begründet, dass bei einem sehr niedrigen Ausgangswert eine niedrige absolute Abweichung der Werte eine hohe relative Differenz ergibt. So würden beispielsweise bei einem Ausgangswert von 0,01 mmol/l ein Anstieg auf 0,03 mmol/l eine absolute Differenz von 0,02 mmol/l und eine relative Differenz von 200% bedeuten. Derartige Ergebnisse für die relative und absolute Differenz stehen in keinem klinisch sinnvollen Verhältnis zueinander, so dass die NEFAs über die absolute Abweichung vom Ausgangswert ausgewertet wurden. Dieses mathematische Problem hatte sich für die anderen Parameter dieser Studie nicht ergeben, da diese höhere Messwerte aufwiesen. Auch JACOBS et al. (1992) haben bei Parametern mit sehr niedrigen Werten die Auswertung über die absoluten Abweichungen der relativen Abweichungen vorgezogen.

Für die Freien Fettsäuren wurde in Blutproben, die un zentrifugiert bei Raumtemperatur transportiert und gelagert wurden, eine Stabilität von vier Stunden ermittelt. Acht Stunden nach der Blutentnahme haben bereits mehr als 5% der Proben den festgelegten absoluten Grenzwert von $\pm 0,20$ mmol/l vom Ausgangswert überschritten (siehe Tab. 4.16). Bei Betrachtung des Verhaltens der Werte über die Lagerungsdauer hinweg (siehe Abb. 4.30) wird jedoch deutlich, dass es sich bei den grenzwertüberschreitenden Proben um stark abweichende bzw. fragwürdige Werte handelt und die restlichen Daten ein einheitliches Verhalten aufweisen. Diese abweichenden Werte sind methodisch bedingt (siehe oben: stark abweichende bzw. fragwürdige Werte). Im Fehlerbalken-Diagramm mit der Darstellung der Mittelwerte der absoluten Abweichungen vom Ausgangswert zeigt sich im Mittel ein stabiles Verhalten der NEFAs über 48 Stunden hinweg (siehe Abb. 4.31). Die erhöhte Variation der Werte, dargestellt durch die Länge der Fehlerbalken, wird durch die bereits erwähnten abweichenden Werte erzeugt.

Das Ergebnis dieser Studie deckt sich mit den Untersuchungen von STOKOL und NYDAM (2005), bei denen sich die Freien Fettsäuren im Vollblut ebenfalls stabil verhielten. In anderen bovinen (BRENNER und REINHARD, 1976), ovinen (MORRIS et al., 2002) und humanen (MCGANN und HODSON, 1991) Studien wurde dagegen ein Anstieg der NEFA-Konzentration im Vollblut beobachtet. Die Differenzen in den Studienergebnissen könnten an dem unterschiedlichen Auftreten einer Hämolyse in den verwendeten Proben liegen. Eine Hämolyse erzeugt falsch erhöhte NEFA-Werte, da deren Konzentration bei 550 nm bestimmt wird, wo auch Hämoglobin einen Absorptionspeak aufweist (STOKOL und NYDAM, 2006).

Auch unterschiedliche Probenmaterialien bzw. deren Kunststoffe könnten die verschiedenartigen Ergebnisse verursachen (siehe Kapitel 5.1). JOHNSON und PETERS (1993) vermuteten sogar, dass eine Plasma-Komponente die enzymatische Reaktion zur NEFA-Bestimmung durch Wechselwirkungen stört.

γ -Glutamyl-Transferase (γ -GT):

Insgesamt wurde für die γ -GT eine Stabilität von weniger als vier Stunden im Vollblut ermittelt. Bei Betrachtung des relativen Verlaufes konnten jedoch unterschiedliche Stabilitäten in den Blutproben beobachtet werden (siehe Abb. 4.3). So war dieses Enzym in den Blutproben von einigen Rindern stabil, während in anderen Blutproben ein Anstieg zu verzeichnen war. Dies zeigt sich im Fehlerbalken-Diagramm durch die hohe Streuung der Werte um den jeweiligen Mittelwert (siehe Abb. 4.4). Dieses unterschiedliche Verhalten könnte in der Zellzahl der einzelnen Blutproben begründet liegen. In dieser Studie wurden sowohl kranke als auch gesunde Rinder verwendet, wodurch sich unterschiedliche Konzentrationen unter anderem an Leukozyten in den Blutproben ergaben. Bei erhöhten Zellzahlen im Blut könnte es eher zu einer Fehlfunktion des Zellstoffwechsels durch den Verbrauch an begrenzt vorhandenen Metaboliten wie z.B. Glukose kommen. Dies führt zu einer erhöhten Zellpermeabilität, Aufhebung der Membranstabilität und schließlich zur Zelllyse, wobei während dieses Prozesses Wasser zum Konzentrationsausgleich in die Zellen diffundiert (BOYANTON und BLICK, 2002). Durch diese Hämokonzentration wäre es möglich, dass die γ -GT im Serum in fälschlich erhöhten Konzentrationen gemessen wird.

Auch in humanen Studien wurden unterschiedliche Ergebnisse zur γ -GT-Stabilität in Vollblutproben ermittelt. Während dieses Enzym in einigen Studien stabil blieb (ONO et al., 1981; REHAK und CHIANG, 1988; HEINS et al., 1995; ZHANG et al., 1998), konnten andere einen Anstieg beobachten (BOYANTON und BLICK, 2002; CLARK et al., 2003), deren Ursache jedoch nicht erörtert wurde. Eine Hämolyse soll auf die Aktivität der γ -GT keinen Einfluss haben (SONNTAG, 1986; JACOBS et al., 1992; THOMAS, 2005e).

Glutamat-Dehydrogenase (GLDH):

Ähnlich der γ -GT wurde auch bei der GLDH eine Stabilität von weniger als vier Stunden ermittelt, jedoch konnte kein einheitliches Verhalten in den Blutproben beobachtet werden (siehe Abb. 4.5). So zeigte sich dieses Enzym in einigen Blutproben stabil, während es in anderen starken Schwankungen unterlag oder anstieg. Dies erklärt die hohe Streuung der Werte um den Mittelwert im Fehlerbalken-Diagramm (siehe Abb. 4.6). In dieser Darstellung wird auch deutlich, dass die Aktivität dieses Enzyms im Mittel ansteigt. Da es sich hierbei um ein intrazelluläres leberspezifisches Enzym handelt, kann eine Aktivitätssteigerung im Serum nicht durch eine Abgabe aus den Blutzellen bei eintretender Zelllyse verursacht worden sein (KELLER, 1971). Das unterschiedliche Verhalten ist vermutlich eher ähnlich der γ -GT durch die unterschiedlichen Zellzahlen bei den einzelnen in dieser Studie verwendeten Rindern bedingt. So käme es bei hohen Zellzahlen und vergleichsweise geringen Glukosewerten zu

einem zeitlich unterschiedlichen Verlust der Membranstabilität der Zellen und damit zu einer Hämokonzentration, die die ansteigenden GLDH-Werte erklären würde.

