

2 Literatur

2.1 Zur Geschichte der Blutuntersuchung

Im antiken Griechenland entwickelte sich beginnend mit Hippokrates, zwischen etwa 450 und 300 v. Chr. die Viersäftelehre. Im System der klassischen Humoralpathologie vollziehen sich die grundlegenden normalen und krankhaften Lebensvorgänge in 4 Säften: Cholera (Feuer), Phlegma (Wasser), Melancholie (Erde) und Haima (Blut im engeren Sinne; Luft).

Als erste Methode der Blutuntersuchung ist die von Hippokrates beschriebene Beobachtung der Crusta phlogistica, d.h. der Speckhaut zu nennen. Aderlassblut wurde in Gefäßen aufgefangen, um zu beobachten, ob eine Speckhaut entsteht, was als schlechtes prognostisches Zeichen bewertet wurde. Die Untersuchung von Aderlassblut, auch Blutschau bzw. Hämoskopie oder Hämatoskopie genannt, auf Farbe und Beschaffenheit wurde von der Antike bis ins 16. Jahrhundert zur Diagnosestellung verwendet (Jean Fernel (1497–1558), Paris 1541: *De naturali parte medicinae*) (ROTHSCHUH, 1974). In der Neuzeit verwarf als erstes der Schweizer Arzt Paracelsus (1494–1541) die Viersäftelehre und die Humoralpathologie. Die Lehre der neuen Atomistik im Sinne von Demokrit und die Überzeugung, dass feste Teilchen die strukturellen und funktionellen Eigenarten der Lebensprozesse bestimmen, veranlassten Forscher wie Malpighi (1627/28–1694), Anatom in Bologna und Borrelli (1608–1679), Mathematiker und Astronom in Pisa, nach „Particulae“ im Blut zu suchen. Die folgenden neuen Erkenntnisse waren eng mit der Entwicklung und dem Fortschritt in der Mikroskopie verknüpft. Giovanni Alfonso Borrelli, ein Schüler Galileis, beobachtete 1656 im Chylus und Serum die später als „Lymphozyten“ bezeichneten weißen Blutkörperchen (DIEPGEN, 1949). Im Jahre 1666 gab Malpighi die Entdeckung der roten Blutkörperchen bekannt, welche Jan Swammerdam (1637–1680) schon 1658 gesehen hatte, ohne jedoch seine Beobachtungen zu veröffentlichen (ASCHOFF et al., 1960a). Die genaue Beschreibung der Gestalt und Größe roter Blutkörperchen lieferte der „Mikroskopiker“ Antony van Leeuwenhoek (1632–1723), ein Tuchhändler und Amateurwissenschaftler aus Delft im Jahre 1673 (ASCHOFF et al., 1960a; ROTHSCHUH, 1974).

Nach Entdeckung der roten Blutkörperchen dauerte es noch knapp 200 Jahre, bis 1842 durch Alfred Donné (1801–1878), Chefarzt der Charité-Klinik in Paris als dritter geformter Bestandteil des Blutes die Blutplättchen entdeckt wurden (ASCHOFF et al., 1960b).

Die erste quantitative Bestimmung der roten Blutkörperchen erfolgte im Jahre 1852 durch Karl Vierordt (1818–1884), Physiologe aus Tübingen. Bei dieser langwierigen Methode wurde ein bestimmtes Blutvolumen verdünnt, auf einem Objektträger ausgestrichen, mit einem Glasraster bedeckt und alle 4,6 bis 5,8 Millionen Zellen pro mm³ ausgezählt (VIERORDT, 1852). Bereits 1855 schlug der Holländer Cramer (1822–1855) eine Zählkammer bekannter Tiefe und mit Raster vor. 50 Jahre später wurde sie durch Bürker (1872–1957) verbessert und erhielt ihre noch heute übliche Ausstattung (Bürker-Kammer). 1924 publizierte Neubauer seine Netzeinteilung (LEUENBERGER, 1980). Eine direkte

Zählung war anfangs nur für die Erythrozyten möglich, die Leukozyten wurden relativ zu den Erythrozyten bestimmt. 1882 schlug Richard Thoma (1847–1923) vor, durch verdünnte Essigsäure die Erythrozyten bis auf wenige Fragmente aufzulösen, wodurch eine direkte Zählung der Leukozyten möglich wurde (BOSCHUNG, 1980). Versuche, die Plättchen im Blut zu zählen, schlugen aufgrund der großen Adhäsions- und Aggregationstendenz dieser Blutbestandteile jedoch über lange Zeit fehl. Erst die Entwicklung einer indirekten Zählmethode, dem Ausstrichverfahren nach Anton Fonio (1881 - 1968), welches 1912 veröffentlicht wurde, brachte ein bis heute brauchbares Zählverfahren (FONIO, 1912).

Zu Beginn der modernen Hämatologie benutzte man als Präparationstechnik für blutmorphologische Untersuchungen zuerst die Deckglasausstrichmethode, die Robert Koch (1843–1910) im Jahre 1877 beschrieb. 1896 führten die ungarischen Hämatologen Robert Jancsó (1868–1930) und Andreas Rosenberger (1847–1915) die Objektträgerausstrichmethode ein (JANSCÓ und ROSENBERGER, 1896). Es wurde anfangs nur Kapillarblut untersucht, welches mit Hilfe der von Karl Francke (1859–1920) beschriebenen „Schnäppernadel“ gewonnen wurde (FRANCKE, 1889). Nach Einführung der Venenpunktion durch den Berliner Internisten Ernst Grawitz (1860–1911) im Jahre 1902, arbeitete man mit venösem Blut. GRAWITZ beschrieb bereits 1902 die Blutentnahme aus der Vena jugularis bei Hund und Kaninchen. Als Fixiermethode für die Präparate verwendete Ehrlich (1877) die Hitze-fixation, welche aber bald von chemischen Fixationsmethoden abgelöst wurde. Giemsa benutzte seit 1904 die Methanolfixierung, welche heute fast ausschließlich verwendet wird. Die Fixierung war Voraussetzung für den Einzug der Farbe in die histologische Technik (BOROVICZÉNY, 1974).

Die erste Differenzierung der Leukozyten geschah durch Max Schultze (1825–1874) im Jahre 1865. Auf einem selbstkonstruierten heizbaren Objektisch beobachtete er die Leukozyten bei der Phagozytose von Milch und Farbstoffen und unterschied am Nativpräparat anhand von Größe und dem Vorhandensein grober und feiner Granula 5 Gruppen von „farblosen Zellen“ (BOROVICZÉNY, 1974). Die färberische Differenzierung des Blutausriches sowie die zugehörige Nomenklatur sind weitgehend Paul Ehrlichs Arbeit zu verdanken (FISCHER-HOMBERGER, 1975).

Der Hämatokrit wurde 1891 von Sven Gustav Hedin (1859–1933) erfunden. Er zentrifugierte Blut und bestimmte den Anteil, den die Erythrozyten am Gesamtvolumen einnehmen. Modifiziert wurde das Verfahren durch den Wiener Professor Gustav Gärtner (18551–937). Gärtner schlug eine Zentrifuge vor, die an der Tischkante befestigt wurde (BOSCHUNG, 1980).

1862 belegte Felix Hoppe-Seyler (1825–1895) mikrospektral-photometrisch, dass der Blutfarbstoff in den roten Blutkörperchen enthalten ist, und gab dem Farbstoff 1864 den Namen Hämoglobin. Mit konventionellen gewichtsanalytischen Techniken (Wägung des Eisenoxyds), durch Farbvergleich mit einer reinen Oxyhämoglobinlösung und schließlich mittels eines Spektralapparates bestimmte er den Gehalt an Oxyhämoglobin im Blut (HOPPE-SEYLER, 1883). Für den klinischen Gebrauch erfolgten die Bestimmungen des Blutfarbstoffes zunächst durch visuellen Vergleich anhand von Blutfleckenskalen [1854,

Blutfleckenskala nach Welcker (1822–1897) modifiziert von Tallquist (1871–1927)] und Blutverdünnungen, welche mit einem Standard verglichen wurden [(1854 Hämoglobinometer nach Ernst von Fleischl (1846–1891), 1879 Gowers-Hämometer, 1902 verbessert von Sahli (1856–1933)] (SAHLI, 1902). 1906 konstruierte Janos Plesch (18781–957), Professor für Innere Medizin in Berlin, das erste photoelektrische Kolorimeter für die Hämoglobinbestimmung (PLESCH, 1906). 1920 erfolgte die Einführung der Hämoglobinzyanidmethode in die Labormedizin (STADIE, 1920). 1965 wurde die photometrische Bestimmung des Hämoglobinzyanids vom International Committee for Standardisation in Haematology of the European Society of Haematology als Standardmethode vorgeschlagen (ICSH, 1965). Sie gilt seitdem als zuverlässigste und umfassendste Methode der Hämoglobinbestimmung, empfohlen von der WHO (World Health Organisation).

Da die Kammerzählung neben ihrer Personal- und Zeitintensität zudem mit Fehlern behaftet ist, konstruierte der Schwede Carl Langercrantz aus Upsala im Jahre 1948 einen photoelektrischen Apparat für die mikroskopische Zählung von Zellsuspensionen. Ein speziell entwickeltes Dunkelfeldsystem und ein Photomultiplier, dem ein Verstärker und ein mechanisches Zählgerät angeschlossen sind, ersetzen nun den Menschen. Dabei wird eine gewöhnliche Zählkammer abgesehen und die durch Zellen oder Zellteile entstehenden Lichtsignale verbucht. Der Apparat wurde für die Zählung menschlicher Erythrozyten und Hefezellen verwendet (LANGERCANTZ, 1948). Moldavon entwickelte bereits 1934 einen Zählautomaten mit Durchflussküvette, die im Focus eines Dunkelfeldkondensors angebracht war. Passierte ein Partikel die Küvette, leuchtete er kurz auf. Die so entstandenen Lichtimpulse wurden in Stromimpulse umgewandelt und gezählt (LEUENBERGER, 1980). Ebenfalls in den 40er-Jahren erfand Wallace Coulter das „Coulter-Prinzip“: die elektronische Zählung und Größenbestimmung mikroskopischer Partikel. 1956 wurde das Coulter Model A als erster nichtoptischer Blutkörperchenzählautomat zum Patent angemeldet. Sein Messprinzip ist die Impedanz- oder Widerstandsmessung. (COULTER, 1956).

Die ersten automatischen Blutzellzählgeräte erlaubten nur eine Erythrozyten- und Leukozytenzählung, wobei die Verdünnungen von Hand vorgenommen werden mussten (halbautomatisches Blutzellzählgerät). Die Entwicklung führte weiter zu vollautomatischen Blutzellzählgeräten, welche Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten und Hämoglobin bestimmen können. Die Blutverdünnung und die Reinigung zwischen den einzelnen Proben erfolgte automatisch, die Ergebnisse wurden ausgedruckt. In den 80er Jahren kamen Geräte zur automatischen Differenzierung auf den Markt, die sich der Technik der Digitalphotographie bedienen. Die durch eine Fernsehkamera mit Mikroskopanschluss erstellten Bilder der Blutausrüche wurden an einen Computer übertragen, dort analysiert und mit den gespeicherten Daten verschiedener normaler und abnormaler Zellen verglichen. Somit war eine Zählung und Klassifizierung der Zellen möglich (KRAUSE, 1994).

Moderne Blutzellzählgeräte berechnen und analysieren eine Vielzahl weiterer neuer Parameter und Indizes, liefern ein automatisches Differentialblutbild und ermöglichen über individuelle Software-Pakete eine regelrechte Kommunikation mit dem Anwender. Die Flut

von Analyseresultaten machte die Anwendung elektronischer Datenverarbeitung unumgänglich. Entwickelt für den humanmedizinischen Gebrauch, erfordert die Nutzung dieser Geräte in der Veterinärmedizin verschiedene Modifizierungen wie z.B. die Anpassung der Stromspannung. Während sich Firmen wie Coulter aus den eben genannten Gründen aus dem veterinärmedizinischen Sektor zurückzogen, wurde mit dem Mascot multispecies hematology system (CDC Technologies Inc., Oxford CT, USA) der erste automatische Blutzellanalyser speziell für den veterinärmedizinischen Gebrauch entwickelt (KNOLL, 2000).

2.2 Messmethoden moderner Hämatologiesysteme

In klinischen Laboratorien und zunehmend auch in größeren Praxen werden heute die Blutzellzählungen, mit Ausnahme der Leukozytendifferenzierung, fast ausschließlich mit elektronischen Zählgeräten vorgenommen. Zählkammern werden nur in Ausnahmefällen verwendet, wenn beispielsweise die Zellzahlen sehr niedrig sind und daher von den Zellautomaten nur unzuverlässig bestimmt werden können, oder zur Überprüfung markierter Ergebnisse.

Je nach Größe der Laboratorien und deren Anforderungen handelt es sich um einfache „Cellcounter“ bis hin zu hoch entwickelten Multispezies-Multiparameter-Analysegeräten, welche in der Lage sind, Informationen zu liefern, die bisher nur über die manuelle Differenzierung erhältlich waren. Allen gemeinsam ist, dass aus jeder Probe mehrere tausend Zellen analysiert werden, weshalb automatische Zellzählgeräte generell eine höhere Präzision und Richtigkeit aufweisen als manuelle Techniken (KNOLL, 2000).

Die wichtigsten Messprinzipien dieser modernen „Multiparameter-Hämatologiesysteme“ im tiermedizinischen Bereich sind die *Widerstands-* bzw. *Impedanzmessung*, die *Quantitative Buffy-Coat (QBC)-Analyse*, die *Streulicht-/Lichtabsorptions-Messung*, die *Zellfärbung* oder eine Kombination der genannten Methoden.

2.2 a Widerstands- oder Impedanzmessung

Das am weitesten verbreitete Prinzip ist die Impedanzmessung, auch Widerstandsmessung oder Coulter-Prinzip genannt (siehe Abbildung (Abb.) 2.1 aus Dörner, Klinische Chemie und Hämatologie) (DÖRNER, 1998a). Durch zwei mittels einer mikroskopisch kleinen Messöffnung verbundene Flüssigkeitsräume wird elektrischer Strom geleitet. Die hohe Verdichtung des elektrischen Feldes in dieser Messöffnung bewirkt beim Durchströmen eines Partikels einen Widerstandsimpuls – vorausgesetzt Partikel und Suspensionsmedium unterscheiden sich in ihrer elektrischen Leitfähigkeit. Blutzellen sind schlechte elektrische Leiter. Werden sie in einer Elektrolytlösung suspendiert und wird diese Blutverdünnung langsam durch die kapillare Öffnung gesaugt, so ändert sich der elektrische Widerstand bzw. die Leitfähigkeit bei jedem Durchtritt einer Blutzelle durch die Öffnung. Die Widerstandsänderung ist proportional zum Partikelvolumen. Um registriert zu werden, muss sie allerdings einen für jeden Zelltyp und jede Tierart festgesetzten Schwellenwert (Diskriminator) erst überschreiten.

Die elektrischen Impulse werden gemessen, und wenn sie sich im Messfenster zwischen dem oberen und unteren Diskriminator befinden, verstärkt und gezählt. In einem Arbeitsgang lassen sich dadurch volumetrisch kleine Thrombozyten und größere Erythrozyten zählen.

