

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Patientengut

Die Blutproben stammten von Tieren, die der Klinik und Poliklinik für Kleine Haustiere und der Klinik für Pferde, allgemeine Chirurgie und Radiologie der Freien Universität Berlin von Januar 2001 bis März 2002 zur Untersuchung vorgestellt wurden. Die insgesamt 552 Blutproben unterteilten sich tierartlich in 242 Hunde, 166 Katzen und 144 Pferde. Es handelte sich dabei sowohl um klinisch gesunde als auch um kranke Tiere. Der Anteil klinisch gesunder Tiere betrug bei der Tierart Hund 11,9 % (29 Tiere), bei der Katze 18,1 % (30 Tiere) und bei der Tierart Pferd 11,1 % (16 Tiere). Alle anderen Tiere wiesen die verschiedensten chirurgischen oder internistischen Erkrankungen auf.

Innerhalb der Gruppe der *Hunde* betrug das mittlere Alter angegeben als Median mit erstem und drittem Quartil 6,85 Jahre (3,00 Jahre / 9,13 Jahre) und das mittlere Gewicht (Median) 27,75 kg (1.Quartil 13 kg / 3.Quartil 37 kg). 49,2 % männliche, 10,7 % männlich kastrierte, 25,6 % weibliche und 14,5 % weiblich kastrierte Tiere verteilten sich auf 66 verschiedene Rassen. Am häufigsten vertreten waren die Rassen Deutscher Schäferhund mit 9,5 %, Rottweiler mit 6,6 %, Cockerspaniel und Dobermann mit je 3,3 % und Riesenschnauzer mit 2,9 %, Labrador Retriever mit 2,5 % sowie Golden Retriever, Boxer und Pudel mit je 2,1 %. 24,1 % aller Hunde gehörten der Gruppe der Mischlinge an.

Der Median des Alters bei den *Katzen* betrug 5,00 Jahre (1.Quartil 2,5 Jahre / 3.Quartil 9 Jahre), der des Gewichts 4,00 kg (1.Quartil 3,5 kg / 3.Quartil 5 kg). 12,2 % waren männliche Tiere, 47 % männlich kastriert, 16,5 % weiblich und 24,3 % weiblich kastriert. Es traten 10 verschiedene Rassen auf, vorherrschend mit 78,3 % war die Rasse Europäisch Kurzhaar, gefolgt von den Perserkatzen (9,0 %) sowie der Rasse Maine Coon und Persermischlingen mit jeweils 2,4 %.

Bei der Tierart *Pferd* betrug der Median des Alters 7,5 Jahre (1.Quartil 5 Jahre / 3.Quartil 13 Jahre) und der Median des Gewichts 500 kg (1.Quartil 420 kg / 3.Quartil 550 kg). 11,8 % der Tiere waren männlich, 43,8 % männlich kastriert und 44,4 % weiblich. Die Unterteilung in Rassegruppen nach MAYER (1994) ergab 61,9 % Warmblutpferde, 22,9 % Traber, 7,0 % Ponys und Kleinpferde, 6,3 % Vollblutpferde sowie 1,9 % Abkömmlinge von Kreuzungen unterschiedlicher Rassen (Haflingermix, Kaltblutmix, Isabell-Berber-Mix).

Von allen Patienten wurde des Weiteren der Gesundheitszustand bzw. die Art der Erkrankung sowie eine eventuelle medikamentöse Vorbehandlung protokolliert.

3.1.2 Probenmaterial, Probengewinnung, Probenvorbereitung

Als *Probenmaterial* diente mit Antikoagulans versetztes Vollblut von Hunden, Katzen und Pferden. Je nach Tierart wurden unterschiedlich große K₃-EDTA Blutentnahmeröhrchen (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) verwendet. Für Pferde betrug das maximale Fassungsvermögen 4 ml, für Hunde 2 ml und für Katzen 1,4 ml Vollblut.

Die *Blutentnahme* erfolgte durch verschiedene Personen. Bei Hund und Katze meistens aus der Vena cephalica bzw. Vena cephalica accessoria oder der Vena saphena lateralis, zum Teil auch aus der Vena jugularis. Bei Hunden wurde das Blut selten auch aus einem zentralen Venenkatheter entnommen. Nach Venenpunktion beim Kleintier mit einer Nadel der Stärke Luer 20 G (Fa. Terumo, Leuven/Belgien) oder Abnahme mit Spritze aus der Vena jugularis wurden die ersten Blutropfen verworfen. Durch Drehen des mit K₃-EDTA beschichteten Blutentnahmeröhrchens um seine senkrechte Achse konnte schon während der Abnahme eine zügige Durchmischung der ins Röhrchen rinnenden Blutstropfen mit dem wandständigen Antikoagulans erreicht werden. Auf maximale Füllung des Röhrchens wurde stets geachtet, um das optimale Mischungsverhältnis von 1,2-2 mg K₃-EDTA pro ml Blut zu erhalten. Beim Pferd fand die Blutabnahme während der Boxenruhe statt. Punktiert wurde die Vena jugularis mit einer Nadel der Stärke Luer 18G (Sterican[®], Fa. B. Braun AG, Melsungen).

Die *Probenaufbewahrung* fand außer zur Ermittlung der Langzeitstabilität bei Zimmertemperatur statt. Das Blut wurde bis zur Analyse auf dem Rollenmixer (Mixer 820, Swelab Instrument, Stockholm) belassen. Das Alter der Blutprobe bei Untersuchung war begrenzt auf mindestens ½ h bis zu maximal 4 h nach Blutentnahme. Zur Überprüfung der Langzeitstabilität wurde das Kontrollblut bei 4°C gelagert, vor Analyse ca. 10 min auf dem Rollenmixer durchmischt und auf Zimmertemperatur gebracht.

3.1.3 Messgeräte

3.1.3.1 CA530-VET



Abb. 3.1: Gegenstand der Evaluierung: der CA530-VET

Der Cellanalyser der 530 Serie (CA530) der Firma Boule Medical, Stockholm, ist als veterinärmedizinische Ausgabe (-VET) seit dem Jahr 2000 auf dem Markt. Er gehört zu den sogenannten Low-end-unit-Geräten und ist erhältlich in 3 verschiedenen Modellen: Modell THOR mit 20 Parametern, Modell ODEN mit 16 Parametern und Modell MIMER mit 9 Parametern. Gegenstand dieser Evaluierung war das Modell ODEN, welches ein 3-geteiltes Differentialblutbild erstellt. Das Gerät selbst ist ca. 35 cm hoch, 42 cm breit, 45 cm tief und ca. 22 kg schwer. Zubehör sind zwei externe Reagenzienbehälter sowie ein externer Drucker.

a) Funktionsprinzip / Parameterermittlung

Die Zellzählung und Volumenbestimmung erfolgt mittels *Impedanz- oder elektrischer Widerstandsmessung* (siehe Kap. 2.2 a). Jede Zelle, welche die Messöffnung passiert, erzeugt einen elektrischen Impuls. Die Zahl der Impulse ist ein Maß für die Anzahl der Zellen, welche die Öffnung passiert haben. Die Amplitude der Impulse ist dem Volumen der gemessenen Zelle proportional (Abb. 3.2). Mit Hilfe eines Mikroprozessors werden die Ereignisse gezählt bzw. gemessen und die Zellgrößen bestimmt. Für alle Zellarten findet eine Koinzidenzkorrektur statt.

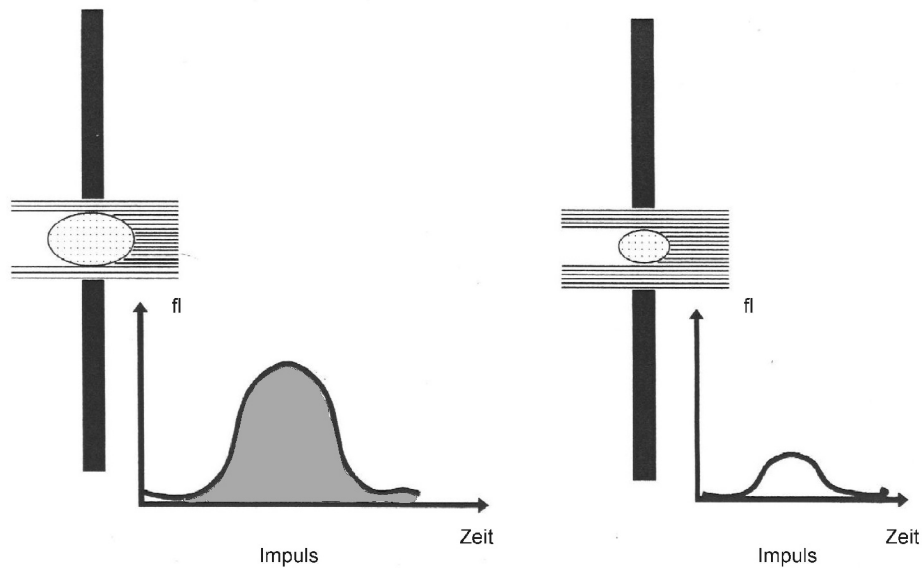


Abb. 3.2: Prinzip der Impedanzmessung: passieren große Partikel die Messöffnung, entsteht ein großer elektrischer Impuls, kleine Partikel ergeben kleine Impulse

Die Zählung der *Erythrozyten (RBC)* und *Thrombozyten (PLT)* im RBC-Kanal beginnt ab einer Partikelgröße von 2,2 fl. Leukozyten sind immer in der Erythrozyten-/Thrombozytenzählung mitenthalten. Dieser Fehler ist jedoch vernachlässigbar, da das Verhältnis der Konzentration zwischen Erythrozyten und Leukozyten ca. 1000:1 beträgt.