Zur GLDH-Stabilität im Vollblut sind bisher nur wenige Untersuchungen durchgeführt worden. Im caninen Vollblut blieb die GLDH über drei Tage stabil (THORESEN et al., 1992).

Gesamtprotein:

Für Gesamtprotein konnte in Vollblutproben ebenfalls keine Stabilitätsgrenze ermittelt werden, da schon vier Stunden nach der Blutentnahme mehr als 5% der Proben den festgelegten Grenzwert überschritten hatten (siehe Abb. 4.13). Dabei scheint es sich um methodisch bedingt abweichende Werte zu handeln (siehe oben), da der Proteingehalt in den restlichen Proben vergleichsweise konstant bleibt. Im Fehlerbalken-Diagramm kann im Mittel ein geringfügiger Anstieg des Proteingehaltes auf 2,43% beobachtet werden, der ab dem 12h-Wert statistisch signifikant ist (siehe Abb. 4.14). Auf Grund der bereits beschriebenen abweichenden Werte ergibt sich eine erhöhte Streuung der Werte um ihren Mittelwert von bis zu 3,58%. Der geringfügige Anstieg des Proteingehaltes wird vermutlich durch Hämokonzentration erzeugt, bei der Wasser auf Grund des Konzentrationsgradienten aus dem Serum an die Zellen verloren geht.

Im Einklang mit dem Ergebnis dieser Studie konnten auch einige andere Studien einen signifikanten Anstieg des Proteingehaltes im humanen (ZHANG et al., 1998; KELLER, 1975) und caninen (THORESEN et al., 1992) Vollblut nachweisen. Im Gegensatz dazu wird der Proteingehalt in den meisten Studien zur Lagerung von humanem (LAESSIG et al., 1976a; ONO et al., 1981; BOYANTON und BLICK, 2002; CLARK et al., 2003), bovinem (TASKER, 1978; WITTEWITZ et al., 1986; FONTAINE et al., 1987b) und equinem (LINDNER, 1991) Vollblut als stabiler Parameter eingestuft. Diese verschiedenartigen Ergebnisse können durch den zeitlich unterschiedlichen Eintritt einer Hämokonzentration abhängig von der Zellzahl und der Verfügbarkeit von Metaboliten in den verwendeten Blutproben entstanden sein.

Eine geringgradige, mit dem bloßen Auge nicht erkennbare Hämolyse könnte ebenfalls der Grund für den geringfügigen Anstieg des Proteingehaltes in der vorliegenden Studie sein. So ist Hämoglobin zum einen selbst ein Protein und weist zum anderen bei 530 nm und 600 nm kleinere Absorptionspeaks auf (GRAFMEYER et al., 1995). Hier wurde die Biuret-Reaktion zur Bestimmung des Proteingehaltes genutzt, bei der eine photometrische Messung bei 546 nm durchgeführt wird (siehe Kapitel 2.4.5). Damit wäre auch eine leichte spektrale Interferenz möglich. Die unterschiedlichen Ergebnisse zur Stabilität des Proteins im Vollblut zwischen den einzelnen Studien könnten damit nicht nur von der Zellzahl und der Verfügbarkeit von Metaboliten im Blut abhängen, sondern auch auf unterschiedlichen Graden einer Hämolyse in den Blutproben beruhen.

Glukose:

Die Glukose blieb in den unzentrifugierten Serum- und NaF/KOx-Proben weniger als vier Stunden stabil (siehe Abb. 4.23 und 4.24).

Im Serum aus den gelagerten Vollblutproben ohne Zusatz konnte ein starker Abfall beobachtet werden, der im Mittel nach vier Stunden bei 8,78% und nach 48 Stunden bei 81,80% lag (siehe Abb. 4.25). Die ermittelten Differenzen waren zu jedem Zeitpunkt statistisch signifikant. Der Abfall des Glukosegehaltes wird durch den Verbrauch der Zellen verursacht, die Glukose zur Energiegewinnung und damit zur Aufrechterhaltung der Membranstabilität benötigen (ZHANG et al., 1998). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen aus anderen Studien, in denen speziesübergreifend ebenfalls ein Glukose-Abfall in Vollblutproben beobachtet wurde (VON BENTEN, 1972; LAESSIG et al., 1976a; ONO et al., 1981; FONTAINE et al., 1987b; REHAK und CHIANG, 1988; THORESEN et al., 1992; ZHANG et al., 1998; CHRISTOPHER und O'NEILL, 2000; BOYANTON und BLICK, 2002; SACKS et al., 2002). Unterschiede betreffen lediglich die Stärke des Abfalls und damit die Zeitspanne, in der Glukose im Vollblut mit verwertbarem Ergebnis bestimmt werden kann. So gibt GRÜNDER (1991) für bovines Vollblut 18 Stunden bei Aufbewahrung bei 4°C an, während in der vorliegenden Studie bereits zwölf Stunden nach der Blutentnahme im Mittel 48,67% Verlust an Glukose ermittelt wurde. Diese Differenzen können durch drei verschiedene Mechanismen erklärt werden: Erstens ist der Zellstoffwechsel und damit der Glukoseverbrauch temperaturabhängig (ONO et al., 1981; REHAK und CHIANG, 1988; ZHANG et al., 1998), zweitens ist die Glykolyserate der Blutzellen speziesabhängig (ARAI et al., 1995; CHRISTOPHER und O'NEILL, 2000), und drittens ist die Glykolyserate bei Leukozytose erhöht (ZHANG et al., 1998; SACKS, 2006). Alle drei Effekte können die Studien unterschiedlich beeinflusst haben, wodurch sich unterschiedliche Zeitspannen für die Glukoseanalyse im Vollblut ergeben.

Die ermittelte Instabilität der Glukose im NaF/KOx-Plasma bei der Lagerung als Vollblut resultierte aus der Festlegung, dass nicht mehr als 5% der Proben den festgelegten Grenzwert überschreiten durften. Auf Grund der erhöhten Streuung der Werte von 7,95 - 12,53% (siehe Abb. 4.25) und einem festgelegten Grenzwert von 8% maximaler Abweichung vom Ausgangswert lagen einige Proben frühzeitig mit ihren Glukosewerten ausserhalb des Grenzbeereiches. Die ermittelten Schwankungen bei den Glukosewerten in den unzentrifugierten NaF-Proben können zum einen methodisch bedingt sein. So wären Unterschiede beim Schwenken der Proben und damit in der Vermischung des Blutes mit dem Antiglykolant möglich. Zum anderen ist bekannt, dass Natrium-Fluorid erst nach einer Stunde Inkubation anfängt, die Glykolyse zu hemmen (CHAN et al., 1990; SACKS et al., 2002). Zunächst wird die Glykolyse lediglich verlangsamt und erst nach vier Stunden optimal gehemmt (CHAN et al., 1989). Daher wäre es möglich, dass innerhalb der ersten vier Stunden in den sieben entnommenen Blutproben je Kuh ein unterschiedlich starker Glukoseverbrauch stattgefunden hat, was in der Auswertung die variierenden Differenzen zum Ausgangswert erzeugen würde. Auch andere Studien zeigten, dass Röhrchen mit dem Zusatz von NaF zur Glukosebestimmung nur geeignet sind, wenn eine unmittelbare Serumgewinnung nicht möglich ist (GELFERT und STAUFENBIEL, 1998; WARING et al., 2007). LE ROUX et al. (2004) untersuchten andere mögliche Hemmstoffe der Glykolyse und empfahlen eine spezielle Kombination aus Glycerinaldehyd, NaF und KOx als glykostatischen Wirkstoff.