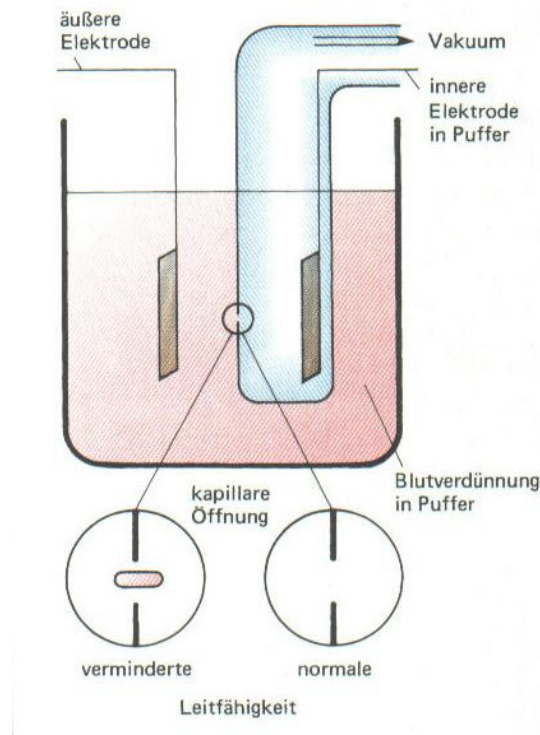


Abb. 2.1: Prinzip der Impedanzmessung modifiziert nach DÖRNER (1998)

Impedanzmessgeräte zählen die Anzahl der Zellen, messen gleichzeitig die Zellgröße und errechnen dann den Hämatokrit und weitere Parameter wie z.B. die Erythrozytenindizes. Die Leukozytenbestimmung erfolgt je nachdem, ob es sich um ein Einkanal- oder Zweikanalsystem handelt, nach bzw. gleichzeitig mit der Erythrozytenzählung, indem die Erythrozyten durch ein spezielles Reagenz lysiert worden sind. Der Hämoglobinwert wird als optische Dichte des lysierten Blutes mittels Photometereinheit ermittelt.

Automatische Erythrozytenzählungen nach dem Impedanzprinzip können von im Blut verteilten Partikeln ähnlicher Größe, hauptsächlich Thrombozyten, beeinflusst werden.

Sind Thrombozyten in der Erythrozytenzählung mit enthalten, ist die Erythrozytenzahl und der RDW (Red Cell Distribution Width) falsch hoch und der MCV (Mean Corpuscular Volume) falsch niedrig. Da die meisten automatischen Blutzellzählgeräte den Hämatokrit (HKT) als Produkt von MCV und Erythrozytenzahl errechnen, ist der Einfluss der falsch mitgezählten Thrombozyten auf den HKT sowie die Indizes, welche sich aus dem Hämatokrit errechnen (z.B. MCHC, Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration), unterschiedlich. Ein niedriges MCV und MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin) sowie ein hoher RDW täuschen das Bild einer mikrozytären Anämie vor, wie sie z.B. nach chronischem Blutverlust und Eisenmangel auftritt. Außerdem führt die Erythrozytenagglutination wie sie z.B. bei

immunhämolytischen Anämien zu finden ist, durch die verminderte Erythrozytenzahl zu einem falsch niedrigen Hämatokrit und einer falsch hohen MCHC. Werden kleine Erythrozyten mit zu den Thrombozyten gezählt, so fällt dies durch ein hohes MPV (Mean Platelet Volume) auf (GREEN, 1999). Weitere Nachteile von Impedanzmessgeräten sind die im Vergleich zu optisch-elektronischen Messungen hohe Koinzidenzwahrscheinlichkeit im elektrischen Feld der Messöffnung und der bei der Leukozytenzählung schlechtere Störabstand zwischen Signal- und Störimpulsen. Die zur Erythrozytolyse erforderlichen Reagenzien traumatisieren zeit- und konzentrationsabhängig auch die Leukozyten, deren Impulshöhe sich dadurch im Vergleich zu vitalen Leukozyten reduziert. Zur Zählung der Erythrozyten werden die Leukozyten nicht lysiert. Sie sind daher in der Erythrozytenzahl mit enthalten, was bei normalen Hämatokritwerten zu vernachlässigen ist. Probleme können jedoch entstehen, wenn eine hochgradige Anämie und extreme Leukozytose in einer Blutprobe zusammen auftreten. In diesem Falle können durch die große Anzahl der durch die Leukozyten verursachten Impulse falsch erhöhte Erythrozytenzahlen die Folge sein. Schließlich lassen sich Blutplättchenimpulse elektrisch nicht von Fragmenten der hämolysierten Erythrozyten abgrenzen (THOM, 1979).

Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Leukozytendifferenzierung ist die Kombination von Impedanzmessung und reagenzvermittelter Zellyse (MORITZ, 2002). Während die Diluentlösung (isotone Verdünnungslösung) die Zellmembranen schützt, hat das Lysereagenz je nach Zellart eine unterschiedliche Wirkung auf die Zytoplasmamembranen der Leukozyten: Die Zellvolumina werden unterschiedlich stark – teils bis auf den Kern – reduziert oder bleiben unverändert erhalten. Durch Volumenverteilungskurven lassen sich die Leukozyten nach tierartspezifischer Einstellung des Systems differenzieren.

Als Beispiel für diese Messmethode ist das Hämatologiesystem Vet ABC[®] (Fa. Scil Animal Care Company, Viernheim) zu nennen. Die Schwellenwerte der Zellgrößen sind dort für die einzelnen Tierarten auf so genannten Smart Cards gespeichert. Die entsprechende Karte muss vor jeder Probenanalyse durch das Gerät gelesen werden. Der Vet ABC[®] benutzt für die Trennung der Erythrozyten von den Thrombozyten weiterhin ein Impulssortiersystem, welches alle nicht thrombozyttypischen Signale von der Thrombozytenzählung ausschließt. Unklar ist dabei der Umgang mit den teilweise sehr großen Thrombozyten der Katze. Werden sie nicht mitgezählt, so ist von falsch niedrigen Ergebnissen auszugehen (KNOLL, 2000).

2.2 b Quantitative Buffy-Coat (QBC)-Analyse

Die in den frühen 80er-Jahren entwickelte Quantitative Buffy-Coat-Analyse beruht auf einer Auftrennung von Vollblut durch Zentrifugation anhand der Dichte der unterschiedlichen Blutzellen sowie durch die Fluoreszenz der Zellen nach spezifischer Färbung. In eine mit Fluoreszenzfarbstoff beschichtete Präzisionskapillare wird eine definierte Menge EDTA-Blut aufgesaugt. In der Kapillare befindet sich ein zylinderförmiger Schwimmkörper aus Kunststoff, dessen Außendurchmesser etwas geringer ist als der Innendurchmesser der Kapillare und dessen spezifisches Gewicht in etwa demjenigen der Buffy-Coat-Zellen

entspricht. Bei Zentrifugation werden die Buffy-Coat-Zellen zwischen Schwimmer und Kapillarwand gedrängt, was zu einer Streckung (Expansion) des Buffy Coats führt. Der Fluoreszenzfarbstoff Acridinorange bindet an Nucleinsäuren (DNA und RNA) und Glykosaminoglykane bzw. Lipoproteine der Leukozyten und Thrombozyten und dient der Differenzierung der verschiedenen Buffy-Coat-Schichten anhand der Fluoreszenz. Das ebenfalls im Röhrchen vorhandene Kaliumoxalat führt zu einer Erhöhung der Osmolarität des Plasmawassers, infolgedessen die Erythrozyten schrumpfen. Dadurch erhöht sich ihr spezifisches Gewicht, und sie sind somit von den Granulozyten besser abgrenzbar. Die Probe wird bei 12.000 Umdrehungen/min für 5 min zentrifugiert und die Schichtdicke der fluoreszierenden Zellpopulationen automatisch abgelesen (siehe Abb. 2.2). Die Intensität des Fluoreszenzsignals wird zusätzlich in Form einer Buffy-Coat-Profilkurve graphisch dargestellt. Schließlich errechnet sich aus der Eintauchtiefe des Schwimmkörpers in die dichtgepackten Erythrozyten die Hämoglobinkonzentration (WEGMANN et al., 1997).

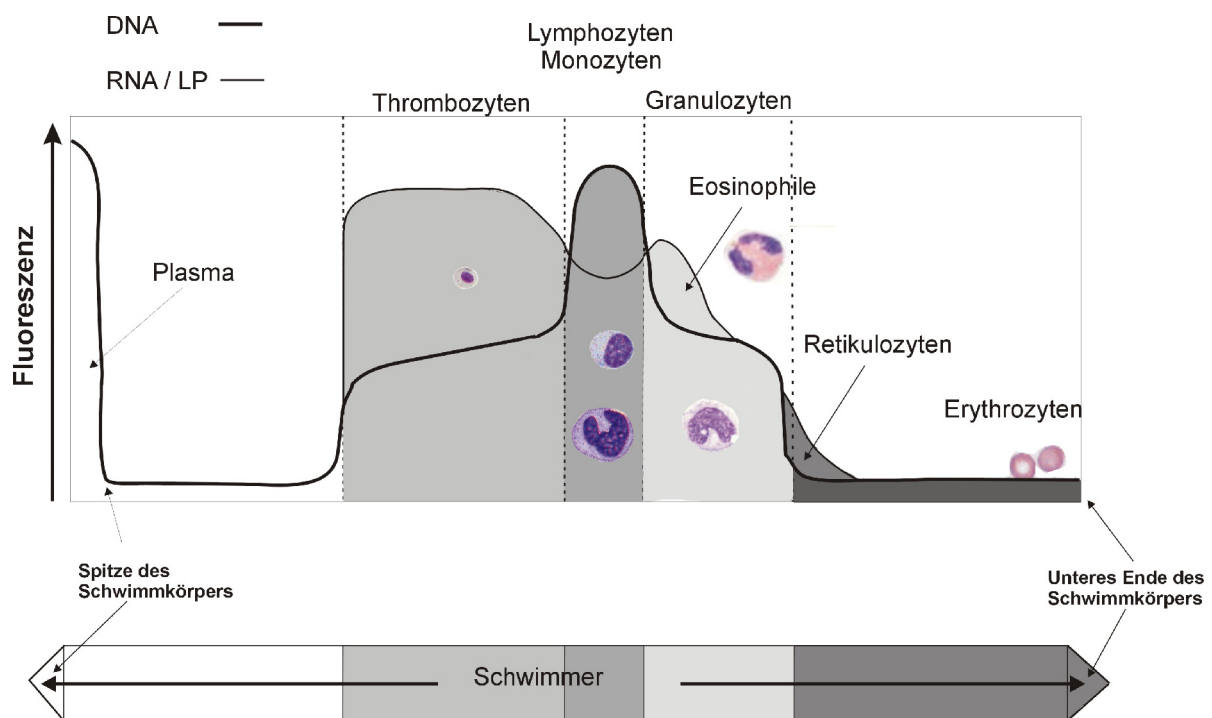


Abb. 2.2 : Buffy-Coat-Profilkurve modifiziert nach MORITZ (2002)

Ein Beispiel für diese Messtechnik in der Veterinärmedizin ist das QBC-Vet-Autoread-System (Fa. IDEXX GmbH, Wörrstadt). Als technisches Hauptproblem des QBC-Analysers wird die undeutliche Trennung zwischen der Erythrozyten- und der Granulozytenschicht vor allem bei Katzenblutproben genannt, was die Quantifizierung der Granulozytenpopulation verhindert (PAPASOULIOTIS et al., 1999). Das Gerät fällt in Studien durch einen hohen Prozentsatz an Fehlermeldungen auf, insbesondere bei Proben mit abnormer Leukozytenzahl (WEGMANN et al., 1997; BIENZLE et al., 2000). Abnorme Zellen werden nicht identifiziert, das Differentialblutbild wird als nicht vertrauenswürdig bezeichnet (BIENZLE et al., 2000). Am verlässlichsten arbeitet das QBC-Autoread-System mit Proben blutgesunder Tiere (KNOLL, 2000).

2.2 c Streulicht-/Lichtabsorptions-Messung

Eine andere Klasse automatischer Zellzählgeräte nutzt die Streulicht-/Lichtabsorptions-Messung (optoelektrisches Messprinzip). Dabei wird die von einer Zelle ausgelöste Streuung oder Schwächung eines schmal gebündelten Lichtstrahles, meist Laserlicht, bewertet. Im ersten Fall wird, wenn sich keine Zelle im Lichtstrahl befindet, das direkte auf die Zählküvette (Flowcell) fokussierte Licht hinter der Küvette durch eine schwarze Scheibe ausgeblendet und nur das von den Zellen gestreute Licht auf einen Photomultiplier geleitet, der den Lichtimpuls in einen elektrischen Impuls umwandelt und gleichzeitig verstärkt (siehe Abb. 2.3). Andere Geräte messen umgekehrt die von einer Zelle bewirkte Abschwächung bzw. Unterbrechung des Lichtstrahls.

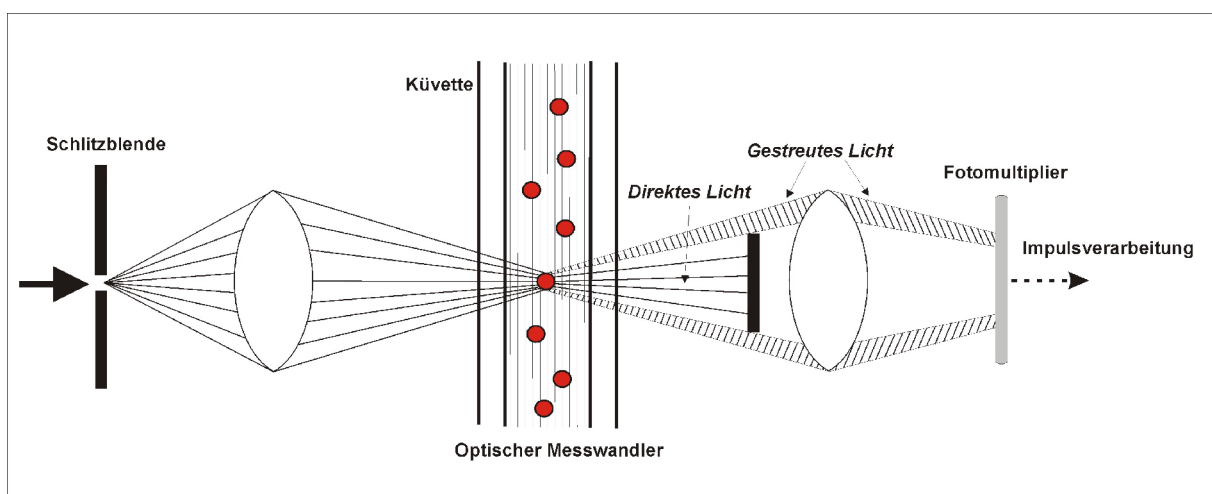


Abb. 2.3: Prinzip der Streulicht-Messung (optoelektrisches Messprinzip) nach THOM (1979)

In der modernen Laser-Durchflusszytometrie wird die Zellsuspension von partikelfreier Lösung ummantelt und als dünn ausgezogener, hydrodynamisch fokussierter Flüssigkeitsstrom durch die Küvette geleitet (THOM, 1979). Die Zellen durchqueren nacheinander den Laserstrahl und verursachen dabei Streulicht. Das in alle Richtungen fallende Gesamtstreulicht wird über Ring- und Aperturblenden in verschiedene Streulichtanteile isoliert. Die unter verschiedenen Winkelbereichen gemessenen Streulichtanteile beinhalten unterschiedliche Informationen über die Zellen bzw. Partikel. Die Vorwärtslichtstreuung bei 1° – 3° (Kleinwinkelstreulicht) ist ein relatives Maß für die Zellgröße. Die Vorwärtslichtstreuung bei 7° – 11° (Großwinkelstreulicht) ist ein relativer Indikator für die Zellstruktur und die Komplexität. Die orthogonale Lichtstreuung (70° – 110°) ist primär ein Maß für die Granularität („Körnigkeit“) und die Lobularität („Segmentkernigkeit“). Die depolarisierte 90° Lichtstreuung (70° – 110°) wird benutzt, um eosinophile Granulozyten von neutrophilen Granulozyten und anderen Zellen zu trennen. Die von den Zellen ausgehenden optischen Signale werden in elektrische Impulse umgewandelt, vom Rechner gespeichert und ausgewertet. Die Kombination der gewonnenen Informationen ermöglicht eine genauere Unterscheidung der Zellpopulationen. Somit ist beispielsweise eine Klassifikation der

Leukozyten in 5 verschiedene Zellarten möglich (ABBOTT-GMBH, 1999). Diese Methode eignet sich zur Zählung von Erythrozyten und Thrombozyten sowie für die Zählung und Differenzierung der Leukozyten. Die Ergebnissausgabe wird durch Streudiagramme und Histogramme ergänzt.