Die Software analysiert die Größenverteilungskurven der gezählten Partikel und ermittelt in einem vom Anwender für 9 Tierarten unterschiedlich festlegbaren Grenzbereich die tiefste Stelle der Kurve. An diesem Punkt wird die Grenze zwischen PLT und RBC gesetzt. Alle Zellen links des Schwellenwertes werden als PLT beurteilt, die Zellen rechter Hand des Diskriminators stellen die RBC dar. Für den Fall, dass in dem vom Anwender vorgegebenen Bereich kein Minimum gefunden werden kann, wird die Grenze durch den Analyser eigenständig am tiefsten Punkt der Kurve gesetzt. Die Vorgaben des Anwenders werden dann nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse werden in diesem Fall mit Warnflaggen (FD für Floating Discriminator oder DE für Distribution Error) versehen ausgegeben. Anstelle des variablen Schwellenwertes zwischen PLT und RBC lässt das Gerät dem Anwender die Möglichkeit zur Wahl unbeweglicher Grenzen (Fixed Discriminator) zwischen den beiden Zellpopulationen.

Das *MCV (mittleres Erythrozytenvolumen)* ist hergeleitet aus der RBC-Größenverteilungskurve. Das maximal messbare Erythrozytenvolumen beträgt 250 fl. Ist die RBC-Zahl kleiner als $0,6 \times 10^6/\text{mm}^3$, wird kein MCV-Wert angegeben.

Die weiteren Erythrozytenindizes MCHC (mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten) und MCH (mittlerer Hämoglobingehalt des Einzelerthrozyten) werden anhand der üblichen Formeln errechnet:

$$MCHC(g / dl) = \frac{HGB \times 100}{HKT} \qquad MCH(pg) = \frac{HGB \times 10}{RBC}$$

Der Parameter *RDW (Verteilungsbreite der Erythrozyten, Erythrogramm)*, Maß für die Heterogenität der Erythrozytenpopulation, wird errechnet als Variationskoeffizient (VK%) eines Teiles der Erythrozytengrößenverteilungskurve und ist in Prozent angegeben. Der RDW-Wert ist nur gültig, wenn der MCV-Wert nicht gleich Null ist.

Der *Hämatokritwert (HKT)*, definiert als prozentualer Anteil der Erythrozytenmasse am Gesamtblut, wird errechnet aus Erythrozytenvolumen und Erythrozytenzahl nach folgender Formel:

$$HKT(\%) = MCV \times RBC$$

Der *MPV-Wert*, der *das mittlere Plättchenvolumen* darstellt, ist abgeleitet von der Thrombozytengrößenverteilungskurve und wird definiert als Mittelwert dieser Größenverteilungskurve ab einer Partikelgröße von 2,2 fl bis zum programmierten Schwellenwert.

Die Größenbestimmung, Zählung und Differenzierung der *Leukozyten (WBC)* erfolgt zeitlich parallel zur Erythrozytenzählung nach Zugabe des Lyseagens im WBC-Kanal. Das Gerät verfügt somit über ein zeitsparendes Zweikanalsystem. Durch das Reagenz werden nicht nur die Erythrozyten lysiert, deren Zelldebris dann ein Volumen kleiner als 10 fl hat, sondern auch die Leukozytengröße auf 30 – 80 fl verringert. Die Zählung der WBC erfolgt ab einer Partikelgröße von 35 fl. Die Einwirkzeit des Lyseagens sowie die Zellgröße, ab welcher eine Zelle als Leukozyt gezählt wird, kann vom Anwender bestimmt werden. Ist die Lysezeit nicht ausreichend, so wird dies durch SE-Flaggen (Statistical Error) hinter den ausgegebenen Leukozytenwerten infolge interferierender, schlecht lysierter Erythrozyten signalisiert. Untersuchungen von BOULE-MEDICAL (2000) zufolge wird in der vorliegenden Studie bei der Tierart Hund mit einer um 5 sec verlängerten Lysezeit gearbeitet.

Für die *Leukozytendifferenzierung* ist die Originalzusammensetzung der Reagenzien ausschlaggebend. Die Reagenzien bewirken eine Deformation der weißen Blutzellen und eine Reduktion auf 2 verschiedene Größen. Nach der Zellzählung analysiert die Software die entstandene Größenverteilungskurve. Zunächst werden 2 Gipfel der Kurve ermittelt. Durch Extrapolieren auf die X-Achse wird um die Gipfel der Kurve eine künstliche Verteilung gebildet. Die beiden dabei entstandenen Hauptpopulationen der Leukozytenfraktion stellen die Granulozyten (Gran) und die Lymphozyten (Lym) dar. Die Fläche, die zwischen den Granulozyten und Lymphozyten übrig bleibt, wird als „Midcellarea“ (Mid) klassifiziert, welche aus Monozyten und basophilen Granulozyten besteht (Abb. 3.3). Die Größe dieser 3. Population wird errechnet.

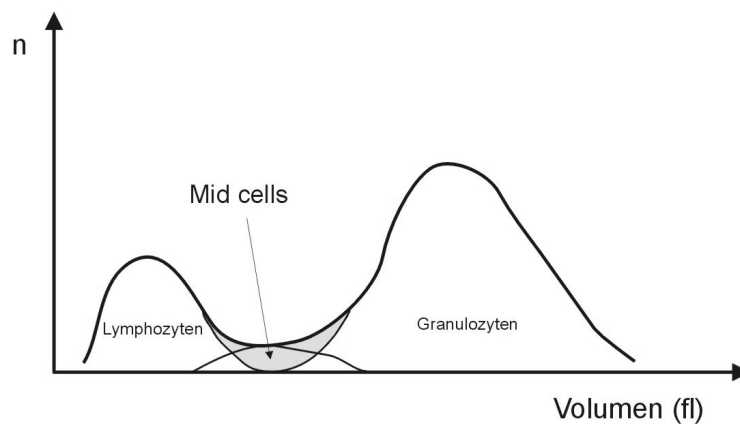


Abb. 3.3: Mathematische Ermittlung der „Midcellpopulation“ über die Größenverteilungskurven der beiden Hauptpopulationen Granulozyten und Lymphozyten

Die Leukozytendifferenzierung arbeitet folglich nicht mit fixierten Schwellenwerten, sondern die Trennlinien zwischen den einzelnen Populationen passen sich individuell für jede Blutprobe der jeweiligen Kurve an. In Bezug zur Gesamtleukozytenzahl wird aus dem linken Teil der Kurve die absolute und prozentuale Lymphozytenzahl (kleine Leukozyten) und aus dem rechten Teil der Kurve der Wert der absoluten und prozentualen Granulozyten (große Leukozyten) errechnet. Die Midcellpopulation (mittelgroße Leukozyten), die hauptsächlich aus Monozyten besteht, ergibt sich durch Subtraktion der Granulozyten- und Lymphozytenzahl von der Gesamtleukozytenzahl.

Wenn sich die Fläche der Granulozyten- mit der Fläche der Lymphozytenpopulation zu sehr überschneidet und keine Trennung der beiden Populationen möglich ist wie z.B. bei altem Blut, wird das Differentialblutbild automatisch nur 2-teilig ausgegeben (siehe Abb. 3.4). Die Monozytenpopulation ist dann in der Lymphozytenpopulation mit enthalten.

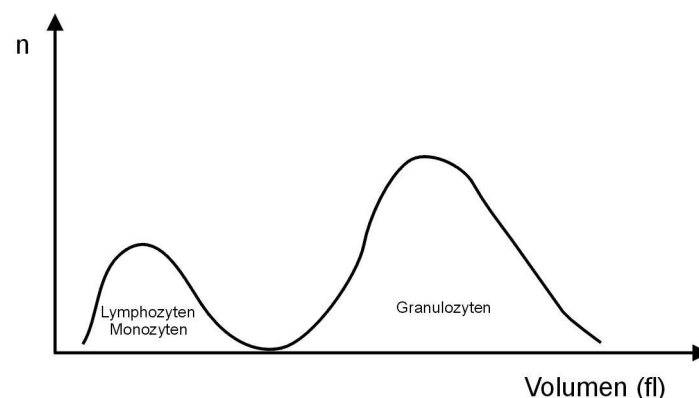


Abb. 3.4: Interferieren die beiden Hauptpopulationen zu stark, entsteht ein 2-teiliges Differentialblutbild (2-part-Diff); die Monozytenpopulation ist in der Lymphozytenpopulation mit enthalten

Als letzter Parameter wird aus derselben Blutverdünnung, aus der die Leukozyten gezählt wurden, der *Hämoglobinwert* ermittelt. Das Photometersystem, bestehend aus einer Wolframlampe, einer Cuvette und einem Filter mit 535 Nanometer (nm) Wellenlänge und 20nm Bandbreite, arbeitet mit cyanidfreiem Lyseagens. Der Hämoglobinwert wird bei bestehender Leukozytose bis $60 \times 10^3/\text{mm}^3$ (Trübung der Suspension) automatisch korrigiert.

b) Probenanalysezyklus im zeitlichen Verlauf

Der CA530-VET ist ein vollautomatisches Blutzellzählgerät. Abbildung 3.5 zeigt das Flussdiagramm des Analysers in Bereitschaftsposition. Nach Aspiration von 125 µl Vollblut werden durch ein Drehventil von der gesamten Probe exakt 25 µl abgetrennt, im Mischbecher mit 5,2 ml Diluent versetzt und so die erste Verdünnung (1:200) hergestellt. Durch die volumetrische Messung bleiben Messeinheit und absolutes Messvolumen konstant. Somit ist keine wiederholte Kalibrierung des Gerätes durch den Anwender nötig. Ein Luftstrom in das Vakuum des Mischbechers führt zur Durchmischung der ersten Verdünnung. Für die RBC- bzw. PLT-Zählung werden von der ersten Verdünnung 25 µl abgetrennt, in der Spritzeneinheit mit 5,2 ml Diluentlösung versetzt (1:40.000) und in der unterhalb des Zylinders der Spritze gelegenen RBC-/PLT- Messkammer analysiert. Für die WBC-Zählung bzw. HGB-Bestimmung werden 2,5 ml der ersten Verdünnung der Spritzeneinheit zugeführt, dort mit 2,5 ml Lyselösung versetzt und als endgültige Verdünnung (1:400) in der WBC-Messkammer analysiert.