β -Hydroxybuttersäure (BHBS):

Für die BHBS konnten in den unzentrifugierten Blutproben stark variierende Werte ermittelt werden (siehe Abb. 4.27). Auch im Fehlerbalken-Diagramm lässt sich kein einheitlicher Verlauf erkennen (siehe Abb. 4.28). So steigen die Mittelwerte bis zum 12h-Wert an, um dann wieder abzufallen und nach 36 Stunden wieder anzusteigen. Des Weiteren lässt sich eine starke Streuung der Werte um ihren Mittelwert von 5,42 – 6,96% in dieser Darstellung erkennen. Die ermittelten schwankenden Werte für die BHBS lassen sich nicht an Hand des Analyse-Variationskoeffizienten erklären, da dieser mit 2,03% verhältnismäßig gering war (siehe Tab. 3.5).

Auch in der Literatur sind unterschiedliche Angaben über die Stabilität der BHBS im Vollblut zu finden. In einer Studie zu bovinem Vollblut bleibt sie über 24 Stunden stabil (STOKOL und NYDAM, 2005) und wird auch durch eine Hämolyse nicht beeinflusst (STOKOL und NYDAM, 2006). JACOBS et al. (1992) beobachteten dagegen einen hämolysebedingten Anstieg im bovinen Vollblut. Im humanen Vollblut blieb die BHBS auch in einigen Studien stabil (CUSTER et al., 1983; SACKS et al., 2002), während andere einen starken Abfall beobachteten (LAUN et al., 2001). Ein Abfall wurde auch im ovinen Vollblut registriert (MORRIS et al., 2002). Diese stark abweichenden Ergebnisse können speziesspezifisch sein oder durch unterschiedliche Bestimmungsmethoden verursacht worden sein. Die genannten Studien verwendeten jedoch alle die enzymatische Bestimmungsmethode mit der β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase, bei der die Extinktion von NADH bei 340 nm gemessen wird. Nur LAUN et al. (2001) verwendeten die zyklisch-enzymatische Reaktion zur Bestimmung der BHBS mit der Messung der Extinktion von Thio-NADH bei 405 nm. In der vorliegenden Studie wurde ebenfalls die zyklisch-enzymatische Reaktion angewendet. Hämoglobin beginnt mit der Absorption von Licht bei einer Wellenlänge um 340 nm (KROLL und ELIN, 1994), wodurch die Analytik über die β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase-Methode gestört wird (LARSEN und NIELSEN, 2005). Dazu hatten jedoch STOKOL und NYDAM (2006) und JACOBS et al. (1992) konträre Ergebnisse (siehe oben). Die Messung von Thio-NADH bei 405 nm liegt dagegen nicht in einem Absorptionspeak von Hämoglobin, so dass die in dieser Studie verwendete zyklisch-enzymatische Reaktion durch hämolytische Proben nicht gestört werden dürfte. Eine eventuell in den Blutproben unterschiedlich stark ablaufende Hämolyse kann daher nicht die Ursache für das instabile Verhalten der BHBS im Vollblut sein. Für den im Durchschnitt ermittelten Anstieg der BHBS-Konzentration könnte die bereits erwähnte Hämokonzentration verantwortlich sein. Dies kann jedoch nicht die alleinige Ursache sein, da die Werte generell starken Schwankungen unterliegen und im Mittel nach einem ersten Anstieg auch wieder abfallen. Als mögliche Ursache wären Wechselwirkungen mit dem verwendeten Röhrchenmaterial denkbar. Derartige Probleme sind jedoch bisher nicht bekannt.

Kalium:

Der Kaliumgehalt stieg bei der Lagerung von Blutproben in unzentrifugiertem Zustand stark an (siehe Abb. 4.17). Auch für diesen Parameter konnte nach den Festlegungen dieser Studie keine Stabilitätsgrenze ermittelt werden, da nach vier Stunden schon mehr als 5% der Proben den festgelegten Grenzwert überschritten hatten. In der graphischen Darstellung

zeigt sich jedoch, dass es sich hierbei um stark abweichende Werte in Form von „Zacken“ handelt. Diese „Zacken“ zu Beginn der Untersuchung ergaben sich methodisch bedingt, da insgesamt sieben Blutproben von jeder Kuh für diese Untersuchung verwendet wurden (siehe Kapitel 3.2.1). Aus diesen Proben wurde die Bezugsprobe (2h-Wert) zufällig gewählt, so dass dafür auch Proben mit einem möglichen niedrigerem / höherem Kaliumgehalt, der durch kürzere / längere Zeitspannen zwischen Blutentnahme und Analytik entstehen konnte, ausgewählt werden konnten. Über den Untersuchungszeitraum hinweg kann jedoch ein einheitlicher Anstieg beobachtet werden. Im Fehlerbalken-Diagramm zeigt sich deutlich, dass nach zwölf Stunden der Kaliumgehalt im Vollblut signifikant ansteigt (Abb. 4.18). Nach 48 Stunden konnte im Mittel ein Anstieg um 29,42% mit einer Standardabweichung von 7,46% beobachtet werden.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien, in denen speziesübergreifend ein ansteigender Kaliumgehalt bei der Lagerung von Vollblut beobachtet wurde, der jedoch unterschiedlich stark war (KELLER, 1975; TASKER, 1978; ONO et al., 1981; WITTEWITZ et al., 1986; FONTAINE et al., 1987b; REHAK und CHIANG, 1988; GUDER und WISSER, 1990; LINDNER, 1991; THORESEN et al., 1992; HEINS et al., 1995; ZHANG et al., 1998; BOYANTON und BLICK, 2002). Die Kaliumwerte im Blut werden durch den Netto-Effekt aus der Glykolyse, welche Kalium mittels Natrium-Kalium-Pumpe in die Zellen bringt, und der passiven Diffusion, bei der Kalium aus den Zellen entweicht, bestimmt (ZHANG et al., 1998; O'KEANE und CUNNINGHAM, 2006). Demnach ist der Anstieg des Kaliumgehaltes in Vollblutproben temperaturabhängig (ZHANG et al., 1998), da für den Erhalt des Konzentrationsgradienten zwischen den Zellen und dem Blutplasma aktive metabolische Prozesse vorausgesetzt werden. Bei Kühlschranktemperaturen kommt es zum Sistieren der Stoffwechselmechanismen (KELLER, 1975). Der starke Kalium-Anstieg bei diesen Temperaturen liegt an der Hemmung der Natrium-Kalium-Pumpe und dem daraus resultierenden verstärkten passiven Transport von Kalium in den Extrazellularraum. Der Anstieg bei Raumtemperatur ist dagegen abgeschwächt (ONO et al., 1981; REHAK und CHIANG, 1988). Bei dieser Temperatur steigen die Kaliumwerte im Serum erst an, wenn keine Glukose für den aktiven Transport mehr zur Verfügung steht und es dadurch zu einer Dysfunktion der Natrium-Kalium-Pumpe kommt (KELLER, 1975; BOYANTON und BLICK, 2002). Dieser temperaturabhängige Anstieg der Kaliumgehalte im Vollblut konnte in der vorliegenden Studie nicht beobachtet werden, da alle Vollblutproben bei Raumtemperatur transportiert und gelagert wurden. Der unterschiedlich starke Anstieg des Kaliumgehaltes zwischen den Spezies erklärt sich aus Glukosekonzentration und Glykolyserate der Blutzellen, die speziesspezifisch unterschiedlich hoch sind (ARAI et al., 1995).