Als Beispielgerät für das optoelektrische Messprinzip ist das Hämatologiesystem CELL-DYN 3500 (Fa. Abbott, Wiesbaden) zu nennen, welches das Optoelektrische- mit dem Impedanzmessprinzip kombiniert. Der Vorteil des optoelektrischen Messprinzips ist die durch Ausblendung eines schmalen Lichtbündels kleine Messstrecke. Trotz höherer Konzentration der Zellsuspension ist die Koinzidenzwahrscheinlichkeit bei dieser Methode sehr gering. Weiterhin können bei der Leukozyten- und Thrombozytenzählung die Membranreste der Erythrozyten optisch problemlos und wesentlich wirksamer unterdrückt werden als elektrisch (THOM, 1979).

Dagegen stellt die asymmetrische bikonkave Form der Erythrozyten für optische Systeme ein Problem dar, da die Impulse je nachdem, wie sich die Zelle im Lichtstrahl ausrichtet, seitlich oder planar unterschiedlich hoch ausfallen (THOM, 1990). Um orientierungsbedingte Effekte in der optischen Messung auszuschließen, geht in modernen Hämatologiesystemen wie z.B. dem Technikon H*1 der Erythrozytenzählung eine Abkugelung der Zellen voraus (SEEGERS et al., 1995). Weiterhin kann in konventionellen optischen Systemen die Größenbestimmung der Zellen durch Änderungen der intrazellulären Hämoglobinkonzentration beeinträchtigt sein. Eine erhöhte Hämoglobinkonzentration führt zu einer reduzierten Verformbarkeit des Erythrozyten. Die Folge ist, dass bei Durchtritt des Erythrozyten durch die Messöffnung das Zellvolumen überschätzt wird (THOM, 1990).

Das Differentialblutbild dieses Gerätetyps ist nur mit Einschränkung zu betrachten. Probleme ergeben sich bei der Identifizierung der eosinophilen Granulozyten der Katze sowie der Monozyten bei Katze, Pferd und Rind (TVEDTEN und KORCAL, 1996; HENNESSY et al., 1998). Die Verlässlichkeit der Basophilenzählung bei Hunden und Katzen wird ebenfalls als fraglich gesehen (KNOLL, 2000).

2.2 d Optoelektrisches Messprinzip kombiniert mit Zellfärbung

Eine Kombination des optoelektrischen Messprinzips mit zytochemischen Methoden ist bei den automatischen Zellanalysegeräten der Fa. Bayer, dem H*1 und dem Folgemodell ADVIA 120 zu finden. Die Erythrozyten- bzw. Thrombozytenzählung und Größenbestimmung sowie die Hämoglobinbestimmung des Einzelerythrozyten erfolgt hier durch eine Doppelwinkel-Laser-Streulichtmessung (Helium-Neon-Laser) an isovolumetrisch gekugelten Zellen. Die Lichtstreuung wird in zwei sich nicht überschneidenden Abschnitten gemessen: einem Kleinwinkel 2° – 3° (Narrow Angle Scatter) und einem Großwinkel 5° – 15° (Wide Angle Scatter). So ergibt sich zumindest für die Erythrozyten ein zweidimensionales Zytogramm, welches Zellzahl, Zellgröße und Zellgranularität bzw. Zelldichte beschreibt. Da die Hämoglobinkonzentration linear mit dem Brechungsindex des Erythrozyten korreliert, kann für jeden einzelnen Erythrozyten Größe und Hämoglobinkonzentration direkt gemessen werden. Der daraus abgeleitete neue Parameter HDW (Hemoglobin Distribution Width),

errechnet aus der Standardabweichung der einzelnen zellulären Hämoglobinkonzentrationen, stellt einen neuen numerischen Index für Anisochromasie dar (ROSS und BENTLEY, 1986).

Der H*1 zählt und differenziert pro Messvorgang zwischen 5 000 und 15 000 Leukozyten. Die Leukozytenzählung und Differenzierung erfolgt im Peroxidase-Differenzierungskanal und im Basophilen-/Kernsegmentierungskanal. Im Peroxidasekanal werden zunächst die Erythrozyten lysiert und die Gesamtleukozytenkonzentration bestimmt. Nach Anfärbung der Leukozyten mit 4-Chloro-1-Naphtol und H_2O_2 werden sie anhand ihrer Größe (ermittelt aus dem Streulichtsignal) und ihrer unterschiedlichen endogenen Peroxidaseaktivität (ermittelt aus dem Absorptionssignal im Halogenlicht) differenziert (MORITZ, 2002). Im Basophilen-/Kernsegmentierungskanal wird das Zytoplasma von allen Zellen mit Ausnahme der lyseresistenten basophilen Granulozyten entfernt. Die Streulichtsignale im Laserlicht der verbliebenen Zellkerne und der basophilen Granulozyten werden erfasst und aufgrund der unterschiedlichen Zellkernform und Zellkernchromatindichte in polymorphkernige und mononukleäre unterteilt. Eine weitere Differenzierung erfolgt anhand der Größe. Das Basophilen-/Kernsegmentierungszytogramm erlaubt die Identifizierung von Blasten, unreifen Granulozyten und kernhaltigen Erythrozyten.

Der ADVIA 120, das verbesserte Nachfolgesystem des Technicon H*1, unterscheidet sich von seinem Vorgängermodell vor allem durch die präanalytische Zellpräparation, die nicht mehr in einzeln geführten Schläuchen, sondern mittels UFCTM Technologie durchgeführt wird, d.h. alle Proben- und Reagenzkanäle verlaufen in einem Acrylblock. Neu ist weiterhin die zweidimensionale (2-D)-Thrombozytenmessmethode, welche außer dem Volumensignal des Niedrigwinkelstreulichts auch in der Lage ist, für diese Zellart Klein- und Großwinkelstreulicht zu kombinieren (MORITZ, 2002). Diese 2D-Thrombozytenmessmethode zeigte in humanmedizinischen Studien selbst bei Blutproben von Patienten mit hochgradigen Thrombozytopenien hohe Korrelationen zur Referenzmethode (OLIVEIRA et al., 2003). Ein neuer daraus abgeleiteter Parameter, der MPC (Mean Platelet Component Concentration) in g/l, eine verbesserte Thrombozytenzählung und eine genauere MPV-Bestimmung sind die Folge. Der MPC, der die Thrombozytendichte angibt, gilt als nützlicher Parameter bei Untersuchung des Thrombozytenaktivierungsstatus (VAN OOST et al., 1982; CHAPMAN et al., 2003). Unterschiedliche Thrombozytenpopulationen sind anhand ihrer Dichte gut zu unterscheiden. Der neue Parameter PCDW (Platelet Component Distribution Width), die Verteilungsbreite der Thrombozytendichte, dient als Qualitätsindikator bei der Überprüfung von zur Transfusion bestimmten Blutplättchen auf deren Vitalität und Lagerungsschäden (LIM und HYUN, 2003). Auf weitere neue ADVIA-120-spezifische Parameter soll hier im Einzelnen nicht eingegangen werden. Neben der verbesserten Thrombozytenzählung wurde mit dem ADVIA 120 eine tierartspezifische automatische Retikulozytenzählung mit Subklassifikation in unterschiedliche Retikulozytenreifungsstufen eingeführt. Die ribosomale RNA der Retikulozyten wird mit dem spezifischen Chromogen Oxazin 750 angefärbt und nach Anregung durch Laserlicht die Fluoreszenz der Zellen im Durchflusszytometer gemessen, wodurch eine Trennung von den nichtgefärbten Erythrozyten sowie eine Subklassifizierung möglich ist. Innerhalb der Retikulozytenanalytik

kann durch Zählung und Differenzierung der ungefärbten und unlysierten Leukozyten in einer hohen Verdünnungsstufe auch für die Katze die Zahl der eosinophilen Granulozyten durch Erfassung des Streulichts und der Absorption im Laserlicht bestimmt werden (MORITZ, 2002). Die Stärke des kombiniert optoelektrisch-zytochemischen Messverfahrens liegt in der Erkennung abnormaler Zellen sowohl der Erythrozyten als auch der Leukozyten.

2.2 e Hämoglobinbestimmung und spezielle Differenzierungsautomaten

Die Bestimmung des Gesamthämoglobingehaltes erfolgt üblicherweise nach der Cyanohämoglobinmethode. Nach Lyse der Erythrozyten wird das freigesetzte Hämoglobin (Fe^{2+}) zu Hämiglobin (Fe^{3+}) oxidiert, welches in einer zweiten Reaktion mit Kaliumcyanid das Hämiglobincyanid bildet. Hämiglobin hat ein breites Absorptionsspektrum bei 540 Nanometer (nm). Die photometrisch gemessene Absorption ist proportional zur Hämoglobinkonzentration (THOMAS, 1998a). Diese Art der quantitativen Hämoglobinbestimmung ist genormt unter DIN 58931 und wird vom International Committee for Standardisation in Hematology of the European Society of Hematology (ICSH) seit 1965 als Referenzmethode empfohlen (ICSH, 1965).

Während bei der standardisierten Hämoglobinbestimmung keine grundlegenden Veränderungen mehr stattfinden, wird auf dem Gebiet der Leukozytendifferenzierung konstant nach neuen verbesserten Methoden geforscht. So versucht man in der Humanmedizin erneut, die Vorteile der Computertechnologie mit denen der mikroskopischen Untersuchung von Objektträgern zu verbinden, was als Revival der automatischen Mikroskopie der 80er-Jahre gesehen werden kann. Geräte wie z.B. der DiffMaster™ Octavia (Fa. CellaVision AB, Lund, Schweden) arbeiten bei der Erkennung der Zellmorphologie mit einer Entscheidungslogik basierend auf künstlichen neuronalen Netzwerken (SWOLIN und SIMONSSON, 2003). Das Gerät unterteilt die Zellen in 15 Klassen. Die Ergebnisse der Klassifizierung und die Bilder der Zellen können auf einem Bildschirm aufgerufen werden. Der Anwender kann die Differenzierung überprüfen und die Zuordnung der einen oder anderen Zelle verändern. Für diese Untersucherkombination bestehend aus dem System und einem qualifizierten Blutmorphologen werden mit der manuellen Differenzierung gut korrelierende Ergebnisse angegeben (SWOLIN und SIMONSSON, 2003).

Dass die Entwicklungen aus der Humanmedizin aufgrund der besonderen Eigenschaften von Tierblut jedoch nicht unbedingt auf die Veterinärmedizin übertragbar sind, wird im folgenden Kapitel verdeutlicht.

2.3 Besonderheiten des Blutes der untersuchten Haustierarten im Hinblick auf die Analysefähigkeit durch automatische Blutzellzählgeräte

Nun ist bei den einzelnen Haustierarten aber nicht nur die Konzentration der einzelnen Blutzellarten unterschiedlich, sondern auch deren Morphologie.

Nichthumane Säugerblutzellen sind oft zu klein, um mit den Schwellenwerten von Analysesystemen, die auf den Menschen zugeschnitten sind, gemessen bzw. differenziert

werden zu können. Manche humanen Blutzellzählgeräte können *Erythrozyten* mit einem mittleren Erythrozytenvolumen (MCV) < 55 Femtoliter (fl) nicht korrekt zählen. Sie müssen für die Messung von Tierblut modifiziert werden. Das MCV des Menschen liegt bei 82 – 92 fl. Von den Haussäugetieren wird nur für den Hund ein MCV von über 60 fl angegeben, alle anderen Spezies liegen darunter. Über eine Erhöhung der Spannung an den Messöffnungen kann die scheinbare Größe der Blutzellen mancher Spezies verändert werden: Kleine Zellen erscheinen im Vergleich zu den fixierten Schwellenwerten der Geräte größer, bzw. die Schwellen werden im Verhältnis niedriger (WEISER, 1987). Die Schwellenwerte zur Trennung der einzelnen Zellarten können von Tierart zu Tierart und selbst von Individuum zu Individuum variieren. Von Vorteil sind daher Blutzellzählgeräte mit variablen Schwellenwerten, welche die Schwelle automatisch und individuell für die jeweilige Blutprobe in die Talsohle zwischen die Verteilungskurven zweier Populationen setzen. Sie bedürfen keiner tierartlichen Adaptation (KRAFT et al., 1999).

Für die *Leukozytenbestimmung* ist die unterschiedliche Lyseresistenz der Erythrozyten der einzelnen Tierarten von Bedeutung. So ist beispielsweise für Rinder- und Katzenblut ein stärkeres Lysereagens nötig, um die Erythrozyten zu zerstören (KNOLL, 2000). Außerdem verhalten sich die Leukozyten der einzelnen Haussäugetiere unterschiedlich in Bezug auf das Lysereagens, was ihre Bestimmung mit automatischen Blutzellzählgeräten erschwert. Hundeblut zeigt das kleinste mittlere Leukozytenvolumen in Diluent- und Lysereagens und ist somit am besten geeignet, um den Messöffnungsstrom für Leukozyten an neuen Geräten einzustellen. Die Einstellung anhand von Hundeblut scheint die Leukozytenbestimmung anderer Spezies nicht zu beeinflussen (WEISER, 1987). Wird Hundeblut mit einem nicht modifizierten Gerät analysiert, ergibt sich anhand der geringeren Leukozytengröße dieser Spezies im Vergleich zu humanen Leukozyten eine um 14% niedrigere Leukozytenzahl (WEISER, 1987). Die leukozytäre Zellpopulation zeichnet sich wie keine andere durch eine sehr hohe Variabilität der Zellen aus. Dies gilt für ein Individuum je nach Reaktionslage des Körpers genauso wie für tierartenspezifische Variationen in der Zellmorphologie. Die tierartenspezifische automatisierte Zelldifferenzierung kann daher als technisch schwieriger Teil der Hämatologiesysteme angesehen werden (MORITZ, 2002). Die automatische Leukozytendifferenzierung wird vor allem bei der Katze als problematisch betrachtet. Die eosinophilen Granulozyten der Katze werden nur ungenügend erkannt (LIEDL und HIRSCHBERGER, 1997). Feline eosinophile Granulozyten besitzen keine Peroxidaseaktivität und können somit von anderen Leukozyten anhand zytochemischer Methoden nicht unterschieden werden (JAIN, 1967; MORITZ, 2002). Falsch positive und falsch negative Ergebnisse kommen vor. Selbst der ADVIA 120, das neueste System der Fa. Bayer, welches die eosinophilen Granulozyten im Rahmen der Retikulozytenanalytik durch Streulicht- und Absorptionsmessung im Laserlicht bestimmt, überschätzt in Einzelfällen die Zahl feline eosinophiler Granulozyten (MORITZ, 2002). Oft bereiten Monozyten und basophile Granulozyten Probleme, während die automatische Zählung neutrophiler Granulozyten und Lymphozyten möglich ist (TVEDTEN und KORCAL, 1996). Die Zuverlässigkeit der Basophilenzählung beispielsweise des CELL-DYN 3500 für Hund und Katze ist unklar (KNOLL, 2000). Equine neutrophile Granulozyten haben zwei Arten von

Granula: peroxidase-positive Primärgranula und peroxidase-negative Sekundärgranula. Bei Auftreten von Entzündungskrankheiten nimmt die Intensität der Färbung dieser Granula zu, was als „toxische Granulation“ bezeichnet wird. Die intensive Färbung ist auf sulfatierte mukoide Substanzen zurückzuführen, die in den Granula der Neutrophilen gespeichert werden (KRAMER, 2000). Die Kerne toxischer neutrophiler Granulozyten zeigen ein weniger dichtes Chromatinmuster. Geräte, welche mit modernen optischen-zytochemischen Messmethoden arbeiten, können toxische Granulozyten anhand der Zytogramme identifizieren. Ein Beispiel hierfür ist das Basophilenzytogramm des Bayer H*1. Das normale Bild eines Basophilenzytogramms ähnelt einem Wurm: Den Kopf stellen die mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) dar, der lang gestreckte Körper wird von neutrophilen Granulozyten gebildet. Die Tendenz der toxisch veränderten neutrophilen Granulozyten, im Zytogramm anstelle des normalen lang gezogenen „Wurmkörpers“, einen „toxischen Ball“ als Ansammlung von Zellen nahe bei der mononukleären Fraktion zu zeigen, ist bei der Tierart Pferd besonders ausgeprägt und diagnostisch wertvoll (TVEDTEN et al., 2000). Die Beflagung bei der Analyse von Tierblut ist oft nicht zuverlässig anwendbar, da die Beflagungskriterien häufig nur für eine Spezies (Mensch) einstellbar sind. Beispiel ist der Technicon H*1, Version 3,0 von 1992. Daher ist eine graphische Darstellung zur Plausibilitätsprüfung des Differenzierungsergebnis wichtig (MORITZ, 2002).