Der WBC-Messkammer, welche ebenfalls unterhalb des Spritzenkolbens lokalisiert ist, ist das Photometersystem zur HGB-Bestimmung nachgeschaltet. Die Transferzeit der Lösungen vom Mischbecher in die Spritzeneinheit wird vom System registriert und Fehlermeldungen ausgegeben, sobald die Zeitdauer verlängert (z.B. durch Blockaden) oder verkürzt (z.B. durch zu wenig Flüssigkeit im Mischbecher) ist. Anschließend folgt die automatische Reinigung der Aspirationsnadel von innen und außen, die Mischbecher werden entleert und die Proben in den beiden Messkammern nochmals durchmischt. Durch Senken der Zylinder wird Druck auf die Flüssigkeit in den Zählkammern ausgeübt und die Probe durch die Messöffnung gedrückt. Sobald die Flüssigkeit in der Volumenmesseinheit die Startdetektoren erreicht, beginnt der Messvorgang. Die Messung ist beendet, wenn die Flüssigkeitssäule die Stoppdetektoren erreicht hat. Da die Probenverdünnung selbst nicht bis in die Glaskapillare der Volumenmesseinheit gelangt, wird eine Kontamination der Volumenmesseinheit verhindert. Die Zählzeit für WBC und RBC wird registriert. Die Hämoglobinextinktion wird 10 sec nach Beginn der Leukozytenzählung aus der WBC-Verdünnung gemessen und um den bereits während der Aspirationsphase gemessenen HGB-Leerwert korrigiert. Zum Schluss werden die Mischbecher und die Messkammern mit sauberer Diluent- und Lyselösung gereinigt und neu befüllt.

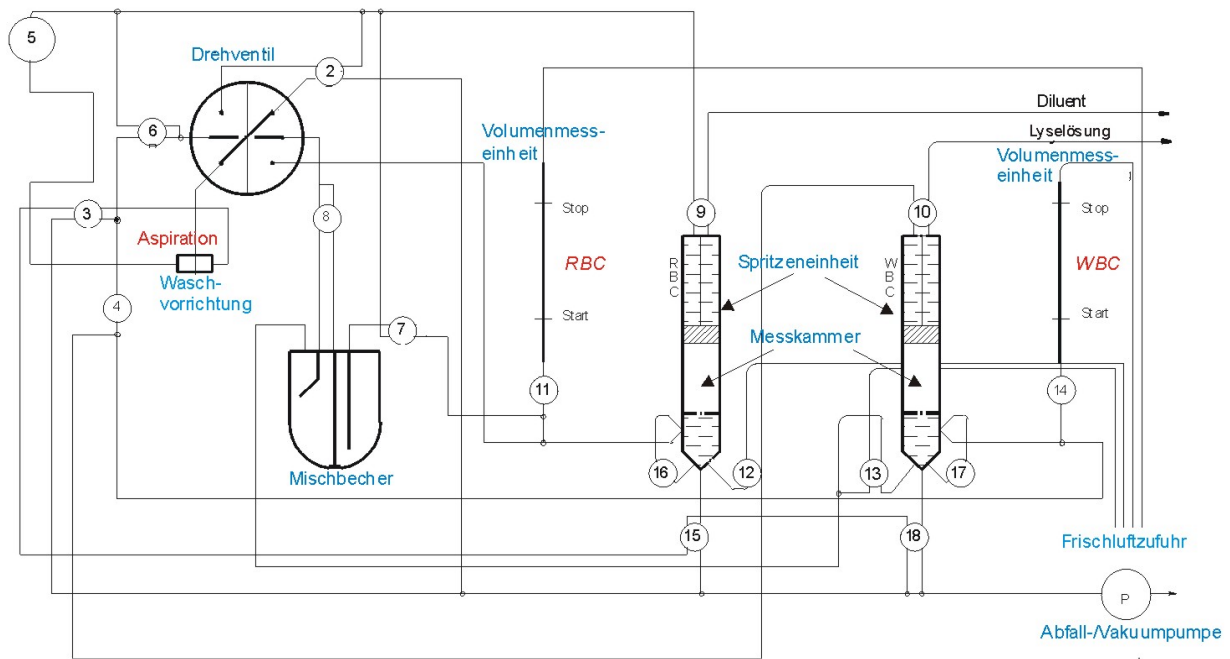


Abb. 3.5: Flussdiagramm des CA530-VET (Bereitschaftsposition): Nach Aspiration von 125 μl Blut werden im Drehventil exakt 25 μl abgetrennt und dem Mischbecher zugeführt und verdünnt. Von dieser ersten Verdünnung werden wiederum Aliquote den Messeinheiten zugeführt, dort mit Diluentlösung bzw. Lyselösung versetzt und gemessen. Die beiden Messeinheiten für RBC/PLT bzw. WBC/HGB bestehen aus jeweils einer Spritzeneinheit, welche die Messkammern mit enthält, und einer Volumenmeseinheit. Die Messkammern befinden sich unterhalb der Zylinder der Spritzen. Die Volumenmeseinheit besteht aus zwei optischen Detektoren und einer flüssigkeitsgefüllten Glassäule. Der WBC-Messkammer ist ein Photometersystem zur HGB-Bestimmung angeschlossen. Die Nummern 2 bis 18 in der Abbildung stellen die einzelnen für den Flüssigkeitstransport zuständigen elektronisch gesteuerten Ventile dar

c) Technische Daten des CA530-VET-16

Die vom Hersteller angegebenen kleinsten und größten durch den CA530-VET messbaren Werte sowie der Linearitätsbereich sind in Tabelle (Tab.) 3.1 für einige Parameter aufgeführt.

Tab. 3.1: Herstellerangaben zum Messbereich des CA530-VET und zu Grenzen, innerhalb derer eine Linearität von $\pm 1\%$ gewährleistet ist

Parameter	Messbereich	Linearität $\pm 1\%$
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0 – 99,9	0,5 – 80,0
RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	0 – 12,99	0,5 – 9,99
MCV (μm^3)	15 – 250	55 – 130
PLT ($10^3/\text{mm}^3$)	0 – 1999	30 – 999
HGB (g/dl)	0 – 55,0	0,5 – 55,0

Die Gerätebedienung erfolgt über ein alphanumerisches Display durch ein Hauptmenü mit 9 Untermenüs. Der Analyser ist programmierbar für 9 verschiedene Tierarten. Für jede Tierart können Normalbereiche definiert werden, deren Über- oder Unterschreiten zu Markierung der betroffenen Parameter führt. Das Aspirationsvolumen aus offenen Probenröhrchen beträgt 125 µl Vollblut (Makromethode) bzw. 5 – 8 ml vorverdünntes Blut (1:200). Das Gerät ist aufrüstbar mit einer Vorrichtung für die automatische Annahme geschlossener Blutröhrchen (Aspirationsvolumen 200 µl Vollblut) oder einem Mikropipettenadapter für die Untersuchung von kapillarem Blut (20 µl Vollblut). Die Aspirationsnadel hat mit 0,7 mm den kleinsten Durchmesser im Gerät. Der Durchmesser der Silikonschläuche im Gerät beträgt 1,0 mm. Die Möglichkeit der Barcode-Eingabe zur leichteren Probenidentifizierung besteht. Die Probenspeicherkapazität beträgt 350 Proben ohne Datenverlust bei Stromausfall. Automatische Datenübertragung ist über eine serielle Schnittstelle (RS232) möglich. Die Arbeitslautstärke ist gering, da keine externen Kompressoren vorhanden sind. Es besteht eine zusätzliche Qualitätssicherung der Ergebnisse durch die Angabe der Zählzeiten für RBC und WBC als Hinweis für Proteinverschmutzung sowie durch die Koinzidenz-Korrektur der Zählergebnisse von RBC, WBC und PLT.

Für die Dauer eines kompletten Messzyklus werden 73 sec veranschlagt. Die Ergebnisse erscheinen bereits ca. 53 sec nach Aspiration der Probe auf dem Display und können ausgedruckt werden. Wird das Gerät 45 min nicht benützt, schaltet es sich automatisch in den Standby-Modus, was den Stromverbrauch von 150 Watt auf 50 Watt reduziert und die Photometerlampe schont. Im Standby-Modus findet alle 4 h eine automatische Spülung (Basiszyklus) statt, um einem Bakterienwachstum in den Schläuchen entgegenzuwirken. Um eine fehlerfreie Funktion des Gerätes zu gewährleisten, müssen die vom Hersteller empfohlenen Originallösungen verwendet werden: isotonische Diluent- oder Verdünnungslösung (Mediton, 10 Liter/Packung, Fa. Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland) und cyanidfreies Lyse- und Hämolyseagensatz für ein 3-geteiltes Differentialblutbild. (Medilyse, 5 Liter/Packung, Fa. Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland). Pro Probe werden 19 ml Diluent und 9 ml Lyse verbraucht. Für Spülvorgänge und Hochfahren aus dem Standby-Modus sind es jeweils 10 ml Diluent und 9 ml Lyse. Das System komplett neu zu befüllen (Füllzyklus), z.B. wenn Luft im System war oder die Lösungen verunreinigt waren, verbraucht 70 ml Diluent und 40 ml Lyse. Der Prozentsatz an Reagenzien, der nicht direkt für einen Probendurchlauf verbraucht wird, der Total Overhead, kann über die Maschinenstatistik im Servicemenü ausgedruckt werden. Der Hersteller kalkuliert ca. 500 Blutproben pro Lösungsmittelset (10 l Diluent/ 5 Lyse), wobei bei ca. 50 Proben/Tag mit einem Diluent/Lyseverhältnis von 2:1 gerechnet wird. Werden weniger Proben gemessen, so wird im Verhältnis mehr Lysemittel verbraucht. Das Gerät zeigt über Detektoren an, welche sich am Ende der Lösungsmittelaspirationsschläuche befinden, wenn der Lösungsmittelvorrat in den Behältern zu Ende geht. Die Lösungen sind bei Raumtemperatur (18 – 30°C) aufbewahrt ungeöffnet bis zum auf der Packung vermerkten Verfallsdatum haltbar. Geöffnet sollten sie nach Empfehlung des Herstellers innerhalb von 3 Wochen verbraucht werden.

d) Kalibration und Qualitätskontrolle


Alle gemessenen Parameter des CA530-VET wurden vom Hersteller kalibriert. Nach Herstellerangaben ist durch die stabile Messeinheit und das mechanisch fixierte absolute Messvolumen für die gezählten Parameter RBC, WBC und PLT eine erneute Kalibration nicht notwendig und wurde daher für die durchgeführten Analysen nicht vorgenommen.