Eine in den Blutproben ablaufende Zelllyse kann ebenfalls ansteigende Werte verursachen, da Kalium in den Zellen in höheren Konzentrationen vorliegt als im Serum. Zusätzlich ist der Kaliumgehalt in den Blutzellen der einzelnen Tierarten unterschiedlich hoch (TASKER, 1978), was auch eine mögliche Ursache für den unterschiedlich starken Anstieg des Kaliumgehaltes zwischen den Spezies sein könnte. Da Rinder einen vergleichsweise hohen Kaliumgehalt in ihren Blutzellen aufweisen (TASKER, 1978), kann schon eine geringfügige, mit dem bloßen Auge nicht sichtbare Hämolyse eine erhebliche Erhöhung der Kaliumkonzentration verur-

sachen (KELLER, 1975; MARTENS, 1995). Dies könnte den starken Anstieg nach zwölf Stunden in der vorliegenden Studie erklären.

Anorganisches Phosphat:

Auch für anorganisches Phosphat konnte bei der Lagerung von unzentrifugierten Proben keine Stabilitätsgrenze ermittelt werden. Dieser Parameter verhielt sich ähnlich wie Kalium, zeigte jedoch einen vergleichsweise geringeren Anstieg (siehe Abb. 4.21). Die „Zacken“ in der graphischen Darstellung am Beginn der Untersuchung sind auch hier wie bei Kalium durch die Methode der Verwendung von mehreren Blutproben erklärbar (siehe Kalium). Im Fehlerbalken-Diagramm wird deutlich, dass der Phosphatgehalt im Mittel nach zwölf Stunden signifikant ansteigt (siehe Abb. 4.22). Nach 48 Stunden war der Phosphatgehalt im Mittel auf 15,79% Differenz vom Ausgangswert angestiegen. Die Standardabweichung liegt hier jedoch im Vergleich zu Kalium mit 14,57% wesentlich höher.

Ein derartiger Anstieg konnte auch in anderen Studien speziesübergreifend beobachtet werden (KELLER, 1975; LAESSIG et al., 1976a; ONO et al., 1981; WITTEWITZ et al., 1986; FONTAINE et al., 1987b; LINDNER, 1991; THORESEN et al., 1992; HEINS et al., 1995; ZHANG et al., 1998; BOYANTON und BLICK, 2002). In den einzelnen Studien konnten unterschiedliche Angaben über die Dauer der Lagerungsstabilität des Phosphats bis zum Anstieg gefunden werden. Zu einem Anstieg des Gehaltes an anorganischem Phosphat kommt es durch die hydrolytische Spaltung von organischen Phosphateestern mittels Serum-Phosphatasen, wodurch Phosphat freigesetzt wird (LINDNER, 1991; HEINS et al., 1995; ZHANG et al., 1998; BOYANTON und BLICK, 2002). Diese Phosphatester sind in Erythrozyten in höheren Konzentrationen vorhanden und werden bei eintretender Hämolyse freigesetzt (HEINS et al., 1995; KRAFT, 2005a). Dieser Vorgang ist temperaturabhängig (REHAK und CHIANG, 1988) und kann durch niedrigere Temperaturen verlangsamt werden (LINDNER, 1991). Daher ergeben sich bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen auch unterschiedliche Stabilitätsdauern. Weiterhin sind der Zellgehalt im Blut und die Phosphatester-Konzentration in den Zellen speziesspezifisch unterschiedlich hoch, wodurch sich die verschiedenartigen Ergebnisse erklären lassen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Vollblut zahlreiche Parameter auf Grund von metabolischen Prozessen (z.B. Glukose und Kalium), Hämokonzentration (z.B. Gesamteiweiß) und Zelllyse (z.B. anorganisches Phosphat) nicht dauerhaft stabil bleiben.

5.5.4 Stabilität der Parameter in zentrifugierten Blutproben

Die zentrifugierten Blutproben wurden sowohl bei Kühlschrank- als auch bei Raumtemperatur transportiert und gelagert. Die ermittelten Stabilitäten bei diesen beiden Temperaturen waren zumeist gleich. So blieben die Parameter AST, γ -GT, Cholesterin, Gesamteiweiß, Natrium, Kalium, Kalzium, anorganisches Phosphat und NEFA über die untersuchten 48 Stunden hinweg stabil. Die Glukose im Serum und NaF/KOx-Plasma verhielt sich bei Kühlschranktemperatur ebenfalls über 48 Stunden stabil, während für die Lagerung bei Raumtemperatur nur eine Stabilität von 36 Stunden ermittelt wurde. Bilirubin blieb bei Kühlschranktemperatur über 36 Stunden und bei Raumtemperatur über zwölf Stunden stabil. Für die BHBS wurde nur eine Stabilität von acht Stunden und für die GLDH von vier Stunden bei beiden Temperaturen ermittelt (siehe Tab. 4.17). Nachfolgend werden die Ergebnisse einzeln in Reihenfolge ihrer Stabilität ausgewertet.

Aspartat-Amino-Transferase (AST):

In zentrifugierten Blutproben stellte sich dieses Enzym bei Raum- und Kühlschranktemperlagerung als stabiler Parameter dar (siehe Abb. 4.1 und 4.2). Dieses Ergebnis deckt sich auch mit den Ergebnissen anderer Studien, in denen die AST im bovinen Serum als stabil ermittelt wurde (TASKER, 1978; JONES, 1985; GRÜNDER, 1991). Jedoch konnte VON BENTEN (1972) im bovinen Serum innerhalb von drei Tagen einen variierenden Verlauf der AST-Aktivität mit einem geringgradigen Anstieg am ersten Tag und nachfolgendem Absinken der Werte beobachten. TOLLERSRUD (1969) ermittelte nur bei gekühlter Lagerung eine Langzeitstabilität, während die Aktivität bei Raumtemperatur signifikant anstieg, was auf bakterielle Kontamination der Proben zurückgeführt wurde. In anderen veterinärmedizinischen Studien verhielt sich die AST bei Kühlschranktemperatur stabiler als bei Raumtemperatur (DAVY et al., 1984; LINDNER, 1991; SAEED et al., 1995). Dieser Unterschied wurde in der vorliegenden Studie nicht beobachtet.