Die von automatischen Blutzellzählgeräten ermittelten *Hämatokritwerte* müssen ebenfalls tierartspezifisch anhand der Mikrohämatokritmethode kalibriert werden. Je nach Größe der Erythrozyten ist die zwischen den Zellen eingeschlossene Plasmamenge unterschiedlich groß, was bei der Kalkulation des Hämatokrit (HKT) durch die Geräte berücksichtigt werden muss (KRAFT et al., 1999). Weiterhin wird empfohlen, bei der Bestimmung der Richtigkeit der Erythrozytenzählung und Größenbestimmung immer die direkt gemessenen Parameter zu betrachten, also das MCV (Mean Corpuscular Volume) und die Erythrozytenzahl. Wird nur der HKT betrachtet, können zusammen auftretende Fehleinschätzungen von beispielsweise einem zu hohen MCV und einer zu niedrigen Erythrozytenzahl übersehen werden (WEISER, 1987).

Die *Erythrozyten* von Pferden variieren in der Größe physiologischerweise stärker als die anderer Haussäugetiere. Der RDW (Red Cell Distribution Width) des Pferdes reicht von 14 bis 25 %. Equine Retikulozyten reifen im Knochenmark komplett bis zum Erythrozyten aus und haben daher als Indikator für eine beschleunigte Erythropoese keine Bedeutung. Pferdeblut, auch von gesunden Tieren, neigt zur Geldrollenbildung, über deren Ursache wenig bekannt ist. Erhöhter Fibrinogengehalt im Blut, unbekannte Plasmaproteine sowie Erythrozytenmembranfaktoren werden als mögliche Auslöser genannt (ALLEN, 1988; BASKURT et al., 1997). Die aufgrund der Geldrollenbildung erhöhte Sedimentationsrate macht ein gründliches Durchmischen der Blutprobe vor Entnahme eines Aliquots zur Untersuchung gerade bei Pferdeblut unerlässlich (KRAMER, 2000). Die Erythrozytenaggregation als physiologischer und reversibler Prozess in fließendem Blut ist beeinflussbar durch Erhöhen oder Erniedrigen der auf die Erythrozyten einwirkenden Scherkräfte (QUIN et al., 1998). Die Erythrozytenaggregation korreliert positiv mit der Blutviskosität, die Korrelation mit dem Hämatokrit ist jedoch negativ (ALLEN, 1988).

Die erythrozytäre Sedimentationsrate ist geringer in Blutproben, welche Echinozyten enthalten, was auf eine reduzierte Interaktion zwischen den Zellen zurückgeführt wird (WEISS et al., 1994). Echinozyten sind morgensternartig geformte Erythrozyten und kommen bei Pferden unter anderem in Verbindung mit Diuretikagabe, bei Elektrolytmangel, insbesondere Natriummangel sowie längerem Ausdauertraining vor (BOUCHER et al., 1981; WEISS et al., 1992; GEOR et al., 1993). Während für die Echinozytenbildung nach Ausdauertraining die Mobilisierung älterer, kleinerer Erythrozyten aus der Milz verantwortlich gemacht wird (BOUCHER et al., 1981), wird bei Elektrolytmangel bzw. bei durch Furosemid induziertem Natrium- und Kaliummangel ein „Austrocknen“ der Erythrozyten postuliert (WEISS et al., 1992).

Die Ergebnisse von Studien bezüglich der Veränderungen der automatisch erstellten Erythrozytenindizes bei Vorkommen von Echinozyten im Pferdeblut sind unterschiedlich. Einerseits wurde eine Abnahme des MCV und des MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin) um 11 % bzw. 10 % und Zunahme des MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration) um 9 % festgestellt (BOUCHER et al., 1981), in einer anderen Studie konnten Veränderungen in diesem Zusammenhang nicht gefunden werden (GEOR et al., 1993). Vermutet wird, dass durch Zugabe der Diluentflüssigkeit zu den Erythrozyten vor der Zählung eine rasche Rehydratation der Zellen stattfindet und somit sich auch deren Volumen dem osmotischen Druck der Diluentflüssigkeit wieder anpasst.

Während die Größe der *Thrombozyten* des Hundes im Durchschnitt 1/4 bis 1/2 der Größe der Erythrozyten beträgt und nur in Ausnahmefällen größer als letztgenannte ist (MEINKOTH et al., 2000), überschneiden sich bei der Katze die Größen der Thrombozyten und der Erythrozyten häufig (NORMAN et al., 2001). Dies führt vor allem bei Impedanzmessgeräten zu Problemen. Als Folge werden größere Thrombozyten von der Thrombozytenzählung ausgeschlossen und kleinere Erythrozyten von der Erythrozytenzählung. Dieser Fehler macht sich jedoch aufgrund der viel geringeren Anzahl an Thrombozyten im Vergleich zu den Erythrozyten nur bei den Thrombozyten bemerkbar. Ein zusätzliches Problem bei der Katze ist die In-Vitro-Aggregation von Thrombozyten, welche nicht nur bei Blutzellzählgeräten, die nach dem Impedanzprinzip arbeiten, sondern auch bei optischen Zellzählgeräten zu falsch niedrigen Thrombozytenzahlen führt (NORMAN et al., 2001). In verschiedenen Studien sind Angaben über die Häufigkeit des Vorkommens von Thrombozytenagglutination in Katzenblutproben zu finden. NORMAN et al. (2001) stellten bei mindestens 50 % aller im Zeitraum eines Jahres untersuchten Katzenblutproben Plättchenaggregate fest. MORITZ und HOFFMANN (1997) geben einen Anteil von 52 % aller normal abgenommenen Katzenblutproben an, und bei ZELMANOVIC und HETHERINGTON (1998) konnten in 66,6 % von 48 untersuchten Katzenblutproben Thrombozytenaggregation nachgewiesen werden. Im Rahmen der Evaluierung des ADVIA 120, eines Blutzellzähl- und Differenzierungsautomaten, welcher auch Vorkommen und Grad von Thrombozytenagglutinaten angibt, wurde von MORITZ (2002) aus 266 Katzenblutproben für 38 % geringgradige Agglutination und für 26 % hochgradige Agglutination festgestellt. In Übereinstimmung mit ZELMANOVIC und HETHERINGTON (1998) wurden nur ca. 1/3

(36 %) der feline Proben durch das Gerät als frei von Agglutination deklariert (MORITZ, 2002).

Die großen Thrombozyten der Katze (11 – 18 fl) sind metabolisch und funktionell aktiver und leichter stimulierbar (MORITZ UND HOFFMANN, 1997). Sie weisen einen höheren Serotoningehalt auf und zeigen als Serotoninantwort eine irreversible Aggregation mit Freisetzung von Granula (NORMAN et al., 2001). Zusätzlich erschweren bei der Katze das Temperament des Tieres und Größe des zu punktierenden Gefäßes die Blutentnahme. Aufregung und wiederholte Punktion führen zu vermehrter Ausschüttung von Aggregationsinduktoren (MORITZ UND HOFFMANN, 1997). Durch die Wahl des Natriumcitrats als Antigerinnungsmittel ist, zumindest zeitlich begrenzt auf bis zu 30 min nach der Blutentnahme, ein thrombozytenstabilisierender Effekt nutzbar. Citrat wirkt durch pH-Wert-Absenkung der Thrombozytenagglomeration entgegen. Unter Einfluss von EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure), welches mit freien Kalziumionen Chelatkomplexe bildet, verlieren die Thrombozyten nach 20 – 30 min ihre discoidale Form zu Gunsten einer sphäroiden Form und bilden Pseudopodien aus (MORITZ und HOFFMANN, 1997; CHAPMAN et al., 2003).

Vergleichende Untersuchungen der Thrombozytenaktivierung in Hundeblood, unter anderem mit Natriumcitrat oder EDTA als Antikoagulans, zeigten gute Ergebnisse bei EDTA-Verwendung, während bei der Verwendung von Citrat eine größere mittlere Fluoreszenzintensität auf Thrombozytenaktivierung hindeutete (MORITZ und WALCHECK, 2003). Beim Menschen ist die EDTA-induzierte Plättchenaggregation mit bis zu 1,9 % der untersuchten Blutproben die häufigste Ursache der Pseudothrombozytopenie (PTP). Weiterhin werden fehlerhafte Blutentnahme, zu geringe Mengen an Antikoagulans sowie unsachgemäße Lagerung genannt. Selten wird eine Satellitenbildung zwischen Thrombozyten und Leukozyten d.h. Thrombozyten lagern sich *in vitro* an die Oberfläche von neutrophilen Granulozyten an und werden deshalb nicht mitgezählt als Ursache genannt (RÖCKER et al., 2000).

Das häufige Vorkommen falsch niedriger Thrombozytenzahlen bei der automatischen Zählung von Katzenblut und die Tatsache, dass Katzen trotz Thrombozytopenie nur selten Blutungsneigung zeigen, führt dazu, dass wirkliche Thrombozytopenien bei der Katze leicht übersehen werden können (NORMAN et al., 2001). Ein weiteres Problem der feline PTP bei automatisch durchgeführten Blutzellzählungen ist die fehlerhafte Erhöhung anderer Zellarten, meist der Leukozyten. Thrombozytenaggregate werden anhand ihrer Größe von Impedanzmessgeräten als Leukozytenimpulse verbucht.

Die Thrombozytenkonzentrationen, die für Pferdeblut angegeben werden, gehören mit zu den niedrigsten unter den Säugetieren und können durch die auch beim Pferd vorkommende und bereits beschriebene EDTA-induzierte Pseudothrombozytopenie weiter falsch erniedrigt werden. Zur Abgrenzung von einer wirklichen Thrombozytopenie wird die Untersuchung eines Blutausstrichs sowie wiederholte Zählung mit Heparin als Antigerinnungsmittel empfohlen (HINCHCLIFF et al., 1993).

2.4 Beurteilung von Analyseergebnissen

Ein Analyseergebnis als solches ist noch kein Laborbefund und somit keine Grundlage für eine ärztliche Handlung. Der Weg zum Laborbefund beinhaltet eine fachgerechte Beurteilung des Analyseergebnisses auf verschiedenen Ebenen (BÜTTNER, 1991a). Zunächst erfolgt die *Betrachtung der präanalytischen Phase*. Sie beinhaltet die Vorbereitung des Patienten in Abhängigkeit von der Art der Untersuchung, den technischen Ablauf der Probenentnahme, den Probentransport, die Aufbewahrung bzw. Lagerung des Untersuchungsgutes, die Aufbereitung der Probe vor Analyse und die Kenntnis und Beachtung von Einflussgrößen und Störfaktoren (siehe Kap. 2.5).

Der nächste Teilschritt betrifft die *Beurteilung der Durchführung der Analyse* sowie die *Zuverlässigkeit der Analysemethoden* an sich. Dazu sind feste Kriterien der Leistungsfähigkeit, auch Zuverlässigkeitskriterien genannt, nötig, wie z.B. die Genauigkeit (als Überbegriff für Präzision und Richtigkeit), die Verschleppung („Carry-Over“), die analytische Drift, die Periodizität, die analytische Spezifität, die analytische Sensitivität, die Nachweisgrenze, die Linearität und die Robustheit. Durch Einführung der Qualitätssicherung (siehe Kap. 2.6) ist die analytische Zuverlässigkeit klinisch-chemischer Untersuchungen in den letzten Jahren entscheidend verbessert worden (STAMM und BÜTTNER, 1995a). Von besonderer Bedeutung für die Zuverlässigkeit eines Analyseergebnisses ist auch hier eine Prüfung auf Störgrößen, welche die Analytik beeinflussen und zu falschen Werten führen. Die analytische Beurteilung beinhaltet außerdem die Formalkontrolle. Der Vergleich des Patientennamens bzw. der Identifikationsnummer mit dem Untersuchungsauftrag, Kontrolle des Datums und der Uhrzeit der Probenentnahme vermeiden so genannte grobe Fehler wie Probenverwechslungen.

Bevor ein Befund das Labor verlässt, sollte eine *Plausibilitätsprüfung* erfolgen. Plausibilität ist die Glaubwürdigkeit oder Annehmbarkeit eines Analyseresultates unter allgemeinen biologischen oder medizinischen Gesichtspunkten. Extremwertkontrolle, Vorwertvergleich und Konstellationskontrolle sind Beispiele für Verfahren, die zur Plausibilitätskontrolle eingesetzt werden können (STAMM und BÜTTNER, 1995b).

Schließlich erfolgt die *medizinische Bewertung* durch den behandelnden Arzt. Die Befundinterpretation entspricht einer Gewichtung der Analyseergebnisse auf der Grundlage von ärztlicher Erfahrung, Kenntnis des Patienten, Verdachtsdiagnosen, Krankheitsverlauf und Befunden weiterer klinischer Untersuchungen (THOMAS, 1998b). Verfahrensweisen der medizinischen Bewertung sind die Transversalbeurteilung anhand von Referenzintervallen und die Longitudinalbeurteilung anhand vorheriger Daten des gleichen Patienten (Trendkontrolle). Eine Gefahr bei der Transversalbeurteilung sind die eng gesteckten Referenzwerte, welche anhand gesunder Probanden und unter strenger Kontrolle der Einfluss- und Störfaktoren erstellt werden und bei isoliert auftretenden Laborwerten außerhalb des Referenzbereiches einen Patienten leicht zum „Laborkranken“ werden lassen. Demgegenüber ist die Aussagekraft der Longitudinalbeurteilung durch die Präzision von Tag zu Tag der Analysemethode limitiert (DÖRNER, 1998b). Die Longitudinalbeurteilung bedarf identischer Bedingungen in der Präanalytik und Analytik sowie die Berücksichtigung weiterer

Einflussgrößen (siehe Kap. 2.5) (THOMAS, 1998b). Letztendlich ist zu beachten, dass der Blutstatus (Hämogramm) immer lediglich eine Momentaufnahme zum Zeitpunkt der Blutentnahme darstellt (NIEPAGE, 1989).

Die Brauchbarkeit des Laborbefundes für die Diagnose, die Differentialdiagnose, die Verlaufs- oder therapeutische Beurteilung ist die *Validität*. Die Validität einer Laboruntersuchung ist optimal, wenn alle Kranken unter oder oberhalb des Referenzbereichs liegen (hohe diagnostische Sensitivität) und alle Gesunden sich innerhalb der Referenzbereiche befinden (hohe diagnostische Spezifität) (THOMAS, 1998b). Von praktischer Bedeutung für den Arzt ist die wichtigere Frage, welcher Anteil der positiven Testergebnisse tatsächlich mit der gesuchten Krankheit einhergeht, d.h. der *positive prädiktive Wert*. Der *negative prädiktive Wert* sagt dementsprechend aus, wie sicher ein negatives Ergebnis einen Gesunden identifiziert (DÖRNER, 1998b). Zu beachten ist, dass der prädiktive Wert von der Krankheitsprävalenz abhängig ist. Der prädiktive Wert eines positiven Ergebnisses ist bei niedriger Prävalenz stets gering, auch wenn der Labortest eine hohe diagnostische Sensitivität und Spezifität hat. Ebenso wird der prädiktive Wert eines negativen Ergebnisses bei niedriger Krankheitsprävalenz immer hoch sein, auch wenn die diagnostische Sensitivität und Spezifität sowie seine Präzision schlecht sind (THOMAS, 1998b). Für die Praxis bedeutet dies, dass die Vorhersagekraft von Laborergebnissen unterschiedlich bewertet werden muss, je nachdem wo das Laborgerät steht: auf einer hämatologischen Station eines Krankenhauses, wo mit vielen pathologischen Blutproben zur rechnen ist, oder als Screeninggerät in der chirurgischen Notaufnahme.

Es wird daher gefordert, dass bei Prüfung eines Testverfahrens der Krankheitsgrad der Probanden der klinischen Situation entspricht, bei der das Testgerät eingesetzt werden soll, und das Referenzkollektiv für die betreffende klinische Situation differentialdiagnostisch relevant ist. Erst dann lässt sich die Effizienz eines Testverfahrens, d.h. der Anteil richtig positiv und richtig negativ Klassifizierter an der Gesamtzahl der Untersuchten wirklichkeitsnah beurteilen (DÖRNER, 1998b).