Die Funktion des Gerätes kann mit handelsüblichem Kontrollblut, gemessen über einen speziellen Kontrollblutmodus, überprüft werden. Für Kontrollblut der Firma Boule Medical sind die Schwellenwertbereiche bereits gespeichert. Werden Kontrollen anderer Firmen verwendet, müssen diese manuell gespeichert werden. Ein geräteinternes Qualitätskontrollprogramm, welches sich über Menü (PROBEN-SPEICHER) aufrufen lässt, errechnet automatisch das arithmetische Mittel, die Standardabweichung und den Variationskoeffizienten der zuvor über den Probenspeicher ausgewählten Messungen. Eine weitere Funktionskontrolle stellt die Leerwertmessung dar. Das Aspirationsvolumen bei Anbieten von destilliertem Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung ist erhöht auf ca. 2,8 ml. Die maximal erlaubten Hintergrundwerte betragen für RBC $\leq 0,02$, für WBC $\leq 0,2$, für HGB $\leq 0,1$ und für PLT < 10 Einheiten. Um bakterielle Kontaminationen der Reagenzien auszuschließen, müssen Leerwertzählungen von Zeit zu Zeit auch mit der Verdünnungslösung und der Lyselösung durchgeführt werden.

e) Darstellung der Ergebnisse

Nach Abschluss des Messvorgangs erscheinen auf dem 2 x 15 cm großen Display zunächst die Identifikationsnummer der Probe (ID), die Messsequenz (SEQ), der aktuell eingestellte Printmodus (PRINT) sowie die Zählzeit für RBC und WBC (RBC-/WBC-TIME) und das verwendete Programm (PROG).

ID=123456789012345 SEQ=1234 PRINT=1/2/8
RBC-TIME= 12.9 WBC-TIME= 13.0 PROG= 2

Durch bedienen der Pfeiltaste  auf der Tastatur kann auf dem Display nach rechts zu den einzelnen Ergebnissen geblättert werden:

RBC HCT WBC HGB PLT
6.61 45.8 7.9 16.5 262



MCV RDW MPV MCH MCHC
69.2 8.1 7.2 24.9 36.0



WBC LYM% MID% GRAN%
7.9 21.7 7.5 70.8



WBC	LYM	MID	GRAN
7.9	1.7	0.6	5.6

Die Ergebnisse können entweder automatisch oder auf Wunsch erst nach Betätigen der Print-Taste ausgedruckt werden. Das Druckformat selbst ist wählbar. Es stehen dem Nutzer verschiedene Druckmodi zur Verfügung. Im Druckmodus Nr. 2 beispielsweise werden außer den 16 Parameterabkürzungen, ihren Ergebnissen (angegeben mit Null bis zwei Kommastellen) und den zugehörigen Einheiten (traditionelle Einheiten) auch Größenverteilungskurven für PLT, RBC und WBC mit ausgedruckt (siehe Abb. 3.6).

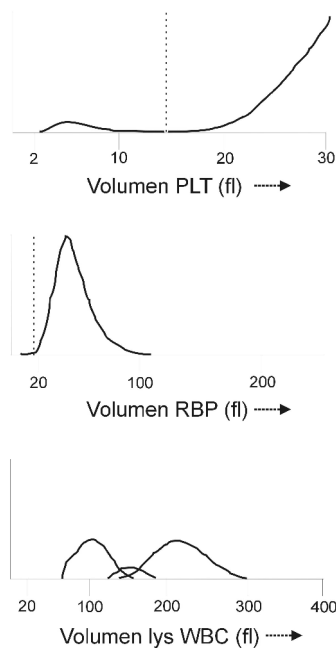


Abb. 3.6: Beispiel Histogramm. Das Zellvolumen (fl) auf der x-Achse ist jeweils gegen die Häufigkeit dieses Ereignisses auf der y-Achse aufgetragen. Da die Kurven „normalisiert“ sind, entspricht die Kurvenhöhe nicht unbedingt der Anzahl der gezählten Zellen. Histogramme sind aber gute Indikatoren für Interferenzen zwischen den verschiedenen Zellarten, z.B. Thrombozytenaggregaten und Leukozyten und zur Plausibilitätsprüfung von Labordaten wichtig

Ein erniedrigtes oder erhöhtes Messergebnis außerhalb des Referenzbereichs wird für die Parameter RBC, PLT, WBC und HGB durch ein L für Low (zu niedrig) und H für High (zu hoch) markiert. Die Referenzbereiche können durch den Nutzer individuell für jede Tierart eingegeben werden. Der CA530-VET besitzt die Funktion, einige Parameter mit Warn- und Fehlerflaggen zu versehen. Diese Markierungen erfolgen unabhängig von der Nutzereinstellung. Bei Auftreten einer Warnflagge könnte eine pathologische Blutprobe vorliegen. Die ausgegebenen Werte können aber als korrekt angenommen werden. Bei Auftreten von Fehlerflaggen wie z.B. SE für Statistical Error muss mit einem falschen Ergebnis gerechnet werden. Eine Wiederholung der Messung ist notwendig. Tabelle 3.2 zeigt eine Übersicht über mögliche vorkommende Warn- und Fehlerflaggen.

Tab. 3.2: Mögliche Warn- und Fehlermarkierungen des CA530-VET

Flagge	Bedeutung	Charakter	Vorkommen
TU	Time-out Upper Detector	E	Parameter RBC, PLT und/oder WBC; Zählzeit zu lange oder zu kurz
TL	Time out Lower Detector	E	Parameter RBC, PLT und/oder WBC; keine Zählzeit messbar, keine Flüssigkeit am unteren Detektor der Messkammer angekommen
SE	Statistical Error	E	Parameter RBC, PLT, WBC; starke Schwankungen des Verhältnisses der Anzahl gezählter Zellen/ Zeiteinheit, möglich durch Zellaggregate und partielle Blockaden
DE	Distribution Error	E/W	Parameter PLT; Gerät konnte für die Größenverteilungskurve kein Minimum zwischen PLT/RBC-Population finden. Schwellenwert vermutlich falsch gesetzt. Bei niedrigen PLT Werten Warnflagge, bei normalen PLT-Werten Fehlerflagge
FD	Floating Discriminator	W	Parameter PLT; durch Gerät selbst ermittelter variabler Schwellenwert PLT/RBC liegt außerhalb des durch den Anwender vorgegebenen Bereichs
OF	Offset error HGB	E	Parameter HGB; Ausgleichsstrom im Photometersystem außerhalb des Sollbereichs
LO	Low blanklevel HGB	E	Parameter HGB; Hämoglobin-Leerwert zu niedrig, automatischer Leerwertabgleich nicht möglich
HI	High blanklevel HGB	E	Parameter HGB; Hämoglobin-Leerwert zu hoch, automatischer Leerwertabgleich nicht möglich
NG	Negative HGB	E	Parameter HGB; HGB-Wert der Probe niedriger als vorher gemessener Leerwert wegen stark fluktuierendem Streulicht
SE	Statistical Error HGB	E	Parameter HGB; statistische Kontrolle der HGB-Stabilität (SD über 25 Messungen) zeigt Schwankungen auf, möglich durch störende Einflüsse bei HGB-Bestimmung
TB	Air bubbles	E	Luftblasen in der Diluentflüssigkeitssäule, die am Startdetektor registriert wurden
NM	No Mode	W	Parameter Differentialblutbild; keine bedeutende WBC-Population gefunden
OM	One Mode	W	Parameter Differentialblutbild; nur eine einzige WBC Population gefunden
TM	Triple Mode	W	Parameter Differentialblutbild; mehr als zwei Populationen gefunden
BD	Bad Distribution	W	Parameter Differentialblutbild; Kurven der Lymphozyten- und Granulozytenpopulation überlappen zu stark

E = Error flag, W = Warning flag, SD = Standardabweichung

3.1.3.2 CELL-DYN 3500

Das Referenzgerät, dieser Studie, der „High-End“-Analyser CELL-DYN 3500 (Abbott Diagnostics Division, Abbott Laboratories, Illinois, USA) ist seit 1992 auf dem Markt. Das Gerät setzt sich aus folgenden Baugruppen zusammen: einer Analyseeinheit (a), einer Datenstation (b) und einem Graphikdrucker (c) (siehe Abb. 3.7). Weiterhin gehören noch 4 externe Reagenzienbehälter zum System.

Zum Einsatz kam das Modell CELL-DYN 3500 SL (SL steht für Sample Loader). Für unseren Gebrauch wurde der Sample Loader (automatisches Probenannahmesystem) entfernt.