γ -Glutamyl-Transferase (γ -GT):

Dieses Enzym zeigte in der vorliegenden Studie ebenfalls konstante Werte in zentrifugierten Proben bei beiden Transporttemperaturen (siehe Abb. 4.3 und 4.4). Dieses Ergebnis geht konform mit anderen Studien, in denen für die γ -GT speziesübergreifend eine Stabilität von mindestens zwei Tagen im Serum angegeben wurde (JONES, 1985; GRÜNDER, 1991; THORESEN et al., 1992; SAEED et al., 1995). Im equinen Plasma wurde dagegen bei Raumtemperatur ein kontinuierlicher Abfall dokumentiert, während sich bei 4°C keine signifikanten Veränderungen ergaben (LINDNER, 1991). Auch im Plasma von Seidenäffchen zeigte die γ -GT bei gekühlter Lagerung eine bessere Stabilität (DAVY et al., 1984). Diese temperaturabhängigen Unterschiede ließen sich hier nicht reproduzieren.

Cholesterin:

Cholesterin verhielt sich in zentrifugierten Blutproben sowohl bei Raum- als auch bei Külschranktemperatur über 48 Stunden stabil (siehe Abb. 4.11 und 4.12). Dieses Ergebnis konnte auch in anderen Studien zu bovinem Serum ermittelt werden (FREITAG, 1964; GRÜNDER, 1991). Dagegen beobachtete VON BENTEN (1972) nach einem Tag einen geringradigen Anstieg mit einem nachfolgenden Abfall bis zum dritten Tag der Untersuchung. In anderen Studien zu camelidem (SAEED et al., 1995), caninem (THORESEN et al., 1992) und equinem (LINDNER, 1991) Serum wurden bei der Lagerung keine Abweichungen des Cholesteringehaltes festgestellt. Im humanen Serum zeigten sich ebenfalls keine Veränderungen (KELLER, 1975; REHAK und CHIANG, 1988; DONNELLY et al., 1995; EVANS et al., 1995; BOYANTON und BLICK, 2002; O'KEANE und CUNNINGHAM, 2006). Lediglich die Studien von HARTLEY und DAVID (1992) und HEINS et al. (1995) verzeichneten einen Anstieg des Cholesteringehaltes.

Gesamteiweiß:

Zu den stabilen Parametern im Serum der zentrifugierten Proben gehört auch Gesamteiweiß (siehe Abb. 4.13 und 4.14). Dieses Ergebnis harmoniert mit den Ergebnissen anderer Studien, in denen speziesübergreifend eine Langzeitstabilität für Gesamteiweiß im Serum ermittelt wurde (TASKER, 1978; GRÜNDER, 1991; LINDNER, 1991; THORESEN et al., 1992; VOIT, 1993; DONNELLY et al., 1995; SAEED et al., 1995; BOYANTON und BLICK, 2002; THOMAS, 2005b). Im Plasma von Seidenäffchen wurde dagegen bei Raumtemperatur nach 24 Stunden Lagerung ein Anstieg beobachtet, der nach 48 Stunden wieder abfiel (DAVY et al., 1984). Auch im humanen Heparin-Plasma konnte eine geringe Zunahme der Proteinkonzentration bei Raumtemperaturlagerung beobachtet werden (KELLER, 1975).

Mineralstoffe:

Für Natrium (siehe Abb. 4.15 und 4.16), Kalium (siehe Abb. 4.17 und 4.18), Kalzium (siehe Abb. 4.19 und 4.20) und anorganisches Phosphat (siehe Abb. 4.21 und 4.22) konnte eine Stabilität von 48 Stunden in zentrifugierten Blutproben bei Raum- und Külschranktemperatur ermittelt werden.

Dieses Ergebnis deckt sich mit anderen speziesübergreifenden Studien zu Natrium, Kalium und Kalzium im Serum (TASKER, 1978; GRÜNDER, 1991; THORESEN et al., 1992; VOIT, 1993; DONNELLY et al., 1995; HEINS et al., 1995; SAEED et al., 1995; BOYANTON und BLICK, 2002; O'KEANE und CUNNINGHAM, 2006). Lediglich TASKER (1978) wies im separierten bovinen Serum über zehn Tage hinweg einen schwachen Anstieg des Kaliumgehaltes nach, was aber nicht im Gegensatz zu dieser Studie steht, da hier die Proben nur über 48 Stunden gelagert wurden. Weiterhin wurde ein ansteigender Kaliumgehalt im Serum durch Rezentrifugation der Proben beobachtet (VOIT, 1993; HIRA et al., 2001; O'KEANE und CUNNINGHAM, 2006). Dies wurde in der vorliegenden Studie nicht durchgeführt.

Für anorganisches Phosphat wurde konform gehend mit dem Ergebnis dieser Studie auch in anderen Studien zu bovinem (GRÜNDER, 1991), camelidem (SAEED et al., 1995), caninem (THORESEN et al., 1992), equinem (LINDNER, 1991) und humanem (DONNELLY et al., 1995)

Serum eine Langzeitstabilität ermittelt. Trotz der ermittelten Stabilität konnte in dieser Studie bei Raumtemperatur-Lagerung ein geringgradiger einheitlicher Anstieg beobachtet werden, der jedoch innerhalb der 48 Stunden nicht den festgelegten Grenzwert von 5% maximaler Abweichung vom Ausgangswert überschreitet (siehe Abb. 4.21). Dies hängt möglicherweise mit den Serum-Phosphatasen zusammen, die weiterhin Phosphat aus organischen Phosphateestern abspalten. Dieser Prozess läuft bei Kühlschranktemperatur verlangsamt oder gar nicht ab, da Enzyme temperaturabhängig sind und für ihre Funktion Aktivierungsenergie benötigen (BERG et al., 2003). Auch HEINS et al. (1995) beschrieben einen Anstieg von anorganischem Phosphat im Serum durch hydrolytische Spaltung von Phosphateestern, der jedoch auf Grund der höheren Konzentration von Phosphateestern in Erythrozyten im Vollblut stärker war als im Serum.