2.5 Einflussgrößen und Störfaktoren auf die Ergebnisse des Blutbildes

Dem vorhergehenden Kapitel ist zu entnehmen, dass bei der Beurteilung von Analyseergebnissen auf den verschiedensten Ebenen Einflussgrößen und Störfaktoren zu berücksichtigen sind. Einflussgrößen und Störfaktoren führen zu einer Verbreiterung des Referenzbereichs, was die Entscheidung im Grenzbereich zwischen normal und pathologisch unsicherer macht (WISSER, 1995a).

Einflussgrößen führen *in vivo* zu Veränderungen der klinisch-chemischen Kenngrößen im Untersuchungsgut. Sie sind immer patientenbezogen und unabhängig von der Spezifität der verwendeten Analyseverfahren. Als *Störfaktoren* werden alle Faktoren zusammengefasst, die *in vitro*, also nach Entnahme des Untersuchungsmaterials, das Ergebnis verändern (GUDER, 1980).

2.5.1 Einflussgrößen

Einflussgrößen werden in (1) unveränderliche unbeeinflussbare und (2) veränderliche beeinflussbare Einflussgrößen unterteilt

Zu den *unveränderlichen unbeeinflussbaren Einflussgrößen* gehören beispielsweise das Geschlecht, die Rasse und das Alter sowie Erbfaktoren. Beispielsweise betragen die Erythrozytenzahlen und Hämoglobinwerte neugeborener Hunde und Katzen etwa nur die Hälfte der Zahlen adulter Tiere. Ferner ist die Gesamtleukozytenzahl bei Welpen höher als bei erwachsenen Hunden, und junge Hunde weisen die Tendenz zur Lymphozytose auf (KRAFT et al., 1999). Generell sind die Erythrozyten junger Tiere eher kleiner als diejenigen erwachsener Tiere. Vor allem Kälbererythrozyten haben häufig einen MCV Wert von nur 30 fl, während für adlute Rinder ein MCV von 50 fl angegeben wird. Neugeborene dagegen haben Erythrozyten mindestens von der Größe erwachsener Tiere. (KERR, 2002c). Die japanischen Hunderassen Akita und Shiba Inu besitzen mikrozytäre Erythrozyten (TVEDTEN und WEISS, 1999b). Vollblutpferde weisen physiologisch höhere Erythrozytenzahlen auf und folglich auch höhere Hämoglobin- und Hämatokritwerte als Pferde anderer Rassen und zeigen die Tendenz zu einem höheren Anteil an Lymphozyten als an neutrophilen Granulozyten (KRAFT et al., 1999). Die nach Geschlechtern getrennte Angabe von Referenzwerten des kleinen Blutbildes bei Hund und Katze zeigt, analog zum Menschen, für weibliche Tiere niedrigere Erythrozyten-, Hämoglobin- und Hämatokritwerte (JACOBS et al., 2000). Die deutlichen rassespezifischen Unterschiede erschweren das Erstellen gültiger Referenzwerte für eine Tierart. Normwerte, die alle Populationsgruppen einschließen, sind oft zu weit gesteckt, um manche Krankheiten ausschließen zu können (TVEDTEN, 1981).

Veränderliche beeinflussbare Einflussgrößen spielen für die Diagnostik eine besondere Rolle, da sie Gegenstand von Standardisierungsbemühungen sind (GUDER, 1980). Besonders in der präanalytischen Phase, also bei Vorbereitung des Patienten auf die Probenentnahme, sind sie zu berücksichtigen. Einfluss auf die hämatologischen Untersuchungsergebnisse kann zum Beispiel der Lebensraum des Probanden haben. Die Auswirkung von einem längeren Aufenthalt in großer Höhe auf die Hämoglobinkonzentration und die Erythrozytenzahl ist bekannt. Trainierte Hunde und Pferde zeigen wesentlich höhere Hämatokritwerte. Liegt beispielsweise der Hämatokrit bei einem gut trainierten Pferd im unteren Normalwertbereich, so ist das Ergebnis als abnormal zu bewerten (TAYLOR und HILLYER, 1997). Im Freien gehaltene Hunde haben höhere Leukozytenzahlen als im Inneren von Gebäuden gehaltene Hunde (KRAFT et al., 1999). Die Ernährung spielt ebenso eine Rolle: Fettreiche Kost vor Blutentnahme führt zu lipämischem Plasma, das als Störfaktor die Analytik z.B. die photometrische Hämoglobinbestimmung erschwert (GUDER, 1980). Lipämie scheint zudem die Zellfragilität und somit eine Hämolyse zu fördern (KERR, 2002b). Lipämie mit daraus resultierendem falsch hohen Hämoglobinwert und Hämolyse (Zerstörung der Erythrozytenmembranen und Austritt des Hämoglobins ins Plasma) können zu falsch hohen MCHC-Werten führen (KERR, 2002c).

Körperliche Belastung oder Aufregung, fremde Umgebung und fremde Personen führen über erhöhte Kortisol- und Katecholaminspiegel im Blut und Erhöhung des Blutdrucks zu einer

Zunahme der Erythrozytenzahl und der Leukozytenzahl (physiologische Leukozytose) (KRAFT und DÜRR, 1999). Beim Pferd kommt durch die Kontraktion der Milz ein Ansteigen des Hämatokrits, der Erythrozytenzahl und des Hämoglobins bei körperlicher Belastung oder Nervosität hinzu (TAYLOR und HILLYER, 1997).

Medikamente und deren Metaboliten können sowohl als Einflussgröße sowie als Störfaktor wirksam werden. Ein Medikament wirkt als Einflussgröße, wenn es in die Regulation der gemessenen Kenngröße direkt oder indirekt eingreift (THOMAS, 1998b). So wirken sich beispielsweise Zytostatika direkt negativ auf die Leukozytenzahl aus. Medikamente als Störfaktoren können durch Interferenz bei der Photometrie, als Hemmstoffe durch Erzeugung von Trübungen und durch direkte Wechselwirkungen mit der analytischen Methode wirksam sein. Zum Beispiel stören Dextrane photometrische Messungen (Hämoglobin) durch Trübung (DÖRNER, 1998c). Für die Humanmedizin publiziert die American Association of Clinical Chemistry (AACC) in regelmäßigen Abständen eine Zusammenstellung der bekannten Wirkungen von Medikamenten auf analytische Methoden (YOUNG, 2000). Die Medikamentenwirkung auf klinische Labortests ist für die Tiermedizin nur unzureichend untersucht (JACOBS et al., 2000).

2.5.2 Störfaktoren

Störfaktoren werden ebenfalls in zwei Gruppen unterteilt: (1) Störfaktoren, welche die *Konzentration* der zu messenden Kenngröße *in vitro* verändern. Sie sind wie Einflussgrößen methodenunabhängig und können durch Standardisierung der präanalytischen Teilschritte verringert werden. Beispielhaft seien hier Transport- bzw. Lagerungstemperaturen unter dem Gefrierpunkt genannt, welche zu Hämolyse führen (THOMAS, 1998b). (2) Störfaktoren, welche das Messergebnis durch *Interferenz* mit der Analytik verändern, wie z.B. exogene Stoffe wie Schmutzpartikel, Bakterien, Hefen in der Blutprobe, die von Impedanzzellzählgeräten wie Blutzellen gezählt werden. Endogene Störfaktoren in diesem Zusammenhang sind beispielsweise eine extreme Leukozytose und Lipämie, welche den Hämoglobinwert durch Trübung erhöhen, sowie Kälteagglutinine in der Probe, wodurch die Erythrozytenzahlen zu niedrig und die Leukozytenzahlen zu hoch bestimmt werden. Das Auftreten von Kälteagglutininen ist nur an erhöhten und stark streuenden MCV (Mean Corpuscular Volume)-Werten erkennbar. Kryoglobuline, welche durch Präzipitation bei Zimmertemperatur erhöhte Leukozytenwerte vortäuschen, und Antikörper, die isoliert zu einer Agglutination der Thrombozyten im EDTA-Blut mit falsch niedrigen Thrombozytenzahlen als Resultat führen, sind weitere wichtige endogene Störfaktoren (WISSER, 1995a). Eine stark ausgeprägte Hyperglykämie kann bei elektronischen Zellzählgeräten falsch hohe MCV- und Hämatokritwerten bedingen. Als Ursache wird die erhöhte Plasmaosmolarität in hyperglykämischen Proben genannt. Im Blut ist die Glukosekonzentration zwischen Erythrozyten und Plasma im Gleichgewicht. Die Verdünnungslösung, die in den Automaten benutzt wird, ist jedoch mit dem Plasma hyperglykämischer Proben nicht isotonisch. Nach Zugabe der Verdünnungslösung führt der Abfall der Osmolarität im erythrozytenumgebenden Medium zu einem raschen Anschwellen

der Zellen. Als Folge steigt das MCV, während die MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration) sinkt und das MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin) sich nicht verändert (VAN DUJNHOFEN und TRESKES, 1996). Ein abnorm hohes MCHC-Ergebnis als solches ist unwahrscheinlich, da es hyperchrome Erythrozyten nicht gibt. Dennoch werden manchmal MCHC-Werte von über 40g/dl gemessen. Ursachen können Hämolyse, interferierende Substanzen wie z.B. bei lipämischem Plasma oder osmotisch verkleinerte Erythrozyten bei zu hoher EDTA-Konzentration in unzureichend gefüllten Probenröhrchen sein (KERR, 2002c).

2.5.3 Möglichkeiten zur Vermeidung negativer Einflussgrößen und Störfaktoren auf die Qualität der Blutprobe

Störfaktoren und Einflussgrößen sind vor allem bei *Probenentnahme*, *Transport*, *Aufbewahrung* und *Vorbereitung* der Probe für die Messung zu kennen und zu vermeiden. Das National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, Villanova, USA) gibt Richtlinien für die Humanmedizin aus (NCCLS-DOKUMENTE H1-A4, H3-A4 und H18-A2; vergl. Tab. 2.2). Darin sind die genaue Handhabung der Blutabnahme durch Venenpunktion, der Umgang mit den Blutproben sowie die Probenverarbeitung definiert.

Probenentnahme

Erste Fehler können bereits bei der *Wahl und Befüllung der Probengefäße* entstehen. Bei Tieren mit erwartungsgemäß kleinen Probenvolumen sollten dementsprechend kleine Probengefäße verwendet werden, um eine optimale Füllung des Gefäßes zu ermöglichen. Die Messergebnisse von Proben aus kleinen Probengefäßen der Pädiatrie mit 1 ml bzw. 0,5 ml Volumen sind jedoch deutlich ungenauer als diejenigen von Blut aus Röhrchen der Standardgrößen. Ursache sind Mischfehler, welche außerdem das Auftreten von Blutgerinnseln fördern. Deshalb sollten diese Größen ausschließlich für sehr kleine Patienten verwendet werden (KERR, 2002b). Eine suboptimale Füllung zu groß gewählter Gefäße führt wiederum zu einem falschen Mischungsverhältnis zwischen Antikoagulans und Blut. Im Falle von EDTA (Ethyldiamintetraacetat) sollte das Mischungsverhältnis ca. 1 mg EDTA/ml (THOM, 1990, WISSER, 1995a; KRAFT und DÜRR, 1999) betragen. Speziell für K₃-EDTA werden 1,4 mg/ml Blut (THOM, 1990) angegeben. Die Herstellerangaben (Fa. Sarstedt) für ein optimales Mischungsverhältnis für K₃-EDTA liegen bei 1,2 – 2 mg/ml Blut.

Zu hohe EDTA-Konzentrationen in ungenügend gefüllten EDTA-Röhrchen führen zu niedrigeren MCV (Mean Corpuscular Volume)- und Hämatokritwerten sowie erhöhten MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration)-Werten (GOOSSENS et al., 1991a; CHEN et al., 1999). Besonders für K₃-EDTA wird eine Volumenabnahme der Erythrozyten infolge einer Erhöhung des osmotischen Drucks und des pH-Wertes, zunehmend mit geringerem Füllungszustand des Röhrchens, angegeben (THOM, 1990). Weiterhin werden bei hohen K₃-EDTA-Konzentrationen merklich niedrigere Leukozytenwerte gemessen (GOOSSENS et al., 1991a). Umgekehrt reicht bei zu niedriger EDTA-Konzentration in überfüllten Röhrchen die

Ca-Bindungskapazität des EDTA möglicherweise nicht aus, und es kann zur Gerinnung des Blutes kommen (KERR, 2002b).

Venenstauung, Änderung der Körperlage vom Liegen zum Sitzen oder Stehen sowie *körperliche Aktivität und Aufregung* direkt vor Blutabnahme haben einen deutlichen Einfluss auf die Konzentration korpuskulärer Bestandteile im Blut. Sie erhöhen den hydrostatischen Druck (Blutdruck) und somit auch den Filtrationsdruck in den Kapillaren. Die Folge ist ein Austritt intravasaler Flüssigkeit und niedermolekularer Substanzen ins Interstitium, der zu einem Konzentrationsanstieg von Proteinen, proteingebundenen und korpuskulären Bestandteilen im Blut führt (DÖRNER, 1998c). Die Stauung sollte daher nur möglichst kurze Zeit andauern bzw. bei schwierigen Blutentnahmen intermittierend geschehen, die Blutentnahme sollte aus der Ruhe erfolgen und Stress vermieden werden. Für die Pädiatrie wird eine Ruhepause nach spätestens 3 – 5 min Festhalten gefordert, da sonst die Kombination aus Abwehr des Kindes und dem Versuch einer physischen Ruhighaltung zu Verfälschung der Blutwerte führen kann (JUNGE et al., 1978). Für verlängerte Venenstauung und Positionswechsel wird für die genannten Parameter ein Konzentrationsanstieg von 10 % und mehr angegeben (DÖRNER, 1998c). Dementsprechend führt der Blutdruckabfall während einer Allgemeinanästhesie durch die aus dem Interstitium in den Blutkreislauf eintretende Flüssigkeit zu Hämodilution.

Blutentnahme aus den Extremitätenvenen (Vena cephalica, Vena saphena) kann für Kleintiere gelegentlich einfacher sein. Eine Probenentnahme aus der *Jugularvene* ist jedoch der effektivste Weg, die Probenqualität zu verbessern. Es können bei geringer Hämolysegefahr in kurzer Zeit auch größere Mengen Blut entnommen werden. Empfohlen wird eine Nadel der Stärke 20 G L" (KERR, 2002b). Nach Punktion peripherer Venen sollte das Blut möglichst frei fließen, pumpende Bewegungen mit dem Gliedmaßenende sind zu unterlassen. Die Blutstropfen sollten nicht in das Gefäß hinein fallen, vielmehr an der Gefäßwand herunterfließen. Das Hineinspritzenlassen des Blutstrahles in das Probenröhrchen führt zu Zellschäden und damit zum Austritt von Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenbestandteilen (KRAFT und DÜRR, 1999). Zu langes Stauen, die Aspiration von paravenösem Blut nach Durchstechen der Vene sowie exzessiver Druck auf das Gewebe („Melken“) kann zu Hämolyse führen und muss daher vermieden werden (BÖHLER, 1992; THOMAS, 1998b). Hämolyse führt zu falsch niedrigen Erythrozytenzahlen und einem falsch niedrigen MCV, während die MCHC und der Hämoglobinwert relativ zum Hämatokrit steigen (MEYER et al., 1992). Als Hauptursache für Hämolyse wird der turbulente Blutfluss während der Probenentnahme genannt, wenn das Blut entweder zu schnell oder zu langsam durch die Nadel fließt (BELLAMY und OLEXON, 2000). Ein zu starkes Aspirieren mit der Entnahmespritze bzw. ein zu großer Unterdruck in vakuumierten Blutentnahmeröhrchen ist ebenfalls hämolysefördernd (THOMAS, 1998b). Die Blutentnahme mit Unterdruckgefäßen ist bei sehr kleinen Patienten generell schwierig (KRAFT und DÜRR, 1999; KERR, 2002b). Ein Abfließenlassen und Auffangen mit dem Gefäß ist hier vorzuziehen (KRAFT und DÜRR, 1999). Nachteil dieser „Open-Drop“-Technik ist der Zeitfaktor: (1) eine längere Venenstauung mit den bereits erwähnten Nachteilen, (2) die größere Zeitspanne bis das gefüllte Röhrchen verschlossen und geschwenkt werden kann, (3) Gerinnselbildung in

der Nadel, bevor die benötigte Blutmenge entnommen werden konnte. Eine Kontamination mit Schmutz oder Haaren lässt sich ebenfalls nicht ausschließen. Die Blutentnahme durch vorsichtige Aspiration mittels einer bereits das Antikoagulans enthaltenden Spritze z.B. „S-Monovette“ wird daher bevorzugt (KERR, 2002b). Die Blutentnahme aus zentralen oder peripheren Kathetern sollte grundsätzlich vermieden werden. Ist sie unumgänglich, so müssen zentrale Katheter vor der Blutentnahme mit 0,9%iger Kochsalzlösung gespült und das erste Blut verworfen werden (BÖHLER, 1992). Eine Blutentnahme aus ungenügend gereinigten Dauerkathetern, aus Infusionsschläuchen und aus Venen des gleichen Armes oberhalb des Infusionsschlauches kann zu Verdünnungen des Blutes durch Infusionslösungen führen (WISSER, 1995a).