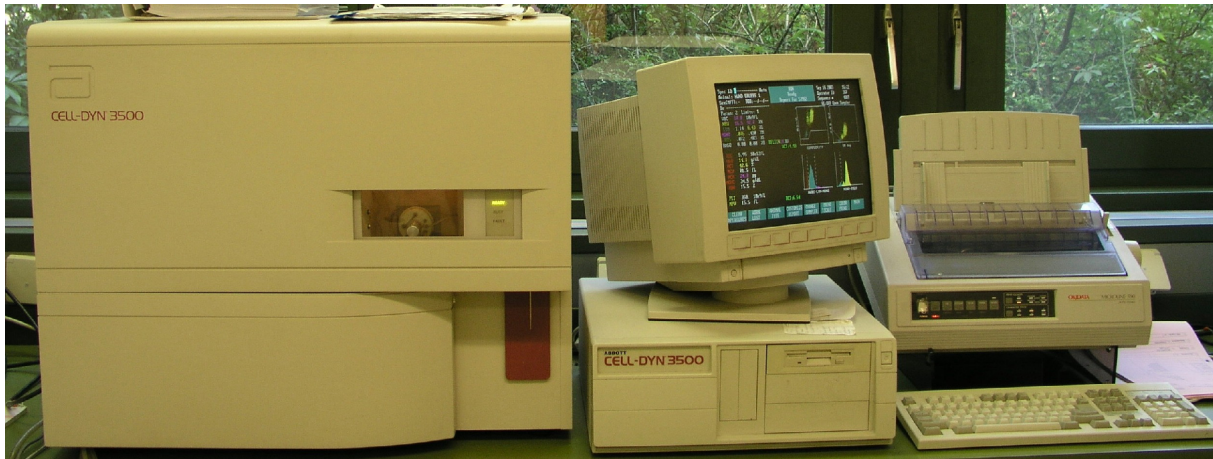


Abb. 3.7: Referenzgerät, der modifizierte CELL-DYN 3500 SL

a) Funktionsprinzip/Parameterermittlung

Als Messprinzipien sind zu nennen: (1) die Impedanzmessung für die Zellzählung und Größenbestimmung der Erythrozyten (RBC) und Thrombozyten (PLT) sowie (2) die optische Messung (Streulicht) in Kombination mit der Impedanzmessung für die Zählung und Differenzierung der Leukozyten (WBC). Die Bestimmung des Hämoglobins (HGB) erfolgt photometrisch (Cyanohämoglobinmethode). Hämatokrit (HKT), Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH) und Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC) werden nach den gängigen Formeln errechnet. Die Parameter Mean Corpuscular Volume (MCV), Red Cell Distribution Width (RDW) und Mean Platelet Volume (MPV) werden abgeleitet aus den RBC- bzw. PLT-Histogrammen (siehe Kap. 3.1.3.1 a).

Die Zellzählung mittels Impedanzmessung erfolgt im „Von-Behrens-Transducer“. Die Von-Behrens-Platte in der Zählkammer verhindert eine Rezirkulation von bereits gemessenen Zellen in den sensitiven Messbereich. Koinzidenzkorrekturen und Korrektur der RBC-Zählung um die WBC-Zahl finden automatisch statt.

Im *RBC/PLT-Kanal* werden grundsätzlich alle Zellen von 1 bis 35 fl Durchmesser zunächst als PLT registriert. Aus dem PLT-Rohwert wird ein Histogramm erstellt. Liegt der Impuls über der unteren RBC-Schwelle von 35 fl, wird er als ein RBC verbucht. Liegen keine Interferenzen zwischen den beiden Zellpopulationen vor, so werden die Schwellen für PLT gewöhnlich bei 2 und 30 fl gesetzt. Sind Interferenzen vorhanden, so gelten bewegliche

Schwellenwerte und zwar für die untere Schwelle im Bereich von 1 bis 3 fl, für die obere Schwelle im Bereich 15 bis 35 fl. Nach Setzen der Schwelle wird der endgültige PLT-Wert aus dem PLT-Histogramm mit Hilfe des Thrombozytenalgorithmus ermittelt.

Die *WBC-Zählung* erfolgt zweifach: zum einen in der Messeinheit für die WBC-Impedanzmessung (WIC), zum anderen in einer optischen Bank bestehend aus einem Helium-Neon-Laser, einer Durchflussküvette, einer Optik und Detektoren. In der Durchflussküvette wird ein definiertes Vollblutvolumen mit dem leukoprotektiven „CELL-DYN Sheath-Reagenz“ verdünnt. Die Leukozyten behalten ihre zelluläre Integrität für die Differenzierung. Im Sheath-Reagenz wird das Hämoglobin durch Osmose aus den Erythrozyten herausgelöst, ohne dass deren Zellmembranen zerstört werden. Die Erythrozytenmembranen haben denselben Brechungsindex wie die sie umgebende Flüssigkeit und erzeugen daher mit Laserlicht kein Streulichtsignal. Von der vorverdünnten Zellsuspension werden 78 µl in den schnell fließenden Sheathmantelstrom des Durchflusszytometers gegeben. Aufgrund der unterschiedlichen Geschwindigkeiten der beiden Flüssigkeiten entsteht eine Laminarströmung, d.h. die Flüssigkeiten vermischen sich nicht. Die konische Bauweise der Küvette und die Geschwindigkeit des Mantelstromes bewirken eine Bündelung und gleichzeitig Vereinzelung der Zellen, was als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet wird. Der durch die optische Messung ermittelte WBC-Wert (WOC) ist für die Mehrzahl der Proben der vorrangig gültige Wert der Leukozytenkonzentration. Differieren WIC- und WOC-Ergebnisse jedoch signifikant voneinander, so analysiert das System die Daten über eine Entscheidungslogik. Das plausible Ergebnis wird als WBC-Konzentration übernommen und entsprechend markiert. Das Prinzip der optischen Mehrwinkelstreudepolarisierung (Multi-Angle-Polarised Scatter Separation) ist in Kap. 2.2c erläutert. Es erlaubt eine Differenzierung der Leukozyten in neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten.

Für die direkte colorimetrische *HGB-Bestimmung* dienen eine HGB-Durchflussküvette, eine LED-Lichtquelle, ein Filter für das Erzielen einer Wellenlänge von 540 nm sowie ein Photodetektor für die Messung des Durchlichts. Bei der nach der Hämoglobin-Cyanidmethode durchgeführten HGB-Bestimmung wird das HGB durch das cyanidhaltige WIC-/HGB-Lyse-Reagenz in einen Hämoglobin-Cyanidkomplex umgewandelt. Die Hämoglobinkonzentration ist der Absorption der Probe bei 540 nm direkt proportional (direkte Spektrometrie). Der Mittelwert von 5 Messungen ohne Berücksichtigung des höchsten und tiefsten Wertes dient als Hämoglobin-Rohwert. Der HGB-Rohwert wird automatisch korrigiert um den Mittelwert aus 5 Leerwertmessungen und um die WBC-Zählung. Hohe WBC-Zahlen beeinflussen die HGB-Messung im Photometer. Bei WBC >250.000 wird kein Hämoglobinwert angegeben.

b) Probenanalysezyklus

Das vollautomatisch arbeitende Gerät aspiriert ein Probenvolumen von 130 µl Vollblut. In einem 3-teiligen Scherventil werden von der Probe für die optische WBC-Zählung (WOC) ein

Volumen von 32 µl, für die Impedanzmessung der Leukozyten (WIC) und die HGB-Bestimmung 20 µl sowie für die RBC/PLT-Zählung 0,74 µl abgetrennt und anschließend mit den entsprechenden Reagenzien verdünnt (Makromethode).

In den beiden Volumenmeseinheiten für die RBC/PLT- und die WBC-Impedanzzählung (WIC) wird eine definierte Menge der Blutverdünnung (volumetrische Messung) abgemessen: 100 µl für RBC/PLT bzw. 200 µl für WIC. Im Von-Behrens-Transducer erfolgt dann die Zählung der Zellen mittels Impedanzmessung. Aus derselben Verdünnung wie der WIC wird anschließend in der Photometereinheit das Hämoglobin gemessen. Die optische Zählung und Differenzierung der Leukozyten (WOC) findet in einem gesonderten Kanal statt und liefert einen weiteren Wert für die Gesamtleukozytenzahl sowie ein 5-teiliges Differentialblutbild. Das Gerät verfügt also über 4 Messkanäle: eine Laseroptik für den WOC und die WBC-Differenzierung, 2 Widerstandsmesskanäle für den WIC und die PLT/RBC-Zählung sowie eine Photometereinheit zur Hämoglobinbestimmung.

Für die Analyse und Berechnung der Ergebnisse aller Parameter werden alle gemessenen Daten an die Datenstation übertragen.

c) Technische Daten des CELL-DYN 3500

Der CELL-DYN 3500 ist mit Human- oder Veterinärsoftware erhältlich. Im Gegensatz zu den Einstellungen für Humanblutproben existieren für die Tiermedizin keine vorgegebenen Grenzwerte für den Messbereich, bei deren Überschreitung Markierungen (>>>>) hinter die betroffenen Parameter gesetzt werden. Es gilt für die Anzeige der Hämogrammparameter WBC, RBC, HGB, MCV und PLT auf dem Bildschirm der Höchstwert 9999 x (Einheit) als Limit. Eine Linearitätsbeschränkung für die Veterinärmedizin ist nicht gegeben. Die Gerätebedienung erfolgt über ein Hauptmenü mit 8 Untermenüs. Es sind Gerätekonfigurationen für 60 Tierarten speicherbar. Pro Tierart können bis zu 4 Gruppen von Grenzwerteinstellungen eingegeben werden, bei deren Überschreitung eine farbige Unterlegung der Ergebnisse der betroffenen Parameter erfolgt. Für die gängigsten Tierarten sind vom Hersteller Einstellungen vorgegeben, weitere Spezies sind vom Benutzer hinzuzufügen. Ein Probenspeicher für 9999 Proben sowie ein Barcode-Reader ist vorhanden. Die Arbeitslautstärke beträgt 68 Decibel. Verfälschte Impulse aufgrund von nichtaxialem Durchgang der RBCs durch die Messöffnung werden als Zelle gezählt, gehen aber nicht in den MCV und die RBC-Volumenverteilungskurve ein (Red Cell Editing Ratio (RER)).

Nach Herstellerangaben dauert ein Probenlauf (von Ready bis Ready) 37 sec, ein Auto-Start-Zyklus aus dem Standby etwa 3,5 min, ein Auto-Start-Zyklus nach dem Einschalten etwa 5 min und ein Shutdown (Überführen in Standby) ca. 4,5 min.