Freie Fettsäuren (NEFA):

Ähnlich wie die letztgenannten Parameter zeigten sich auch die Freien Fettsäuren in den zentrifugierten Blutproben bei beiden Transporttemperaturen stabil (siehe Abb. 4.30 und 4.31). Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Ergebnis von STOKOL und NYDAM (2005), die im bovinen Serum eine gute Stabilität über 72 Stunden ermittelten. Im Gegensatz dazu wird im ovinen Serum von einer steigenden NEFA-Konzentration berichtet (MORRIS et al., 2002). Auch im humanen Serum wurde von einer kontinuierlichen Zunahme der Freien Fettsäuren bei Lagerung von Serum berichtet, was auf die Lipaseaktivität im Serum zurückgeführt wurde (FORBES und CAMLIN, 1959; BRAUN, 1971; SAMPSON und HENSLEY, 1975; TRICHOPOULOU et al., 1976; GUDER und WISSER, 1990; VOIT, 1993; MENÉNDEZ et al., 2001). Dies wurde in der vorliegenden Studie nicht beobachtet. In tiefgefrorenen humanen Seren wurde keine Konzentrationsänderung der Freien Fettsäuren beobachtet (BROECHOVEN und PARIJS, 1968; BRAUN, 1971; SAMPSON und HENSLEY, 1975; GLEESON, 1987; MENÉNDEZ et al., 2001). Da Enzyme temperaturabhängig sind und für ihre Funktion Aktivierungsenergie benötigen (BERG et al., 2003), könnten die speziesspezifischen Unterschiede ihre Ursache in einem unterschiedlichen Temperaturverhalten der Serumlipase haben. So könnte die bovine Lipase schon bei Raumtemperatur, welche ca. 15°C unterhalb der Körpertemperatur liegt, gehemmt werden, während die humane Lipase erst bei niedrigeren Temperaturen sistiert. Dies wäre eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der NEFAs im bovinen, ovinen und humanen Serum, jedoch ist zu dieser Thematik bisher nichts bekannt.

Glukose:

Sowohl im Serum als auch im NaF/KOx-Plasma wurde bei Raumtemperatur-Lagerung eine Stabilität von 36 Stunden ermittelt. Bei Kühlschranktemperatur blieb die Glukose über den gesamten Untersuchungszeitraum von 48 Stunden stabil (siehe Abb. 4.23 und 4.24). Dies spiegelt sich auch im Fehlerbalken-Diagramm wieder, wo ein stabiler Verlauf der Mittelwerte mit Standardabweichungen von 2,82 - 3,38% für Serum und 2,31 - 4,16% für NaF-Plasma zu sehen ist (siehe Abb. 4.25). Die erhöhte Standardabweichung von 7,32% 24 Stunden nach der Blutentnahme im abzentrifugierten NaF-Plasma, das gekühlt transportiert wurde, ergab sich aus einem einzigen stark abweichenden Wert zu diesem Zeitpunkt (siehe Abb. 4.24).

Dieses Ergebnis deckt sich mit dem von GRÜNDER (1991), der für Glukose im bovinen Serum eine Stabilität von 36 Stunden angibt. Im Gegensatz dazu wies VON BENTEN (1972) einen geringgradigen Anstieg der Glukose im bovinen Serum nach, lieferte jedoch keinen Erklärungsansatz dafür. Bei anderen Spezies wurden noch längere Stabilitäten für die Glukose im Serum ermittelt. So blieb sie beim Kamel sechs Tage bei 4-5°C und drei Tage bei 23-25°C (SAEED et al., 1995), beim Schaf sieben Tage bei 4°C (MORRIS et al., 2002) und beim Hund drei Tage bei Raumtemperatur (THORESEN et al., 1992) stabil.

Es existieren bisher keine ähnlichen Studien zur Stabilitätsermittlung von Glukose im NaF/KOx-Plasma. In der vorliegenden Studie wurde das Plasma aus den NaF/KOx-Röhrchen auf Grund des fehlenden Trenngels nach dem Zentrifugieren in Röhrchen ohne Zusätze dekantiert. Diese Studie zeigt, dass die gleichen konstanten Ergebnisse mit ähnlicher Variation der Werte (siehe oben) in zentrifugierten Serum-Röhrchen, wo das Serum auf dem Trenngel stehen bleiben kann, erzielt werden können wie im abzentrifugierten NaF-Plasma, bei dem die Verwendung von Sekundärgefäßen für den Transport notwendig wird.

Beim Vergleich der Ergebnisse im NaF-Vollblut (siehe Kapitel 5.5.3) mit den erzielten Ergebnissen aus zentrifugierten Serum-Röhrchen zeigte sich, dass die Variation der Glukose-Werte in den NaF-Proben, die nicht zentrifugiert wurden, mit 7,95 - 12,53% (siehe Abb. 4.25) wesentlich höher lag als in den zentrifugierten Serum-Röhrchen (2,82 - 3,38%). Dies lässt den Einsatz von Serum-Röhrchen für die Glukosebestimmung sinnvoller erscheinen, wenn eine Zentrifuge zur Verfügung steht und ein Zentrifugieren unmittelbar nach der Blutentnahme möglich ist. Auch andere Studien zeigten, dass Röhrchen mit dem Zusatz von NaF zur Glukosebestimmung nur geeignet sind, wenn eine unmittelbare Serumgewinnung nicht möglich ist (GELFERT und STAUFENBIEL, 1998; WARING et al., 2007).

Bilirubin:

Bilirubin verhielt sich in zentrifugierten Proben bei Raumtemperatur über zwölf Stunden und bei Kühlschranktemperatur über 36 Stunden stabil. Innerhalb des festgelegten Grenzbereiches von $\pm 15\%$ Differenz vom Ausgangswert konnte ein variabler Verlauf bei beiden Temperaturen beobachtet werden, wobei nur wenige Werte außerhalb des Grenzbereiches lagen (siehe Abb. 4.7). Diese abweichenden Werte ergaben jedoch nach den Festlegungen dieser Studie die geringe Stabilität von zwölf Stunden bei Raumtemperatur (siehe Kapitel 3.3.1.4). Im Fehlerbalken-Diagramm zeigt sich, dass die Konzentration von Bilirubin im Serum, das auf Trenngel bei Kühlschrank- oder Raumtemperatur gelagert wurde, im Mittel abfiel (siehe Abb. 4.8). Die Variation der Werte aus Abbildung 4.7 spiegelt sich hier durch die Länge der Fehlerbalken wieder. Die Werte streuen bei beiden Temperaturen zwischen 3,87% und 9,51% um den jeweiligen Mittelwert.

Die Variation der Bilirubingehalte könnte analytisch bedingt sein, da der Analyse-VK mit 7,22% im Vergleich sehr hoch war. Als Analyseverfahren wurde die Diazo-Methode nach Malloy-Evelyn angewendet, bei der Methanol als Akzelerator genutzt wird (siehe Kapitel 2.4.4). Methanol ist bekannt für seine Interferenz mit Hämoglobin und die Ausfällung von Proteinen und damit einhergehenden Trübung des Serums (HIGGINS et al., 2006). Eine Trübung stört bei der photometrischen Analyse, so dass dies eine Ursache für die variierenden

Bilirubingehalte in der vorliegenden Studie sein könnte. Zusätzlich übt Methanol durch sein „Alter“ Einfluss auf das Absorptionsvermögen des gebildeten Azofarbstoffs aus, da dieses mit zunehmendem Alter des Alkohols sinkt (DOUMAS et al., 1973). Da die Proben in einem Routinelabor untersucht wurden, ist leider nicht bekannt, wie oft die Reagenzien und damit auch Methanol über die Studiendauer hinweg im Analysegerät erneuert wurden. Auch dies kann die erhöhte Streuung der Bilirubingehalte im Serum erklären.