Da die ersten Blutstropfen einen hohen Gehalt an Aggregationsinduktoren besitzen, sollten sie verworfen bzw. für die Plasma- oder Serumabnahme verwendet werden. Ein Vergleich der Thrombozytenzahlen in Katzenblut, welches mit großlumiger Kanüle nach herkömmlicher Methode (Ein-Spritzen-Technik) gewonnen wurde, mit Blut, das nach Verwerfen der ersten 5 ml gewonnen wurde (Zwei-Spritzentechnik) (WEISER und KOCIBA, 1984) ergab bei letztgenannter Methode doppelt so hohe Thrombozytenzahlen (MORITZ und HOFFMANN, 1997).

Des Weiteren ist ein *schonender Probentransport* zu gewährleisten. Das Hämolyserisiko durch exzessive Turbulenzen während des Transportes kann durch ein Vollen des Probenröhrchens bis zum Maximum vermindert werden (BELLAMY und OLEXON, 2000).

Probenaufbewahrung und Vorbereitung

Der *Einfluss der Lagerung* (Dauer und Temperatur) auf die Blutprobe wurde und wird immer wieder untersucht. Die Angaben für humane Blutproben stimmen in der Literatur relativ gut überein. Allgemeiner Konsens ist eine möglichst rasche Analyse der Probe.

Blutausstriche für die Leukozytendifferenzierung sollen spätestens nach 5 h durchgeführt werden (THOM, 1979). Alle anderen Zählungen sollten spätestens nach 24 h stattgefunden haben (Thom, 1979; WISSER, 1995b). Länger gelagerte Blutproben zeigen ein Absinken der Leukozyten- und noch stärker der Thrombozytenzahlen sowie Veränderungen im Differentialblutbild wie Hypersegmentierung von segmentkernigen Leukozyten (WISSER, 1995b). Die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration ist dagegen noch nach Tagen möglich, sofern beachtet wird, dass keine Plasmatrübung infolge bakterieller Verunreinigung stattgefunden hat (THOM, 1979; WISSER, 1995b). Über die geeignete Lagerungstemperatur gibt es unterschiedliche Untersuchungsergebnisse. Manche Autoren sprechen der Kühlung eine Verlängerung der Haltbarkeit des Blutes zu, ausgenommen die Thrombozyten, die bei 4 °C rascher zerfallen bzw. leichter Aggregate bilden (THOM, 1979). Andere Autoren halten eine Lagerung bei Kühlschranktemperatur (4 – 6°C), mit Ausnahme der Differentialblutbildbeurteilung, für kaum vorteilhaft (WISSER, 1995b). Wenn zytochemische Kriterien zur Beurteilung der Leukozyten herangezogen werden, ist für das Differentialblutbild die Aufbewahrung bei 4 – 6°C vorzuziehen (WISSER, 1995b). Lagerungsstudien bei Raumtemperatur ergaben einen signifikanten Hämatokrit- und MCV (Mean Corpuscular

Volume)-Anstieg sowie einen Abfall der neutrophilen Granulozytenzahl in einem Zeitraum zwischen 1 h, 8 h und 12 h (CHEN et al., 1999).

In der Tiermedizin wird mit wenigen Ausnahmen eine *Kühlung der Proben* empfohlen. Allgemein wird die Haltbarkeit des Blutes für hämatologische Untersuchungen bei 4 °C mit 36 h angegeben. Proben, die älter sind als 3 Tage, sind in der Regel unbrauchbar. Ein Absinken der Thrombozytenzahlen und ein Anschwellen der Erythrozyten analog zum Menschen ist ebenfalls bekannt (KERR, 2002b). Eine andere Quelle gibt als Haltbarkeitszeitraum des Blutes für hämatologische Untersuchungen unter Kühlung 24 h an (MEYER et al., 1992). WEISER et al. (1981) fordert bei Tierblut die Ausführung eines Blutausstriches bis maximal 15 min nach Blutentnahme, eine Lagerung bei Raumtemperatur nur bis maximal 1 h und bei Lagerung über Nacht oder Versand ins Labor unter Kühlung der Proben. Der MCV-Anstieg bzw. MCHC-(Mean Corpuscular Hemoglobin) Abfall mit der Zeit gilt als unabhängig von der Lagerungstemperatur, während für Thrombozyten eine Verlängerung der Haltbarkeit durch Kühlung um das 5-Fache von 5 h auf 24 h erreicht werden kann (MEYER et al., 1992). Abweichungen sind für die Thrombozytenzählung der Katze zu erwähnen. Die Thrombozytenzählung bei der Katze sollte innerhalb von 30 min nach der Blutentnahme abgeschlossen sein (MORITZ und HOFFMANN, 1997). Neuere Untersuchungen von MORITZ (2002) über den Einfluss der Blutalterung auf die Messergebnisse des ADVIA 120 ergaben hinreichende Probenstabilität für die Leukozyten- und Erythrozytenzählung sowie die Hämoglobinbestimmung bis zu 72 h, für die Hämatokritbestimmung und den Parameter MCV bis zu 36 h nach Blutentnahme. Die Thrombozyten zeigten sich nur bis 9 h hinreichend stabil. Für Blutproben, die länger als 24 h bei Zimmertemperatur bzw. 36 h bei Kühlschrankschranktemperatur gelagert wurden, war das Differenzierungsergebnis nur noch eingeschränkt verwertbar. Bei Einsendematerial sollte daher zur Verifizierung der Ergebnisse der automatischen Differenzierung ein zum Zeitpunkt der Blutentnahme angefertigter Blutausstrich beigelegt werden (MORITZ, 2002).

Pferdeleukozyten werden allgemein als besonders labil eingestuft, und eine Aufbewahrung von länger als ein paar Stunden zerstört ihre Morphologie (KERR, 2002b). Pferdeblut zeigte in einer Lagerungsstudie bei Zimmertemperatur geringere Artefakte als bei Aufbewahrung unter Kühlung (4°C). Daher lässt sich für Pferdeblut eine Probenaufbewahrung bei Zimmertemperatur empfehlen (CLARK et al., 2002). Eine andere Untersuchung von Lagerungseinflüssen auf Pferdeblut im Rahmen einer Geräteevaluierung bestätigte den negativen Einfluss der Kühlung auf die Leukozyten- und vor allem auf die Thrombozytenzahlen. Die Zunahme des MCV und des RDW (Red Cell Distribution Width) durch Schwellung der Erythrozyten konnte durch Kühlung aber verzögert werden (PASTOR et al., 1997a).

Ein Fehler bei der Probenvorbereitung ist die oft unzulängliche *Resuspension der Blutprobe* unmittelbar vor der Analyse. Nach Lagerung sollten Blutproben durch mindestens 10-maliges Wenden um 180 Grad gemischt werden (HOUWEN, 2002). Der Einsatz von Mischgeräten wie Walzenmischer oder Rotationsmischer ist zu empfehlen, da die erforderliche längere Mischzeit nicht durch verstärkte manuelle Bewegungen ersetzt werden kann. Bei zu starkem

Schwenken der Probenröhrchen entstehen außer Schaum auch kleine Luftbläschen, die nur sehr langsam an die Oberfläche flottieren und in elektronischen Zählgeräten wie Blutzellen mitgezählt werden (THOM, 1979). Blutgerinnsel und Agglutination im Probenröhrchen führen zu unplausiblen Ergebnissen und können durch eine visuelle Beurteilung der Probe vor der Analyse aufgedeckt werden. Da viele Einflussgrößen und Störfaktoren die Ergebnisse von Blutuntersuchungen schlecht vergleichbar machen, ist eine Qualitätskontrolle und Standardisierung unerlässlich.

2.6 Qualitätskontrolle im Labor

2.6.1 Regelung der Qualitätskontrolle: Richtlinien, Leitlinien und Gesetze

Qualitätskontrolle entspricht einem Monitoring von Daten aus klinischem Material oder geeignetem Referenzmaterial mit dem Ziel, Fehler in einem analytischen System aufzudecken (BENTLEY, 1990), überflüssige Analysen und Materialverschwendung zu verhindern und die Kosten so gering wie möglich zu halten (LUMSDEN, 2000).

Veterinärmedizinische klinisch-diagnostische Laboratorien sind nicht den selben gesetzlichen Bestimmungen der Qualitätskontrolle unterworfen, wie sie für medizinisch-diagnostische Laboratorien gelten (LUMSDEN, 2000; MITZNER, 2000). Die Teilnahme an Ringversuchen ist in Deutschland ebenso freiwillig wie eine Zertifizierung der Labore durch unabhängige Institute nach ISO-Norm (Stand 2003). Ebenso wenig existieren in der veterinär-medicinischen Laboratoriumsmedizin standardisierte Leitlinien für die Validierung einer Methode (JENSEN, 2000). Geräte werden weder für den Verkauf im Veterinärbereich lizenziert, noch wird geprüft, ob sie die erwartete Leistung erbringen (KERR, 2002a). Der Mangel an standardisierten Leitlinien in der veterinärmedizinischen Labormedizin hat dazu geführt, dass Auszüge aus Leitlinien verwendet wurden, die für die humanmedizinische Laboratoriumsmedizin durch nationale und internationale Institutionen ausgegeben oder in wissenschaftlichen Journalen von verschiedenen Autoren publiziert wurden (JENSEN, 2000). Für die Humanmedizin haben verschiedene nationale und internationale Gremien eine Vielzahl von Richtlinien bzw. Normen zu unterschiedlichen Aspekten der Labormedizin erarbeitet. Das International Council for Standardisation in Haematology (ICSH) sieht die Förderung der Zusammenarbeit zwischen Geräteherstellern und Anwendern als seine Hauptaufgabe, um verlässliche und vergleichbare Ergebnisse in der Hämatologie zu erhalten (LEWIS, 1990). Neben Arbeiten zur Standardisierung einzelner hämatologischer Messmethoden wie beispielsweise die Aufstellung von Referenzmethoden für die Hämoglobinometrie, die Bestimmung des Packed Cell Volume und die Zellzählung, hat das ICSH Richtlinien für die Evaluierung automatischer Blutzellzählgeräte veröffentlicht (siehe Tab. 2.1). Außerdem bereitet das ICSH für die WHO (World Health Organisation) Dokumente zur weltweiten Standardisierung analytischer Methoden in der Hämatologie vor (ICSH, 2000a, b).

Tab. 2.1: Relevante Empfehlungen und Richtlinien des International Committee for Standardisation in Haematology (ICSH) für die Hämatologie

Empfehlung/Richtlinie	Jahr
Guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting and cell marker applications (ICSH, 1994b)	1994
Reference method for the Enumeration of Erythrocytes and Leukocytes (ICSH, 1994a)	1994
Recommendations for Reference Method for Haemoglobinometry in Human Blood (ICSH standard 1995) and Specifications for International Haemoglobincyanide Standard (4 th edition) (ICSH, 1996)	1995
Platelet Counting by the RBC/Platelet Ratio Method – A Reference Method (ICSH und ISLH, 2001)	2001
Recommendations for Reference Method for the Packed Cell Volume (ICSH Standard 2001) (ICSH, 2001)	2001
Recommendations for “surrogate reference” method for the packed cell volume (ICSH, 2003)	2003

Das NCCLS (National Committee of Clinical and Laboratory Standards, Wayne, USA), ist eine weltweit anerkannte Organisation zur Förderung der Entwicklung und der freiwilligen Anwendung von Standards und Richtlinien im Gesundheitswesen. Die Dokumente über Testsysteme am Patienten und damit zusammenhängende Themen des Gesundheitswesens werden veröffentlicht: (1) als klar definierte Standards, welche in der Anwendung keine Modifikation zulassen, (2) als Richtlinien, welche speziellen Anwenderbedürfnissen angepasst werden dürfen, und (3) als Berichte. Im Dokument H26-A werden ebenfalls Ziele zur Leistungsbeurteilung von Mehrkanal-Blutanalyse-Systemen im Rahmen der internen Qualitätskontrolle aufgestellt (siehe Tab. 2.2). Das NCCLS initiierte die Gründung eines neuen internationalen technischen Committees: des „International Organisation for Standardisation Technical Committee (ISO/TEC) 212, Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems“. Das ISO/TEC 212 koordiniert seit 1995 internationale Bemühungen um Standardisierung in der Labormedizin und In-Vitro-Diagnostik-Testsystemen. Eine weitere internationale Einrichtung in diesem Sinne ist das IFCC (International Federation of Clinical Chemistry, Nancy, Frankreich).

Auf nationaler Ebene knüpft das Evaluierungsprotokoll für hämatologische Zellzähl- und Zelldifferenzierungsgeräte der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie (DGKC) an das ICSH-Protokoll an, welches 1984 erstmals veröffentlicht wurde (RÜCKER et al., 1994). Die DGKC e.V. übt durch ihre mit Sollwertermittlung und externer Qualitätskontrolle beauftragten Abteilungen sowie durch die Ausgabe von Ringversuchen ebenfalls eine Qualitätskontrollfunktion aus (STAMMINGER, 1999).

Tab. 2.2: Auszug hämatologisch relevanter Standards und Richtlinien des National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Wayne, Pennsylvania/USA.

NCCLS-Dokument	Jahr	Dokumentennummer
Performance Goals for the Internal Quality Control of Multichannel Hematology Analyzers; Approved Standard (NCCLS-DOKUMENT, 1996a)	1996	H26-A
Calibration and Quality Control of Automated Hematology Analysers; Proposed Standard (NCCLS-DOKUMENT, 1999b)	1999	H38-P
Evacuated Tubes and Additives for Blood Specimen Collection; Approved Standard – Fourth Edition (NCCLS-DOKUMENT, 1996b)	1996	H1-A4
Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard – Fourth Edition (NCCLS-DOKUMENT, 1998)	1998	H3-A4
Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline (NCCLS-DOKUMENT, 1999a)	1999	H18-A2
References and Selected Procedures for the Quantitative Determination of Hemoglobin in Blood; Approved Standard – Third Edition (NCCLS-DOKUMENT, 2000a)	2000	H15-A3
Procedure for Determining Packed Cell Volume by the Microhematocrit Method; Approved Standard – Third Edition (NCCLS-DOKUMENT, 2000b)	2000	H7-A3
Reference Leukocyte Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods (NCCLS-DOKUMENT, 1992)	1992	H20-A

Das Deutsche Institut für Normung e.V., Berlin (DIN), genauer der Normenausschuss Medizin (NAMed), gibt Normblätter für Blutbestandteilmessverfahren, Grundlagen der Messtechnik, Qualitätsmanagement bzw. Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin heraus, in denen Messmethoden und Verfahrensweisen genau beschrieben, Begriffe und Leistungsmerkmale definiert werden, was eine Standardisierung ermöglicht (vergl. Tab. 2.3). In Zusammenarbeit mit dem DIN betreibt auch das INSTAND e.V. (Institut für Standardisierung und Dokumentation im Medizinischen Laboratorium, Düsseldorf) Normung und unterhält als von der Bundesärztekammer (BÄK) beauftragte Referenzinstitution eigene Referenzlaboratorien. Das INSTAND e.V. veranstaltet Ringversuche, ist Herausgeber einer Schriftenreihe und als wissenschaftliche Fachgesellschaft Mitglied in nationalen und internationalen wissenschaftlichen Gremien und Dachverbänden wie z.B. ICSH und NCCLS. Seit 1994 ist das INSTAND e.V. Collaborating Center der World Health Organisation (WHO) (STAMMINGER, 1999).