Der CELL-DYN 3500 arbeitet mit 4 verschiedenen Reagenzien: 1. ein Verdünnungsmittel für die WIC/HGB- und die PLT/RBC-Messung. 2. ein WIC/HGB-Lyse-Reagenz für eine rasche Lyse der RBC, für die Entfernung des Zytoplasmas der Leukozyten, wobei die Zellkernmembran zur Zählung der Kerne intakt bleibt, und für die Umwandlung von Hämoglobin in den messbaren Hämoglobincyanidkomplex (Quarternäres Ammoniumlysat

nimmt als Chromagen teil). 3. ein Detergens für die Leerwertmessung bei Hämoglobinphotometrie und als Spüllösung für die Zählkammern, die Volumenmeseinheiten und die Hämoglobindurchflussküvette sowie 4. ein Sheath-Reagenz für die osmotische Lyse der Erythrozyten, welches die optische Lichtstreuungseigenschaften der Leukozyten für die Dauer der Messung aufrechterhält, als Mantelstromreagenz für die hydrodynamische Fokussierung fungiert und für die WOC-Leerwertmessung benötigt wird. Der Lösungsmittelverbrauch pro Probe liegt bei 34,2 ml Diluent, 0,8 ml WIC/HGB-Lysereagenz, 22 ml Detergens und 14,2 ml Sheath-Reagenz.

Die Software ermöglicht Markierungen für atypische Verteilungen, atypische Parameter, atypische Zellpopulationen sowie interpretierende Hinweise (siehe Tab. 3.3).

Herstellerangaben zu Präzision (Variationskoeffizient %), Richtigkeit (Korrelation r), Linearitätsbereichen und Verschleppung (K-Wert %) für Hund und Katze sind im Anhang Kap. 9.1 in den Tab. 9.1 bis 9.4 zu finden. Tabelle 4.11 in Kap. 4.5.1.3 stellt die Ergebnisse des im Rahmen dieser Studie durchgeführten Vergleichs des CELL-DYN 3500 mit der Mikrohämatokritmethode und der manuellen Differenzierung dar.

d) Kalibration und Qualitätskontrolle

Eine Kalibration durch den Hersteller findet grundsätzlich bei Installation statt, sowie wenn nötig bei Wartung oder Austausch von Geräteteilen durch den Techniker. Ein internes Qualitätskontrollprogramm vergleicht die aktuell gemessenen Blutkontrollen mit den eingegebenen bzw. über Disketten eingelesenen Sollwerten und unterlegt Parameter, welche die vorgegebenen Grenzen über- bzw. unterschreiten, farblich. Das Gerät führt beim Hochfahren automatisch eine Leerwertmessung durch, prüft alle wichtigen Funktionseinheiten und meldet Unstimmigkeiten (Self-Test). Herstellergegebene Grenzwerte für die Leerwertmessung sind für WBC $0,5 \times 10^9/l$, für HGB 0,2 g/dl, für RBC $0,05 \times 10^{12}/l$ und für PLT $10 \times 10^9/l$.

e) Darstellung der Ergebnisse

Es können sowohl für die Bildschirmansicht als auch für den Ausdruck verschiedene Modi gewählt werden. Auf dem Bildschirm werden außer den 20 Parametern mit Markierungen je 2 vom Anwender ausgewählte Scatter- und Histogramme angezeigt. Die üblichste Einstellung ist ein Streudiagramm für Komplexität 0° bis 10° und eines für Granularität gegen Lobularität sowie ein RBC-Histogramm und ein PLT-Histogramm (siehe Abb. 3.8). Alle weiteren Graphiken können über Menü zur Ansicht extra angewählt werden.

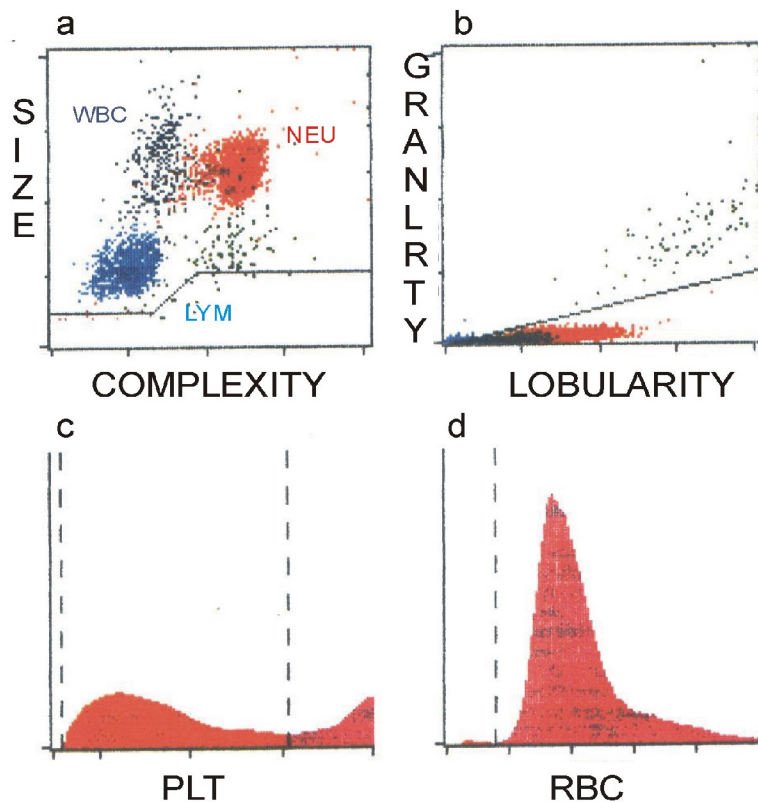


Abb. 3.8: Graphische Ergebnisdarstellung des CELL-DYN 3500. Streudiagramm für Komplexität 0° bis 10° (a) und für Granularität gegen Lobularität (b), sowie ein PLT-Histogramm (c) und ein RBC-Histogramm (d)

Außer allgemein interpretierenden Hinweisen wie z.B. Anämie, Leukopenie, Thrombozytose etc. sind im Veterinärprogramm die in Tab. 3.3 aufgeführten Markierungen atypischer Zellpopulationen und atypischer Parameter aktiv. Der Deskriptor WOC (optische Messung der Leukozyten mittels Laserstrahl) erscheint, wenn die Messwerte der optischen Messung und der Impedanzmessung differieren und sich das System nach Analyse der Daten für die optische Messung (WOC) als richtigen Wert entschieden hat. Ursache für die Differenz können kernhaltige rote Blutzellen (Normoblasten, Erythroblasten, engl. NRBC = Nucleated Red Blood Cells) sein, die den WIC-Wert falsch hoch werden lassen, den WOC-Wert aber nicht beeinflussen.

Tab. 3.3: Markierungen (M) atypischer Zellpopulationen und atypischer Parameter sowie Deskriptoren (D) des Veterinärprogramms

Flagge	Bedeutung	Charakter	Vorkommen
WBC	Abweichungen zwischen WIC- und WOC-Wert	M	Ergebnisse atypisch, genauer WBC-Wert nicht bestimmbar
DFLT(NLMEB)	„Default“-Einstellung (für Differenzierung wird voreingestellte Standard-schwelle verwendet)	M	Hinweis auf Vorhandensein atypischer Zellwolken, Gerät kann diese nicht zuverlässig trennen
NWBC	Non-WBC (= Nicht-Leukozyt)	M	Möglicherweise Erythroblasten, unlysierte Erythrozyten, Thrombozytenaggregate, Riesenthrombozyten, WIC = WOC
FWBC	Fragile WBC (= Instabile Leukozyten)	M	WBC gehen während Messung kaputt, z.B. bei chronischer lymphatischer Leukämie. WOC-Wert wurde kinetisch korrigiert
NRBC	Nucleated RBC (= Kernhaltiger Erythrozyt)	M	Kernhaltige Erythrozyten, Thrombozytenaggregate, Riesenthrombozyten, WIC > WOC
RRBC	Resistente RBC (= Lyseresistente Erythrozyten)	M	Vorkommen bei bestimmten Tierarten z.B. alle Vogel- und Reptilienproben, WOC > WIC
WIC	Abweichung der Werte vom WOC	D	Unstimmigkeiten bei Leukozytenzählung, WIC-Wert wird ausgegeben
WOC	Abweichung der Werte vom WIC	D	Unstimmigkeiten bei Leukozytenzählung, WOC-Wert ausgegeben
KWOC	Kinetisch korrigierte WOC-Zählung	D	Kaputte WBC werden mitgezählt, Wert sehr grob geschätzt, nicht 100%ig verlässlich, oft zusammen mit FWBC erscheinend

3.2 Methoden

3.2.1 Gerätewartung und Voreinstellung

Beide Analyser wurden vor Beginn der Messungen durch Leerwertmessungen und Kontrollblutmessungen auf fehlerfreie Funktion getestet. Der CELL-DYN 3500 überprüft den Gerätehintergrund nach dem Hochfahren durch automatische Leerwertmessungen selbständig. Beim CA530-VET wurde vor jeder Messserie der Hintergrund durch Aspiration von destilliertem Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung überprüft und darauf geachtet, dass die maximal erlaubten Hintergrundwerte (siehe Kap. 3.1.3.1 d) nicht überschritten werden. Für den CELL-DYN 3500 wurde täglich bei Arbeitsbeginn Kontrollblut (Para 12 Plus, Fa. Streck Laboratories Inc., La Vista, USA) in 3 Konzentrationen gemessen und auf Abweichungen von den vom Hersteller angegebenen gerätespezifischen Sollwerten

geachtet. Da während der Studie noch kein Kontrollblut speziell für die veterinärmedizinische Version des CA530 zur Verfügung stand, wurde für den CA530-VET dasselbe Kontrollblut verwendet wie für den CELL-DYN 3500. Die Ergebnisse der täglichen Kontrollblutmessungen in 3 Konzentrationen wurden auf Wertekonstanz überprüft (siehe Kap. 4.4 c Präzision der Kontrollblutmessung) und die mittleren Differenzen zwischen den Messergebnissen der Kontrollblutmessungen durch den CA530-VET und den Sollwerten des Herstellers für den CELL-DYN 3500 genauer betrachtet (siehe Kap. 4.5 Richtigkeit der Analyseergebnisse).