Eine ähnliche Stabilität wie in der vorliegenden Studie gab auch GRÜNDER (1991) mit 18 Stunden für bovines Serum, das bei 4°C gelagert wird, an. Der ermittelte durchschnittliche Abfall des Bilirubingehaltes im Serum könnte auf Photooxidation zurückzuführen sein. Diese wird durch Licht ausgelöst und sorgt für einen Bilirubinabbau (VOIT, 1993; KRAFT und DÜRR, 2005c; THOMAS, 2005c; THALER et al., 2008). Bei Dunkelheit erhöht sich die Stabilität auf vier Tage (GRÜNDER, 1991). Eine komplette Dunkelheit war für die zentrifugierten Proben in der vorliegenden Studie jedoch nicht gegeben, da jede Probe für sieben Analysezeitpunkte genutzt wurde. Die Proben wurden zwar im dunklen Schrank bzw. Kühlschrank gelagert (siehe Kapitel 3.2.1), wurden jedoch zu jedem Analysezeitpunkt herausgenommen. Dabei waren die Proben einer nicht standardisierten Lichtexposition ausgesetzt, da das Serum auf dem Trenngel zuerst mit der Pipette vermischt wurde und dann die nötige Menge für das Analysegerät entnommen wurde. In der Studie von TASKER (1978) blieb Bilirubin im bovines Serum sogar zehn Tage stabil, wobei kein Hinweis auf die Art oder Menge der Lichtexposition der Proben gegeben wird. Im humanen Serum wurde ein lichtinduzierter Abfall der Bilirubin-konzentration erst nach 48 Stunden (KELLER, 1975) bzw. drei Tagen (HEINS et al., 1995) beobachtet. Dies könnten speziesspezifische Unterschiede sein, da auch im caninen Serum (THORESEN et al., 1992) und equinem Heparin-Plasma (LINDNER, 1991) von einer mehrtägigen Stabilität berichtet wird.

β-Hydroxy-Buttersäure (BHBS):

Für die BHBS wurde in den zentrifugierten Blutproben bei beiden Temperaturen eine Stabilität über acht Stunden ermittelt. Das relative Verhalten über die Zeit hinweg zeigt, dass die BHBS-Werte zwar variieren, jedoch innerhalb der untersuchten 48 Stunden nur wenig abweichende Werte außerhalb des festgelegten Grenzbereiches lagen (siehe Abb. 4.27). Diese abweichenden Werte sind die Ursache für die Ermittlung der geringen Stabilität (siehe Kapitel 3.3.1.4). Im Fehlerbalken-Diagramm äußert sich dies durch ein im Mittel stabiles Verhalten, da die Mittelwerte alle zwischen -1,27% und 4,28% Differenz vom Ausgangswert lagen (siehe Abb. 4.28). Die Länge der Fehlerbalken zeigt jedoch eine erhöhte Streuung der Werte an. Im Gegensatz zu dieser Studie konnten STOKOL und NYDAM (2005) im bovines Serum eine Stabilität von 72 Stunden ermitteln. Dieses abweichende Ergebnis könnte mit der Festlegung des Grenzwertes bei 10% Differenz vom Ausgangswert in der vorliegenden Studie zusammenhängen, die unter anderem nach klinischen Gesichtspunkten erfolgte (siehe Kapitel 3.3.1.3). Des Weiteren wurden hier auch kranke Rinder verwendet und es bleibt unklar, ob sich die BHBS bei erhöhten Konzentrationen im Blut über die Zeit hinweg verglichen mit dem Blut von gesunden Rindern ähnlich verhält. Auch die Dauer der Gerinnungszeit bis zur Zentrifugation und damit die Lagerungszeit als Vollblut könnte eine Rolle spielen. Darauf wird jedoch bei STOKOL und NYDAM (2005) nicht eingegangen. In der Hu-

manmedizin wurden für die BHBS im Serum stabile Ergebnisse erzielt (FRITZSCHE et al., 2001; SACKS et al., 2002; THOMAS, 2005a).

Glutamat-Dehydrogenase (GLDH):

Dieses Enzym unterlag ähnlich wie in den unzentrifugierten Proben auch in den zentrifugierten Blutproben bei beiden Transporttemperaturen starken Schwankungen, wodurch der festgelegte Grenzwert von 20% maximal vertretbarer Abweichung frühzeitig überschritten und eine Stabilität von vier Stunden ermittelt wurde (siehe Abb. 4.5). Im Fehlerbalken-Diagramm wird deutlich, dass die GLDH in den Blutproben unabhängig vom Transportzustand eine erhöhte Streuung um ihren jeweiligen Mittelwert aufweist (siehe Abb. 4.6). In der Humanmedizin ist die GLDH bekannt für ihre Instabilität (SCHMIDT und SCHMIDT, 1963; SCHMIDT et al., 1992; THOMAS, 2005d). In der vorliegenden Studie wurden jedoch Proben verwendet, die zentrifugiert wurden und in denen dann das Serum auf dem Trenngel zur Lagerung belassen wurde. Diese Proben wurden zu sieben unterschiedlichen Zeiten analysiert, so dass die ermittelten Aktivitätsschwankungen nur schwer erklärbar sind. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis konnte VOIT (1993) bei der Lagerung von humanem Serum auf dem Trenngel keine Veränderung der GLDH-Aktivität nachweisen. KLOENE (1974) konnte im bovinen Serum konform gehend mit dem Ergebnis der vorliegenden Studie starke Aktivitätsschwankungen nachweisen und erklärte dies mit biochemischen oder physikalischen Reaktionsabläufen im Serum. Die Analytik kommt als Ursache für die Aktivitätsschwankungen nicht in Frage, da der Analyse-VK mit 0,79% sehr niedrig lag. Denkbar wäre jedoch eine fehlende Gleichmäßigkeit im methodischen Vorgehen. So stand das Serum während der Lagerung über 48 Stunden auf dem Trenngel, wodurch sich im Serum auf Grund der unterschiedlichen Molekularmassen der Parameter und der fehlenden Bewegung des Blutes Fraktionen bilden konnten (VOIT, 1993). Zur Analyse wurde aus diesem Serum die nötige Menge für das Analysegerät herauspipettiert, um die Proben weiterhin bei ihrer Lagerungstemperatur aufbewahren zu können. Möglicherweise erfolgte das Mischen des Serums vor der Analyse durch wiederholtes Ansaugen und Ausspritzen mit der Pipette zu den einzelnen Analysezeitpunkten in unterschiedlicher Qualität, wodurch gegebenenfalls Serumanteile mit einer nicht repräsentativen GLDH-Konzentration aspiriert und analysiert wurden. Dies könnte die starke Variation der Werte erklären.

Zusammenfassend zeigte sich vor allem für die Parameter AST, γ -GT, Cholesterin, Gesamteiweiß, Natrium, Kalium, Kalzium, anorganisches Phosphat, Glukose im Serum und NEFA die gute Funktionsfähigkeit des Trenngels. Einige dieser Parameter hatten im Vollblut durch das Vorhandensein der Blutzellen bei der Lagerung Konzentrationsänderungen erfahren (siehe Kapitel 5.5.3), die nun nicht mehr zu sehen waren. Auch in anderen Studien wurde ein guter Trengeffekt nachgewiesen (LAESSIG et al., 1976b + 1976c; VOIT, 1993; O'KEANE und CUNNINGHAM, 2006). Für die anderen Parameter wurden weniger stabile Ergebnisse auf Grund von analytischen Problemen (Bilirubin) oder deren Instabilität (GLDH) erzielt.