Tab. 2.3: Auszug hämatologisch relevanter DIN-Normen des Deutschen Instituts für Normung e.V. Berlin

DIN-Norm	Jahr	Nummer
Grundlagen der Messtechnik (unterteilt)	1995 – 1999	DIN 1319
Bestimmung der Hämoglobinkonzentration im Blut – Referenzmethode	1995	DIN 58931
Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut – Teil 1: Blutentnahme, Probenvorbereitung, Einflussgrößen	1996	DIN 58932-1
Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut – Teil 3: Bestimmung der Konzentration der Erythrozyten – Referenzmethode	1994	DIN 58932-3
Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut – Teil 4: Referenzverfahren zur Bestimmung der Konzentration der Leukozyten	2003	DIN 58932-4
Bestimmung des Volumenanteils der Erythrozyten im Blut – Zentrifugationsmethode als Referenzmethode	1995	DIN 58933-1
Kontrollmaterialien für das Blutbild – Teil 1: Kontrollblute	1997	DIN 58934-1
Qualitätsmanagement in der Laboratoriumsmedizin und Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin (unterteilt)	1983 – 2001	DIN 58936

Arbeitskreise verschiedener Institutionen wie beispielsweise der Arbeitskreis Labor der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie stellen Checklisten für Laborbetreiber auf, welche die Grundlage für die Akkreditierung hämatologischer Laboratorien bilden (FREUND et al., 1997). Dies alles sind jedoch nur Empfehlungen, Richtlinien oder Leitlinien. Strenge Vorschriften, wie weit die Maßnahmen zur Qualitätssicherung im Labor gehen müssen, existieren für die meisten Untersuchungen nicht (RÖHLE und SIEKMANN, 1998). Ausnahmen sind die Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (BUNDESÄRZTEKAMMER, 2001). In Anlage 1 sind für die in die Richtlinie aufgenommen Messgrößen aus Serum/Plasma, Liquor, Urin und Vollblut die zugehörigen maximal zulässigen Messabweichungen aufgeführt. Die Richtlinie erhielt nach Aufnahme in die Eichordnung von 1988 Gesetzeskraft (RÖHLE und SIEKMANN, 1998). Mit Änderung des Medizinproduktegesetzes zum 1.1.2002 durch das Bundesministerium für Gesundheit wurde das Medizinproduktrecht Rechtsgrundlage für die Richtlinie (BUNDESÄRZTEKAMMER, 2003). Richtlinien räumen dem einzelnen Arzt nur einen geringen Ermessensspielraum ein. Ihre Nichtbeachtung kann Sanktionen nach sich ziehen. Auch wenn veterinärmedizinische Laboratorien bisher von der Legislative ausgelassen wurden, ist es für jedes tierärztliche Labor unerlässlich, ein eigenes Qualitätskontrollprogramm zu erstellen und strikt zu befolgen (MITZNER, 2000). Qualitätskontrolle im Labor betrifft die Prüfung neuer diagnostischer Methoden, die laborinterne Qualitätskontrolle sowie die externe Qualitätskontrolle.

2.6.2 Methodenprüfung

Vor der Neueinführung einer Methode müssen ihre Zuverlässigkeitskriterien überprüft werden (STAMM, 1979), bzw. wird ein neues Laborgerät eingeführt, so müssen die Methoden und Reagenzien für jede Tierart validiert werden (LUMSDEN, 2000). Die *Methodenprüfung* beinhaltet nach einleitender Beschreibung des Messprinzips, der Probengewinnung- und Bearbeitung, der Angabe der Reagenzien und weiteren Gerätschaften, der Beschreibung der Vorgehensweise und der gewählten statistischen Methoden schließlich die Bestimmung der Zuverlässigkeit der Methode. Die *Zuverlässigkeit* wird durch die Präzision, die Richtigkeit und die Nachweisgrenze als untere Grenze des Messbereiches beschrieben. Die *Präzision* sollte von Tag zu Tag und in der Serie ermittelt werden. Unter die Richtigkeitsprüfung fallen die Bestimmung des linearen Bereichs, der analytischen Spezifität der Methode, der Vergleich mit einer Referenzmethode und die *Richtigkeitsprüfung* mittels Kontrollblut (STAMM, 1979). Unter der analytischen Spezifität versteht man die Fähigkeit einer Methode, nur diejenige(n) Komponente(n) zu bestimmen, die sie vorgibt zu messen (STAMM und BÜTTNER, 1995c).

Eine Methodenprüfung sollte weiterhin Angaben über die *Praktikabilität* der Methode enthalten (STAMM, 1979). Feldstudien vor Ort eignen sich, das Gerät im Umgang mit nicht technisch ausgebildeten Nutzern zu prüfen (KERR, 2002a). Die *Erstellung geräteeigener Referenzwerte*, Angabe von Informationen über mögliche beobachtete biologische Einflussfaktoren, Fehlerquellen und Gefahren generell sowie schließlich der Nutzen und die klinische Bedeutung der Methode runden das Ergebnis einer Methodenprüfung ab (STAMM, 1979).

Ziel der Qualitätskontrolle im Labor ist es, die analytische Unpräzision und die analytische Abweichung vom Zielwert innerhalb bestimmter Grenzen zu halten, so dass die medizinische Entscheidung nicht davon beeinflusst wird (WESTGARD und KLEE, 1986). Lange Zeit wurde bei der Entwicklung klinisch-chemischer Routinemethoden und Analysensysteme weit mehr Wert auf die Präzision gelegt als auf die Richtigkeit (BÜTTNER, 1991b). Die Richtigkeit hat jedoch einen weitaus größeren Effekt auf die medizinische Entscheidung als die Präzision (KLEE, 1990). Die *Präzision* ist das Maß für Beständigkeit oder Wiederholbarkeit und sagt nichts darüber aus, ob ein Ergebnis korrekt ist (KERR, 2002a). Je präziser aber ein Instrument arbeitet, desto leichter sind Messabweichungen erkennbar. Durch eine Verbesserung der analytischen Präzision wäre es also möglich, mit weniger aufwändigen Kontrollsystemen zu arbeiten und somit Kosten zu sparen (KLEE, 1990). Akzeptable Variationskoeffizienten für die Präzision sind unterschiedlich, je nachdem um was für eine zu bestimmende Komponente es sich handelt. Die Präzision tendiert in der Serie zu besseren Ergebnissen als die Präzision außerhalb der Serie. Weiterhin ist der Variationskoeffizient abhängig von der Konzentration des jeweiligen Analyten bzw. dem Messniveau. Idealerweise sollten Präzisionsstudien über die ganze pathologische Breite gemacht werden. Damit die Präzision nicht von der Blutverschleppung beeinflusst wird, sollten niedrige, normale und hohe Konzentrationen im Ablauf und in der Auswertung getrennt behandelt werden (ICSH, 1994b). Die Blutverschleppung ist nach BROUGHTON et al. (1969) ein

wichtiger Bestandteil der Präzision. Für die Präzisionsbestimmung aller Messniveaus gilt grundsätzlich, dass es besser ist, mehrere Proben weniger oft zu messen als wenige Proben häufiger (ICSH, 1994b).

Die *Richtigkeit* beschreibt die Fähigkeit einer Methode, dem „wahren Wert“ so nahe wie möglich zu kommen. Die Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (2001) definiert Richtigkeit als Ausmaß der Übereinstimmung zwischen dem aus einer großen Serie von Messergebnissen erhaltenen Durchschnitt und dem wahren Wert, ausgedrückt als systematische Messabweichung. Das Hauptproblem liegt in der Definition, was „wahr“ ist. Seit der Entwicklung von Referenzmethoden und Referenzmaterialien ist es möglich, die Richtigkeit durch Methodenvergleichsstudien objektiv zu überprüfen (BÜTTNER, 1991b). Angegeben wird die Richtigkeit auf Basis von *Korrelationsberechnungen* als Korrelationskoeffizient (r) und graphisch dargestellt im Streudiagramm mit der Referenzmethode auf der X-Achse und der zu überprüfenden Methode auf der Y-Achse (KERR, 2002a). In einem anderen Ansatz werden in einem Streudiagramm die Messdifferenzen zwischen Referenzmethode und zu überprüfender Methode gegen den Mittelwert der beiden Methoden aufgetragen. Die Richtigkeit wird durch das *arithmetische Mittel der Differenzen* beschrieben (BLAND und ALTMAN, 1986a).

Kriterien, anhand derer die Leistung einer Methode beurteilt werden kann, sind in der humanmedizinischen Literatur von verschiedenen Autoren beschrieben. Sie sind bezüglich ihrer Herleitung und Angaben auch für dieselben Parameter unterschiedlich.

Für die meisten Methoden wird bezüglich der *Präzision* ein *Variationskoeffizient (VK)* unter 5 % angestrebt (JENSEN, 2000; KERR, 2002a). LUMSDEN (2000) bezeichnet für die Erythrozyten (RBC)- und Leukozyten (WBC)-Zählung in Multikanalanalysesystemen Variationskoeffizienten von 3 % – 5 % als akzeptabel. Andere Angaben berücksichtigen die biologische Variabilität des jeweiligen Parameters und geben für die maximale Unpräzision $1/8$ des Referenzintervalls an (DÖRNER, 1998b). Ein weiter gefasster zulässiger analytischer Fehler für die Reproduzierbarkeit ergibt sich aus der Gleichung von TONKS (1963), nach der die erlaubte Fehlergrenze (in %) kleiner sein muss als $1/4$ des Normalbereichs. KLEE (1990) sieht für die optimale Präzision in der Serie der Parameter WBC, RBC, Hämoglobin (HGB), Mean Corpuscular Volume (MCV) und Thrombozyten (PLT) Werte bis einschließlich 3,5 % vor. In den Angaben des Gesamtvariationskoeffizienten nach KLEE (1990) ist außerdem die biologische Variabilität eines Individuums mitberücksichtigt. Die Zahlenwerte sind daher entsprechend höher (siehe auch Kap. 5.3 Tab. 5.1). Die Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (2001) gibt folgende Werte als Grenzen für die maximal zulässige Unpräzision an: für RBC und HKT 3 %, für HGB 2 %, für WBC 6 % und für PLT 7 %. SKENDZEL et al. (1985) untersuchte mittels Befragung von Ärzten, welche Präzision der Kliniker benötigt, um eine ausreichende Patientenversorgung gewährleisten zu können. Für einige wenige Parameter werden medizinisch relevante Kriterien für Labortests in Form von Variationskoeffizienten mit zugehöriger Analytenkonzentration angegeben. Für

den Hämatokrit (HKT) wird ein VK von 5,4 % (HKT-Wert 42 %), für das Hämoglobin (HGB) ein VK von 3,6 % (HGB-Konzentration 13 – 15 g/dl), für das MCV ein VK von 3,2 % (MCV-Wert 95 fl) und für die Leukozytenzählung ein VK von 16,4 % (WBC-Konzentration 5000/mm³) bzw. 14,0 % (WBC-Konzentration 25.000/mm³) als medizinisch ausreichend angesehen. Eine Verbesserung der Präzision weit über diese Werte hinaus wird den diagnostischen Nutzen der Methode nicht steigern (SKENDZEL et al., 1985).

Die *Richtigkeit* einer Methode kann mittels Kontrollblut oder Methodenvergleich geprüft werden. Erfolgt die Richtigkeitsprüfung über Kontrollblut mit bereits im Voraus bekannten Sollwerten, ist zu beachten, dass aufgrund der unterschiedlichen Geräteprinzipien zur Zählung, Größenbestimmung und Differenzierung von Blutzellen die Sollwertangaben gerätespezifisch sind. Auch zwischen verschiedenen Modellen desselben Herstellers können die Messergebnisse unterschiedlich ausfallen. Die allgemein akzeptierten Grenzen für Kontrollblut errechnen sich zumeist aus dem Mittelwert $\pm 2 \times SD$, wobei erwartet wird, dass 95% aller erhaltenen Messwerte innerhalb dieser Grenzen liegen (LUMSDEN, 2000).

In *Methodenvergleichsstudien* ist das Ziel, dass sich die Differenzen zwischen den beiden Methoden nicht von Null unterscheiden. Wichtiger ist jedoch, dass die Differenzen klinisch unbedeutend sind (LUMSDEN, 2000). FRASER et al. (1992) gibt unter Berücksichtigung der biologischen Variabilität eine maximale erlaubte Unrichtigkeit von kleiner als 1/16 des Referenzintervalls an. Die Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) von 1988 haben für spezielle Analyten Grenzen der maximal erlaubten Fehler bei der Leistungsbeurteilung einer Methode oder eines Labors aufgestellt. Diese maximalen Fehlergrenzen sind in den USA gesetzlich vorgeschrieben. Der maximal erlaubte Gesamtfehler beträgt gemäß den CLIA immer konzentrationsbezogen für die Erythrozytenzählung und den Hämatokrit 6 %, für die Hämoglobinbestimmung 7 %, die Leukozytenzählung 15 % und die Thrombozytenzählung 25 %. Für die Leukozyten-differenzierung wird eine maximal erlaubte Abweichung von 3 x SD angegeben (KOCH und PETERS, 2001). Teilt man den maximal erlaubten Gesamtfehler durch den Faktor 4, so erhält man nach BURNETT und WESTGARD (1992) wiederum Grenzwerte für die Präzision (maximal erlaubte SD). KLEE (1990) gibt für die Richtigkeit im mittleren Messbereich maximal erlaubte Gesamtabweichungen von $\pm 14,6$ % für WBC-, $\pm 5,3$ % für RBC- und $\pm 4,5$ % für HGB-Konzentrationen sowie $\pm 4,2$ % für MCV und ± 22 % für PLT an. Diese Grenzwerte betragen das Dreifache einer als „optimal“ betrachteten Leistung. Mögliche durch die Kalibration bzw. das Kalibrationsmaterial verursachte Fehler sind mitberücksichtigt. Die Anlage der Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (2001) fordert für die Parameter des kleinen Blutbildes folgende Grenzen der maximal zulässigen Unrichtigkeit: für RBC 4 %, für HKT 3 %, für HGB 2 %, für WBC 6 % und für PLT 7 %. Diese Werte wurden erstellt unter Berücksichtigung der klinischen Erfordernisse sowie der Grenzen des technisch Machbaren.

Für die Entscheidungsfindung, ob eine Methode eine ausreichende Leistung erbringt, müssen sämtliche experimentell ermittelten Daten mit den vorher definierten Leistungszielen verglichen werden (KOCH und PETERS, 2001). Von WESTGARD (1995) wurde für eine

objektive Beurteilung das „Method evaluation decision chart“ (MEDx Chart) entwickelt. Das MEDx Chart gilt als ein einfaches graphisches Instrument, für den Vergleich der bei einer Methode bestimmten Präzision und Richtigkeit mit den analytischen Qualitätsanforderungen, angegeben als maximal erlaubter Gesamtfehler.