Als Gerätepflege wurde beim CELL-DYN 3500 täglich ein Spülzyklus (Autoclean-Funktion) mit enzymatischer Reinigungslösung (Streck-Kleen, Enzymatic Cleanser Concentrate, Fa. Streck Laboratories Inc., La Vista, USA) in der Verdünnung 1:20 durchgeführt. Die Aspirationsnadel des CA530-VET und ihr Spülbecher wurden täglich mit einem alkoholgetränkten Tupfer gereinigt, und es wurde eine Leerwertmessung mit enzymatischer Reinigungslösung durchgeführt. Schläuche und Ventile des CA530-VET wurden nach Entfernung der Abdeckung in regelmäßigen Abständen mit destilliertem Wasser von Salzkrusten befreit und abgetrocknet.

Der CELL-DYN 3500 wurde 2-mal jährlich komplett gemäß Wartungsprotokoll gewartet. Eine komplette Wartung des CA530-VET fand innerhalb des Zeitraumes der Studie von ca. 1 Jahr einmal statt. Durchgeführt wurde die Wartung sowie die Gerätekalibration bei beiden Geräten durch Techniker der Herstellerfirmen zu Beginn der Studie.

Was den CA530-VET betrifft, wurden alle weiteren erwähnten Maßnahmen zur Gerätepflege und Kontrolle sowie alle im folgenden aufgeführten Untersuchungen (auch mittels manueller Methoden) und die Auswertung von einer Person durchgeführt. Die Überwachung des Referenzgerätes CELL-DYN 3500 sowie die Probenanalyse am CELL-DYN 3500 wurden zumeist vom Laborpersonal der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere übernommen.

Der CA530-VET arbeitete mit den in Tab. 3.4 angegebenen Einstellungen der Diskriminatorgrenzen/Lysezeiten für die einzelnen Tierartprogramme. Diese waren vom Hersteller vorgegeben und wurden über den Zeitraum der Messungen nicht verändert.

Tab. 3.4: Diskriminatorgrenzen- und Lysezeiteneinstellungen des CA530-VET während der Studie

Programm	PLT-L	PLT-H	DM	L/ML/D	L-Time	G/MH
2 (Hund)	12 fl	23 fl	3	65 fl	5 sec	
3 (Katze)	12 fl	20 fl	3	65 fl	0 sec	
4 (Pferd)	12 fl	20 fl	3	65 fl	0 sec	
8/9 (Human-/ bzw. Kontrollblut)	15 fl	30 fl	1	40 fl	0 sec	330 fl

PLT-L = Diskriminatoruntergrenze für Thrombozyten; PLT-H = Diskriminatorobergrenze für Thrombozyten; DM = Differential Mode, Differenzierungsprozedur/Algorithmus: DM = 1 Human- bzw. Kontrollblut, DM = 2 fixierte Grenzen, DM = 3, variable Grenzen (floating discriminator); L/ML/D = Untergrenze für Leukozytenzählung; L-Time = zusätzlich verlängerte Lysezeit in Sekunden (sec); G/MH = Obergrenze für Granulozytenzählung

Zu Beginn der Studie wurde der CA530-VET an den CELL-DYN 3500 über die Kalibrationsfaktoren für Vollblut folgendermaßen angeglichen: Erythrozyten (RBC): +6,1 %, Mean Corpuscular Volume (MCV): -4,6 %, Thrombozyten (PLT): +25,3 %, Mean Platelet Volume (MPV): +0,0 %, Hämoglobin (HGB): -10,0 %, Leukozyten (WBC): -4,5 %, Lymphozyten (Lym): +0,0 %, Granulozyten (Gran): +0,0 %. Der Parameter Red Cell Distribution Width (RDW) % wurde nicht kalibriert.

3.2.2 Verschleppung („Carry-Over“)

Zur Bestimmung der Verschleppung von Blut innerhalb des Gerätes aus der zuvor gemessenen Probe in die nächste Probe, wurde nach 3facher Analyse von Blut hoher Konzentration (h_1, h_2, h_3) eine Probe niedriger Konzentration 3fach gemessen (l_1, l_2, l_3) und die „Carry-Over-Ratio“ [K] in Anlehnung an die Formel nach BROUGHTON et al. (1969) (siehe Kap. 3.2.5 Statistische Auswertung) bestimmt. Die Untersuchung erfolgte für die Parameter RBC, WBC, PLT und HGB mit humanem stabilisiertem Kontrollblut in hoher und niedriger Konzentration.

3.2.3 Präzision

a) Präzision in Serie (Kurzzeitstabilität)

Zur Bestimmung der Präzision in Serie wurden je Tierart 5 Blutproben jeweils 10-mal direkt hintereinander mit dem CA530-VET gemessen. Zwischen den einzelnen Proben wurde die Aspirationsnadel mit einem Tupfer getrocknet, um auch die minimalste Probenverdünnung zu vermeiden. Die Auswertung erfolgte getrennt nach Tierarten.

b) Präzision der Wiederholungsmessung (Doppelbestimmung)

Die Proben aus dem Methodenvergleich ($n=550$) wurden durch den CA530-VET ohne Zeitverzögerung 2-mal analysiert. Die Präzision dieser Doppelbestimmung wurde für jede Tierart getrennt berechnet.

c) Präzision der Kontrollblutmessung (Langzeitstabilität)

Für die Untersuchung auf Langzeitstabilität wurden die Ergebnisse der Messungen von humanem stabilisiertem Kontrollblut herangezogen. Einmal pro Tag wurden drei verschiedene Kontrollblutchargen insgesamt 35-mal jeweils in drei verschiedenen Konzentrationen gemessen. Daraus ergaben sich 105 Messungen. Die einzelnen Kontrollblutchargen wurden jeweils etwa für ein bis eineinhalb Monate verwendet. Der gesamte Zeitraum der Untersuchung betrug ca. ein Jahr. Unter Einbeziehung der Wechselwirkung von Charge und Konzentration wurde die Präzision des Kontrollblutes berechnet.

e) Präzision der Referenzmethoden

Die Präzision des CELL-DYN 3500 wurde im Rahmen unserer Studie nicht überprüft. Es sei hier auf die Herstellerangaben im Anhang, Kap. 9.1, verwiesen. Die Präzision der manuellen Thrombozytenzählung für die Tierarten Katze und Pferd sowie die Präzision der manuellen Leukozytendifferenzierung aller auch durch den CA530-VET differenzierten Blutbilder wurde innerhalb des Methodenvergleichs als Präzision einer Doppelbestimmung ermittelt. Die Präzision des Mikrohämatokrits errechnete sich aus einer Fünffachbestimmung des Hämatokritwertes von jeweils 5 Blutproben je Tierart.

3.2.4 Richtigkeit

Zur Bestimmung der Richtigkeit des Referenzgerätes wurde humanes stabilisiertes Kontrollblut in 3 Konzentrationen verwendet. Für den CELL-DYN 3500 galten gerätespezifische Referenzwerte, welche für jede Kontrollblutcharge neu in die Datenstation eingegeben wurden und bei deren Über- oder Unterschreitung die betroffenen Parameter automatisch farbig unterlegt wurden. Die Angaben sind gerätespezifisch, d.h. sie gelten nur für die angegebenen Geräte bzw. Modelle, da sie an deren Methodik angepasst sind. Für den CA530-VET lagen keine gerätespezifischen Referenzwerte vor. Um dennoch eine Aussage über die ungefähre Lage der einzelnen Parameter des CA530-VET machen zu können, wurden die mittleren Differenzen zwischen den Messergebnissen der Kontrollblutmessungen durch den CA530-VET und den vom Hersteller für den CELL-DYN 3500 angegebenen Sollwerten berechnet und genauer betrachtet.

3.2.4.1 Methodenvergleich

A Gerätevergleich

Für den Gerätevergleich wurden 488 Blutproben möglichst zeitgleich durch die beiden Analyser untersucht und zwar einmalig durch den CELL-DYN 3500 und 2-mal hintereinander durch den CA530-VET. Die Reihenfolge der Untersuchung war zufällig. Es wurde keine Vorauswahl getroffen. Jede Messung, auch mit Warnmarkierung, ging in die Auswertung mit ein. Unter Ausnahme des Differentialblutbildes wurde jeweils nur die erste Messung des CA530-VET mit der CELL-DYN 3500 Messung verglichen. Für die Parameter Leukozyten (WBC), Erythrozyten (RBC), Hämoglobin (HGB), Mean Corpuscular Volume (MCV), Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC), Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH), Mean Platelet Volume (MPV) und Red Cell Distribution Width (RDW) sowie Thrombozyten (PLT) beim Hund galt der Gerätevergleich mit dem CELL-DYN 3500 als Referenz. Für die Parameter Hämatokrit (HKT), Thrombozyten (PLT) bei Pferd und Katze sowie für das Differentialblutbild dienten die unter B aufgeführten Standardmethoden als Referenz.

Um die Effizienz des Gerätes in Extrembereichen zu überprüfen, erfolgte die Auswertung des Gerätevergleichs für die Parameter RBC und WBC zusätzlich für den subnormalen, normalen und erhöhten Wertebereich gesondert.

B Standardmethoden

Für den Vergleich des CA530-VET und ergänzend auch des CELL-DYN 3500 mit den Standardmethoden wurden folgende Untersuchungen durchgeführt: (1) für alle Tierarten die einmalige Bestimmung des Mikrohämatokrits mittels Zentrifugenmethode, (2) für Katze und Pferd die manuelle Thrombozytenzählung (2fache Auszählung) und (3) für alle Tierarten eine manuelle Differenzierung der Leukozyten (2 x 100 Zellen) derjenigen Proben, für welche auch der CA530-VET in der Lage war, zumindest ein 2-teiliges Differentialblutbild zu erstellen.