5.6 Schlussfolgerungen

Da im Rahmen der Stoffwechselfeldiagnostik routinemäßig größere Mengen an Blutproben an Laboratorien versendet werden, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Effekt von nicht-standardisiertem Vorgehen innerhalb der Präanalytik auf ausgewählte Parameter des Stoffwechselprofils im Rinderblut untersucht. Hierbei wurde der Einfluss durch die Wahl des Blutentnahmesystems und durch den Transportzustand der Proben näher betrachtet. Aus diesen Ergebnissen wurden folgende Rahmenbedingungen für den *ex vivo*-Umgang mit Blutproben des Rindes abgeleitet:

1. Vor der Blutentnahme sollte mit dem kooperierenden Labor abgeklärt werden, welches Blutentnahmesystem für die Festlegung der Referenzwerte verwendet wurde, um dieses System ebenfalls für die Blutentnahme zu nutzen. Alternativ müssten neue Referenzwerte für das geplante Blutentnahmesystem etabliert werden (siehe Tabellen 4.14, 4.19 und 4.21).
2. Das Abzentrifugieren von Serum erhöht bei den meisten Parametern die Transportstabilität. Das Kühlen der Proben während des Transportes ist hingegen nur von untergeordneter Bedeutung (siehe Tabelle 4.18). Bei der Verwendung von Röhrchen mit Trenngel kann auf das Umpipettieren des Serums nach dem Zentrifugieren verzichtet werden, wodurch eine mögliche Kontamination der Probe oder des Personals vermieden wird.
3. Die Blutproben sollten so schnell wie möglich, am besten innerhalb von vier Stunden, zur Analyse gelangen (siehe Tabelle 4.17). Da die Stabilität der Blutparameter in den Proben abhängig von den Transportbedingungen variiert, sollte bei längerer Transportdauer auf die Analyse einiger Parameter wie z.B. Glukose, Kalium und AST im Vollblut und GLDH, Bilirubin und anorganisches Phosphat im Serum verzichtet werden bzw. deren Analysenergebnis vorsichtig gewertet werden. Generell sollte jedoch eine längere Transportdauer vermieden werden. Demnach sollten Probenentnahmen am Abend und vor dem Wochenende oder Feiertagen unterlassen werden.
4. Auf die Verwendung von Natrium-Fluorid-Röhrchen zur Glukose-Bestimmung sollte bei Verfügbarkeit einer Zentrifuge verzichtet werden, da mit abzentrifugiertem Serum stabilere Ergebnisse als mit unzentrifugierten Natrium-Fluorid-Proben erzielt werden. Für die Rinderpraxis wäre daher eine Zentrifuge, die mittels Adapter an die Autobatterie angeschlossen werden kann, hilfreich. Röhrchen mit dem Zusatz von Natrium-Fluorid als Antiglykolyt sollten für die Glukose-Bestimmung nur verwendet werden, wenn eine Zentrifugation direkt nach der Blutentnahme nicht möglich ist. Bei der Auswertung der Laborergebnisse ist jedoch zu beachten, dass die Glukosegehalte im Plasma aus Natrium-Fluorid-Proben einer höheren Streuung unterliegen (siehe Abbildung 4.25) und im Mittel um 0,202 mmol/l niedriger sind als im Serum (siehe Tabelle 4.14).

Zusätzlich zu den entwickelten Rahmenbedingungen für den *ex vivo*-Umgang mit Blutproben des Rindes wurden bei der Durchführung dieser Studie weitere Forschungslücken bzw. Mängel entdeckt:

1. Es fehlt eine standardisierte Vorgabe zur Methodik des Zentrifugierens von Rinderblutproben. Da eine solche Vorgabe bisher nicht existiert und in den einzelnen Studien zur Parameterstabilität im Rinderblut teilweise sehr unterschiedlich zentrifugiert wurde, wurde für diese Studie lediglich die klinische Erfahrung als Hintergrund für die gewählte Zentrifugationsmethodik gewählt. Dies entsprach auch der Methodik von STOKOL und NYDAM (2005) für die gewählten Trenngel-Röhrchen. Daher sollte geklärt werden, inwieweit sich die Zentrifugationsmethodik auf die Zellen und Parameter des Rinderblutes auswirkt, um standardisierte Vorgaben zu liefern. Diese Vorgaben sollten in einem Vielfachen der Erdbeschleunigung g unter Angabe der Zentrifugationsdauer und der Temperatur erfolgen. Auf diesem Wege wird eine Vergleichbarkeit mit ähnlichen Studien gewährleistet.
2. Die Angabe von Referenzbereichen für Blutparameter sollte mit dem Hinweis auf das verwendete Blutentnahmesystem erfolgen. Dies wird sowohl in Nachschlagewerken als auch auf Laborbefunden vermisst. Hilfreich wäre hierbei vor allem in Nachschlagewerken auch die Jahresangabe der Festlegung, um einen Hinweis auf deren Aktualität zu erhalten. Dies ist vor allem angesichts der fortschreitenden Weiterentwicklungen bei den Blutentnahmesystemen eine sinnvolle Angabe.
3. Auf den Laborbefunden sollten die aktuellen Analyse-Variationskoeffizienten für die einzelnen Parameter angegeben werden. Auf diesem Wege kann die Gefahr der diagnostischen Fehlinterpretation von Analyseresultaten minimiert werden, da der Praktiker einen Hinweis auf Parametergehalte erhält, die vorsichtig ausgewertet werden sollten. Des Weiteren wird so auch die angestrebte Qualitätsanforderung an Laboratorien befriedigt.
4. Da in der Lebensmittelindustrie die Loslösung von Acetaldehyd aus dem Kunststoff PET bereits nachgewiesen wurde (BFR, 2007) wäre eine gleichgerichtete Untersuchung in der Labormedizin von Interesse. Es könnte untersucht werden, inwiefern Acetaldehyd Auswirkungen auf die Konzentration von Blutparametern hat oder Interferenzen mit den Bestimmungsmethoden eingeht.
5. Bei der Interpretation der Ergebnisse ergab sich die Fragestellung, inwiefern der Leukozytengehalt in einer Blutprobe einen Einfluss auf die Stabilität von Parametern hat, die in Blutzellen in höheren Konzentrationen vorhanden sind als im Plasma. Es wurde davon ausgegangen, dass durch die erhöhte Glykolyserate bei Leukozytose (ZHANG et al., 1998; SACKS, 2006) der Glukoseverbrauch beschleunigt wird. Damit käme es in diesen Blutproben schneller zu einer Aufhebung der Membranstabilität und zur Zellyse, was zu einem Anstieg dieser Parameter im Serum führt. Die formulierte These, dass die AST-Aktivität bei Leukozytose im Serum schneller ansteigt als im Serum gesunder Patienten, ist bisher nicht bewiesen.