2.6.3 Referenzmethoden und Routinemethoden

Referenzmessverfahren sind geprüfte Messverfahren, für die alle Bedingungen und Prozeduren exakt beschrieben sind. Sie sind zur Überprüfung der Genauigkeit anderer Methoden zur Bestimmung derselben Messgröße geeignet (ISO-GUIDE-30, 1992). Ihr Ergebnis, der Referenzmethodenwert, kommt dem „wahren Wert“ der Analytenkonzentration sehr nahe (RÖHLE und SIEKMANN, 1998). Die Durchführung des Referenzmessverfahrens ist im Allgemeinen aufwändig und daher für den Routineeinsatz nicht geeignet (DIN 58936-1). Kriterien für die Anerkennung als Referenzmethode in Abhängigkeit von den medizinischen Erfordernissen sind innerhalb eines Laboratoriums eine Unrichtigkeit von 1 bis 3% und eine Unpräzision von 0,5 bis 1,5 % (relative Standardabweichung) über den ganzen medizinisch relevanten Messbereich (BÜTTNER, 1991b). Da also nur für einen Teil der Messgrößen Referenzmethoden zur Verfügung stehen, müssen für die übrigen Messgrößen die Bezugswerte für die *Richtigkeitskontrolle mit Routinemethoden* ermittelt werden (STAMM und BÜTTNER, 1995c). Nach einem genau vorgeschriebenen Versuchsplan, durchgeführt mit einer bestimmten Methode, lässt sich für eine definierte Routinemethode ein methodenabhängiger Zielwert, der Sollwert, ermitteln. Der Vergleich des Sollwertes mit dem durch die eigene identische Methode ermittelten Erfahrungswert ermöglicht die Feststellung, inwieweit die Methode einwandfrei angewendet wird (RÖHLE und SIEKMANN, 1998). Die Sollwertermittlung erfolgt in der Regel in einer begrenzten Zahl von besonders ausgerüsteten Sollwertlaboratorien, deren Leiter eine besondere Qualifikation haben müssen (STAMM und BÜTTNER, 1995c). Routinemessverfahren müssen hinreichend zuverlässig und praktikabel sein (DIN 58936-1). Für sie wird eine Unrichtigkeit von 5 bis 10 % angegeben (URIANIO und CALI, 1977). In der Praxis werden für die Überprüfung der Richtigkeit eines Laborgerätes häufig manuelle Methoden als „Referenz“ herangezogen. In der Hämatologie sind dies Zählkammermethoden für die Zellzählung (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten), zur Überprüfung der automatischen Differenzierung ein Blutausstrich, die Hämatokritbestimmung per Mikrozentrifugation und seltener für die manuelle Hämoglobinbestimmung das Photometer (MOHR, 1995).

Für die *Hämoglobinbestimmung* gilt die Hämiglobincyanid-Methode als offizielle Referenzmethode (NCCLS-DOKUMENT, H15-A3; ICSH-Empfehlung, 1995; DIN 58931). Die Zentrifugationsmethode ist ebenfalls offizielle Referenzmethode für die Hämatokritbestimmung (NCCLS-DOKUMENT, H7-A2; DIN 58933-1). Das International Council for Standardization in Haematology (ICSH) gibt eine neue Referenzmethode der Hämatokritbestimmung an, bei welcher das PVC (Packed Cell Volume) als Quotient zwischen dem Hämoglobinwert des Vollblutes und dem Hämoglobinwert der zentrifugierten Erythrozyten nach Entfernung des Plasmas errechnet wird (ICSH, 2001). Durch die

Einführung der so genannten Surrogate-Referenzmethode wurde dieses neue, für Routinelaboratorien jedoch zu aufwändige Verfahren vereinfacht (ICSH, 2003).

Qualitätskontrollen durch Erythrozytenzählungen in der Zählkammer werden nicht empfohlen, da sie zu ungenau sind und die Ergebnisse nicht an einem gefärbten Blutausstrich verifiziert werden können (FREUND et al., 1997). Sowohl für die *Erythrozyten* als auch für die *Leukozyten* wird zur Kontrolle die elektronische Impulszählung im Durchflusszytometer (ICSH-Empfehlung, 1994; DIN 58932-3; DIN 58932-4) bevorzugt. Die neue Norm zur Leukozytenzählung fordert die Bestimmung der wahren Konzentration durch Anfertigung einer Verdünnungsreihe. Die Zählung erfolgt durch Impedanz- oder Streulichtmessung (DIN 58932-4, 2003) Zur *Bestimmung der Thrombozytenkonzentration* wurden sowohl die Zählkammer (ICSH-Empfehlung, 1988) als auch die elektronische Impulszählung im Durchflusszytometer nach Koinzidenzkorrektur als „Referenz“ erwähnt (RÜCKER et al., 1994). Eine neue DIN-Norm (DIN 58932-5) zur Referenzmethode für die Thrombozyten-zählung befindet sich in Vorbereitung. Messprinzip ist die Durchflusszytometrie (Stand 2003). Vom ICSH wird als neue Referenzmethode die Bestimmung der RBC/PLT-Ratio durch Zählung mit durch Fluoreszenzantikörper markierten Thrombozyten in einem Fluoreszenz-Durchflusszytometer relativ zu den nicht markierten Erythrozyten genannt. Die benötigte genaue Erythrozytenzahl wird durch ein halbautomatisches Impedanzmessgerät bestimmt (HARRISON et al., 2001; ICSH und ISLH, 2001).

Zur Überprüfung der automatischen *Differenzierung* ist die visuelle Differenzierung anhand eines Blutausstrichs von 4 x 200 Zellen die Methode der Wahl (NCCLS-DOKUMENT, H20-A). Die konventionelle manuelle Differenzierung als Qualitätskontrollaktivität ist jedoch mit einer Reihe von Problemen behaftet. Die Identifikation von Zellen ist ein subjektiver Prozess, so dass es keinen absolut „wahren“ Standard geben kann (BENTLEY, 1990). Die Zuverlässigkeit der manuellen Differenzierung ist stark abhängig von der Qualität der bei Anfertigung und Färbung des Ausstrichs verwendeten Technik sowie vom Ausbildungsgrad und der Erfahrung des Untersuchers (LEWIS, 1990). Zu den Verteilungs- und Beobachterfehlern kommt bedeutend der statistische Fehler hinzu. Beim traditionellen Differentialblutbild sind die Standardabweichungen derart, dass pathologische Variationen und die Anwesenheit kleiner Populationen pathologischer Zellen leicht übersehen werden können. Die Ungenauigkeit der visuellen Leukozytendifferenzierung ist also primär eine Funktion der geringen Zahl ausgezählter Zellen. Zusammenfassend machen nach BENTLEY (1990) statistische Fehler, Beobachterfehler und Verteilungsfehler der Zellen auf dem Blutausstrich eine auf Objektträgeruntersuchung basierende Leukozytendifferenzierung als Mittel der Qualitätskontrolle zu ungenau (BENTLEY, 1990). Darüber hinaus fordert das ICSH für die Differenzierung eine Ergebnisausgabe in absoluten Zellzahlen pro l oder μl , wie sie von automatischen Geräten zur Differenzierung und Zellzählung angegeben wird (ICSH, 1995), während vom NCCLS die gleichzeitige Anwendung von Relativeinheiten (in %) und Absoluteinheiten (Zellzahl $\times 10^9/\text{l}$) empfohlen wird (NCCLS-DOKUMENT, 1992).

2.6.4 Interne und externe Qualitätskontrolle

Die laborinterne routinemäßige Qualitätskontrolle prüft nur einen Teil der für die Validierung von Methoden wichtigen Zuverlässigkeitskriterien, dies aber kontinuierlich (STAMM, 1979). Der Umfang eines Qualitätskontrollprogramms ist je nach Größe des Labors unterschiedlich. In größeren Laboren wird die Qualitätskontrolle täglich in die Analyse miteinbezogen. Die Mindestfrequenz für kleine Praxislabore mit geringem Probendurchsatz liegt bei einer wöchentlichen Prüfung.

Die *interne Qualitätskontrolle* ist ein Kontrollverfahren auf der Basis von Stichproben und umfasst die Präzisions- und Richtigkeitskontrolle. Die *Kontrolle der Präzision* erfolgt, indem in jeder Analysenserie, z.B. bei Beginn einer neuen Arbeitsschicht, eine Präzisionskontrollprobe eingefügt wird, deren Analyseergebnis einem graphisch ausgeführten Test mit einer Kontrollkarte unterworfen wird (STAMM und BÜTTNER, 1995c). Für die Präzisionskontrollprobe ist ein Zielwert oder Kontrollmaterial nicht nötig (THOMAS, 1998b). Von dem Testergebnis dieser Stichprobe wird auf die Zuverlässigkeit der ganzen Analysenserie geschlossen. Die Unpräzision einer Analysemethode von Tag zu Tag sollte in der Regel nicht größer als 1/12 des Referenzbereichsintervalls sein, mindestens aber unter 1/8 liegen (THOMAS, 1998b). Die *Richtigkeitskontrolle* soll mindestens in jeder vierten Analysenserie, d.h. an jedem vierten Tag vorgenommen werden. Sie erfolgt mit einer Richtigkeitskontrollprobe, d.h. einer Kontrollprobe, für die der Zielwert des Analyten für die im eigenen Laboratorium benutzte Analysemethode bekannt ist. Die Richtigkeitskontrolle muss über den gesamten klinischen Messbereich erfolgen. Dazu werden abwechselnd Kontrollproben mit unterschiedlichen Konzentrationen der Analyten gemessen (STAMM und BÜTTNER, 1995c). Der Sollwert der Kontrollproben muss in vom Hersteller unabhängigen Referenzlaboratorien bestimmt worden sein. Die Methode gilt als richtig, wenn die Abweichung des Messwertes vom Sollwert nicht größer ist als der 3fache Wert der Unpräzision von Tag zu Tag der Bestimmungsmethode (THOMAS, 1998b).

Unter *externer Qualitätskontrolle* versteht man die Teilnahme an so genannten *Ringversuchen*. Der Ringversuch ist eine Richtigkeitskontrolle, bei der die Bewertung durch den externen Ringversuchsleiter erfolgt. Dabei erhält eine größere Zahl von Laboratorien Abfüllungen derselben Kontrollprobe, und jedes Laboratorium führt die Analyse der vereinbarten Analyte durch. Die Analyseergebnisse werden dem Versuchsleiter übermittelt, der sie statistisch auswertet (STAMM und BÜTTNER, 1995c). Die Akzeptanzkriterien sind dabei dieselben wie für die interne Richtigkeitskontrolle (THOMAS, 1998b). Die Auswertung erfolgt in Deutschland durch Vergleich mit methodenunabhängigen Referenzwerten. Wo diese nicht zur Verfügung stehen, wird der Vergleich mit methodenabhängigen Sollwerten vorgenommen. Dieses *Sollwertkonzept* ist seit 1988 über die Richtlinien der Bundesärztekammer zunächst als Teil der Eichordnung, heute durch das Medizinprodukterecht gesetzlich verankert. In manchen Ländern wird das *Consensus valuae-Verfahren* angewandt. Dabei wird der Mittelwert der Ergebnisse aller Teilnehmer ermittelt und nach Ausreißereliminierung mit dem „Consensus valuae“ als Zielwert gearbeitet (STAMM und BÜTTNER, 1995c). Nach Regelungen der Bundesärztekammer ist es für

medizinisch-diagnostische Laboratorien seit 1. Januar 2002 Pflicht, 4-mal pro Jahr an Ringversuchen teilzunehmen. Für die patientennahe Sofortdiagnostik in Praxen niedergelassener Ärztinnen und Ärzte sowie bei medizinischen Diensten ohne Zentrallabor (z.B. Rehaeinrichtungen) entfällt die Verpflichtung zur Teilnahme an Ringversuchen (BUNDESÄRZTEKAMMER, 2001). Alternativ können in kleinen Praxen Patientenproben geteilt und zum Vergleich ein Duplikat an ein vertrauenswürdiges Labor zur Untersuchung geschickt werden (KERR, 2002a). Letztlich muss sich das Laborpersonal mit den Techniken der Datenerhebung auskennen (BENTLEY, 1990). Das Wissen um die Grenzen der Leistungsfähigkeit der Geräte bzw. der Messtechnik trägt entscheidend zur Qualitätssicherung im Labor bei.

2.7 Statistik im Methodenvergleich

Für den Vergleich zweier Messmethoden werden in der medizinischen Literatur häufig *Korrelationsberechnungen* und *lineare Regressionsanalysen* durchgeführt. Die Angabe des Korrelationskoeffizienten (r), des Signifikanzniveaus (p) und der Gleichung der Regressionsgerade als Maß für die Übereinstimmung zweier Methoden werden von BLAND und ALTMAN (1986a) nicht als Mittel der Wahl angesehen. Auch WESTGARD und HUNT (1973) sind der Meinung, dass der Korrelationskoeffizient bei der statistischen Analyse vergleichender Daten von keinem praktischen Nutzen ist. Der Korrelationskoeffizient gibt nicht die Übereinstimmung zweier Messmethoden an, sondern deren linearen Zusammenhang. So wird z.B. der über die neue Methode ermittelte Wert in Abhängigkeit des mit der alten Methode erzielten Wertes gesehen. Dies ist nicht wünschenswert, da eine neue Methode in der Praxis direkt genutzt wird und nicht dazu dienen soll, den Wert der alten Methode vorauszusagen (BLAND und ALTMAN, 1986b). Jeder erhaltene Messwert ist die Summe aus dem wahren Wert der ermittelten Größe und dem Messfehler. Der Korrelationskoeffizient ist abhängig von beidem: (1) von der Variabilität zwischen den Individuen, d.h. zwischen den wahren Werten der Individuen über die Zeit, und (2) von der Variabilität der Werte innerhalb der Individuen, dem Messfehler. Der Wert für den Korrelationskoeffizienten steigt mit der Variabilität zwischen den Individuen, d.h. mit der Standardabweichung der Messergebnisse zwischen den Individuen. Somit können Methoden, welche (visuell) eine schlechte Übereinstimmung zeigen, dennoch hohe Korrelationskoeffizienten besitzen (ALTMAN und BLAND, 1983). Bei der linearen Regressionsanalyse mit Angabe der Geradengleichung liegt das Problem darin, dass der Messfehler der als „unabhängig“ festgelegten Methode die Geradensteigung und den Y-Achsenabschnitt der Geraden beeinflusst. Auch ein hochsignifikanter Unterschied des Y-Achsenabschnitts von Null ist daher kein Beweis für einen systematischen Unterschied der Messmethoden, da er durch den Messfehler verursacht sein kann. BLAND und ALTMAN postulieren weiter, dass die aus einem Vergleich zweier Methoden ermittelten Daten sich immer um die Regressionsgerade gruppieren werden, unabhängig davon, wie gut die Übereinstimmung der Methoden ist. Lineare Regressionsanalysen sowie Signifikanztests werden für den Vergleich zweier Methoden, die entwickelt wurden, um dieselbe Größe zu

messen, als irrelevant betrachtet, da schon die Fragestellung der Untersuchung eine positive Antwort bedingen muss. Die klinische Frage lautet vielmehr, ob eine neue Messmethode die vorhandene ersetzen kann, ob die Messmethoden mit ausreichender Richtigkeit gegeneinander austauschbar sind (ALTMAN und BLAND, 1983). HALLMAN und TERAMO (1981) bezeichnen es als falsch, von einem hohen Korrelationskoeffizienten auf die Austauschbarkeit der Methoden zu schließen. Der naheliegendste Ansatz für die Prüfung auf Austauschbarkeit ist die *direkte Betrachtung der Differenzen zwischen den zwei verschiedenen Messmethoden*. Anstatt die beiden Methoden im Schaubild einander gegenüberzustellen, bevorzugen BLAND und ALTMAN (1983) die Differenzen der beiden Methoden (A minus B) gegen ihren Mittelwert (A plus B) dividiert durch 2 aufzutragen. Anhand des so erstellten Schaubildes kann das Ausmaß der Diskrepanz zwischen den beiden Methoden (der Messfehler und die Messabweichung) besser eingeschätzt werden. Ausreißer können einfacher aufgedeckt werden, und vorhandene Tendenzen wie z.B. steigende Differenzen bei hohen Messwerten sind leichter zu erkennen.

Laut den Untersuchungen von BLAND und ALTMAN (1986a) ist diese auf graphischer Darstellung und einfachen Berechnungen basierende Methode einer Prüfung der Daten auf Korrelation vorzuziehen. Sie eignet sich vor allem besser, etwaige methodisch bedingte Unterschiede aufzudecken. Besonders wenn die Ergebnisse nicht Statistikern, sondern Klinikern übermittelt und von ihnen genutzt werden müssen, ist ein einfacher Vergleich von Vorteil (ALTMAN und BLAND, 1983). Der Grund, warum die Korrelationsberechnung dennoch in der Medizin für einen Methodenvergleich die am häufigsten gebrauchte Methode ist, liegt für BLAND und ALTMAN (1983) darin, dass viele Methodenvergleichsstudien ohne professionelle statistische Hilfe durchgeführt werden, indem Fachbücher nach Methoden für ähnliche Aufgabenstellungen durchsucht oder einfach die statistischen Lösungen bereits publizierter Artikel übernommen werden.