Zur Bestimmung des *Mikrohämatokrits* wurde, eine sorgfältige Durchmischung der Blutprobe vorausgesetzt, das Probenröhrchen und die Hämatokritkapillare (Mikrohämatokritkapillare, Natriumheparin beschichtet, Fa. Brand GmbH, Wertheim) schräg gehalten und ein Ende der Kapillare in die Probe getaucht, bis das Blut mittels Kapillarkraft zu 3/4 bis 4/5 in der Kapillare hochgestiegen war. Das nicht benetzte Ende der Kapillare wurde mit Spezialkitt (Hämatokritversiegelungskitt, Fa. Brand GmbH, Wertheim) verschlossen, Blutreste am Kapillarenäußeren entfernt und die versiegelte Kapillare mit dem verschlossenen Ende nach außen in den Zentrifugeneinsatz gelegt. Die Zentrifugation erfolgte über 5 min bei 12.000 Umdrehungen/min (Mikrohämatokritzentrifuge Hämofuge (14.926 g), Fa. Heraeus Sepatech, Heraeus Holding GmbH, Berlin). Danach wurde der Hämatokritwert in der üblichen Weise durch eine Hämatokritablesetabelle ermittelt.

Die *manuelle Zählung der Thrombozyten* erfolgte durch Kammerauszählung (Zählkammer nach Neubauer, altes Modell) mit Hilfe des Thrombo-Plus-Solotests für die direkte Zählung der Thrombozyten (Fa. Sarstedt, Nümbrecht). Exakt 100 µl von mit K₃-EDTA ungerinnbar gemachtem venösem Blut wurden mit einer Pipette (Eppendorfpipette, Fa. Eppendorf, Hamburg) in die Teströhrchen gegeben und gut durchmischt. Die vom Hersteller vorgefertigten Teströhrchen enthalten 2 ml Hämolyselösung. Nach 10-minütiger Einwirkungszeit wurde die mit einem Deckglas (Deckgläser, plan geschliffen für Hämozytometer, Fa. Menzel Gläser, Braunschweig) abgedeckte doppelte Zählkammer mit dem am Stopfen der Teströhrchen befindlichen Probeträger von beiden Seiten befüllt. Die Auszählung der Thrombozyten erfolgte nach Sedimentierung von knapp 5 min. Es wurden je Seite 5 Gruppenquadrate mittels Hellfeldmikroskop (Standardmikroskop, Standard 20, Fa. Carl Zeiss, Germany) und 40er Objektiv ausgezählt. Die Berechnung der Thrombozytenzahl pro µl erfolgte durch Addition aller Thrombozyten in den 5 Gruppenquadraten je Kammer und Multiplikation mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor 1000. Die entgeltige Thrombozytenzahl ergab sich aus dem Mittelwert der beiden ausgezählten Kammern.

Für die Erstellung des *manuellen Differentialblutbildes* wurden für jeden Patienten 2 Blutausstriche angefertigt und mittels Färbeautomaten (Haemomat, Fa. Biomed, Oberschleißheim) nach Pappenheim gefärbt. Für die panoptische Färbung nach Pappenheim wurden die Objektträger (Objektträger, entfettet mit Mattrand, Fa. Menzel Gläser, Braunschweig) zunächst 5 min mit May-Grünwald-Lösung (Eosin-Methylenblau-Lösung, modifiziert für die Mikroskopie, Fa. Merck, Darmstadt) gefärbt, dann 1 min in Aqua destillata gespült. Anschließend folgte eine 20-minütige Nachfärbung mit Giemsa-Lösung

(Azur-Eosin-Methylenblaulösung für die Mikroskopie, methanolhaltig, Fa. Merck, Darmstadt) und eine erneute Spülung mit destilliertem Wasser über ca. 1 min. Nach Trocknung der Objektträger wurde das Präparat in der 50er oder 100er Vergrößerung mit Ölimmersion (Paraffinöl) mäanderförmig von links nach rechts durchgemustert und alle Leukozyten differenziert. Pro Ausstrich wurden 100 Leukozyten erfasst und mittels eines manuellen Zählgerätes (Counter Assistent AC12, Zählgerät für Leukozytendifferenzierung, Fa. Karl Hecht, Sondheim) festgehalten. Stabkernige und segmentkernige neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Normoblasten wurden berücksichtigt und die Ergebnisse in Prozent angegeben. Die Auszählung wurde auf die Ausstriche der Patienten beschränkt, für die der CA530-VET mindestens in einer Messung ein 2- oder 3-teiliges Differentialblutbild ausgegeben hatte.

Verglichen wurde (1) eine einfache Mikrohämatokritmessung mit dem HKT-Wert der 1. Messung des CA530-VET, (2) der Mittelwert der 2fachen manuellen Zählung der Thrombozyten in der Zählkammer nach Neubauer mit dem PLT-Wert der 1. Messung (CA530-VET) und (3) der Mittelwert der Differenzierung von 2 x 100 Leukozyten, gefärbt nach Pappenheim, mit vornehmlich der 1. Messung des CA530-VET. Fehlte das Differentialblutbild in der 1. Messung oder war es unvollständig und lag dagegen in der 2. Messung komplett vor, so wurde die manuelle Zählung mit der 2. Messung des CA530-VET verglichen. Das manuelle 7-teilige Differentialblutbild wurde für den Vergleich in ein 3-teiliges Differentialblutbild übersetzt, bestehend aus Granulozytenpopulation, Midcellpopulation und Lymphozytenpopulation (siehe Kap. 4.4 d).

Zusätzlich wurden für die Parameter HKT und PLT die Unterschiede zwischen den manuellen Methoden und dem Testgerät wiederum für den subnormalen, normalen und erhöhten Wertebereich gesondert betrachtet.

3.2.5 Statistische Auswertung

Die erzielten Messwerte und alle weiteren Daten wurden ausgewertet mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 11.0 für Windows (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, USA).

Die „*Carry-Over Ratio*“ [K] gilt als Maß für die Verschleppung von Blut innerhalb des Gerätes. Der K-Wert wurde über folgende Formel nach BROUGHTON et al. (1969) bestimmt:

$$K\% = \frac{l_1 - l_3}{h_3 - l_3} \cdot 100$$

H₁, h₂ und h₃ stehen für 3 aufeinander folgende Messungen von Blut hoher Konzentration, denen sich mit l₁, l₂ und l₃ 3 aufeinanderfolgende Messungen von Blut niedriger Konzentration anschließen. Der Mittelwert von 10 Bestimmungen für [K] wurde errechnet und zusammen mit dem kleinsten und größten K-Wert in Prozent angegeben (Kap. 4.3.2 Tab. 4.3). Im Anhang (Kap. 9.3 Tab. 9.6) sind die einzelnen K-Werte der Messungen für die Parameter RBC, WBC, PLT und HGB aufgeführt.

Der Begriff *Präzision* ist durch das Deutsche Institut für Normung e.V. definiert als die qualitative Bezeichnung für das Ausmaß der gegenseitigen Annäherung voneinander unabhängiger Ermittlungsergebnisse bei mehrfacher Anwendung eines festgelegten Ermittlungsverfahrens unter vorgegebenen Bedingungen (DIN 55350, 1987). Sie beschreibt die Lage der einzelnen Messergebnisse zueinander. Die Wiederholpräzision ist die Präzision unter Wiederholungsbedingungen und gibt die Reproduzierbarkeit bzw. Wiederholbarkeit der Messungen im qualitativen Sinne an.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird als Maß für die Präzision der Messfehler und der Variationskoeffizient angegeben. Der Messfehler charakterisiert die Variation innerhalb der Messwiederholungen unter denselben Bedingungen und wurde berechnet aus der Wurzel der mittleren Varianz dieser Mehrfachmessung. Anders ausgedrückt gibt er die Streuung an, die in den Wiederholungen liegt. Die Einheit des Messfehlers entspricht der des jeweiligen Parameters. Der Variationskoeffizient wird errechnet aus dem Messfehler dividiert durch den arithmetischen Mittelwert aller in die Berechnung des Messfehlers eingegangen Daten.

Im Anhang sind der Messfehler, das arithmetische Mittel und der daraus errechnete Variationskoeffizient in Prozent angegeben (siehe Kap. 9.4 Tab. 9.7 bis 9.10).

Die Auswertung der Daten aus dem *Methodenvergleich* erfolgte mit Hilfe des modifizierten Verfahrens nach Bland-Altman (BLAND und ALTMAN, 1986a). Die Untersuchungsmethode nach Bland und Altman findet ihren Einsatz bei Vergleichsuntersuchungen, bei denen der „wahre Wert“ nicht bekannt ist, wie z.B. bei einem Vergleich eines neuen Gerätes mit einem Standardgerät. Dazu wurden in einem Streudiagramm die Differenzen der durch zwei verschiedene Methoden ermittelten Werte gegen ihren Mittelwerte aufgetragen.

Bei vorliegender Untersuchung wurden die Ergebnisse des CELL-DYN 3500 bzw. der Standardmethoden per definitionem als „wahrer und richtiger Wert“ angesehen und das Testgerät anhand dieser Werte evaluiert. Dies führte zu einer Modifikation des Bland-Altman-Verfahrens: Die Differenzen der durch die zwei verschiedenen Methoden ermittelten Werte wurden gegen den Wert der Referenzmethode, also des CELL-DYN 3500 bzw. der Standardmethoden, aufgetragen (Abb. 3.9).

Berechnet und tabellarisch aufgelistet wurde das arithmetische Mittel der Differenzen. Das arithmetische Mittel gibt den Wert an, in dem sich die zwei Geräte bzw. Methoden durchschnittlich unterscheiden. Die Variabilität der Unterschiede wurde durch die Standardabweichung bestimmt. Die Auswertungen erfolgten, außer bei Bestimmung von Präzision und Richtigkeit der Kontrollblutmessungen, tierartlich getrennt.

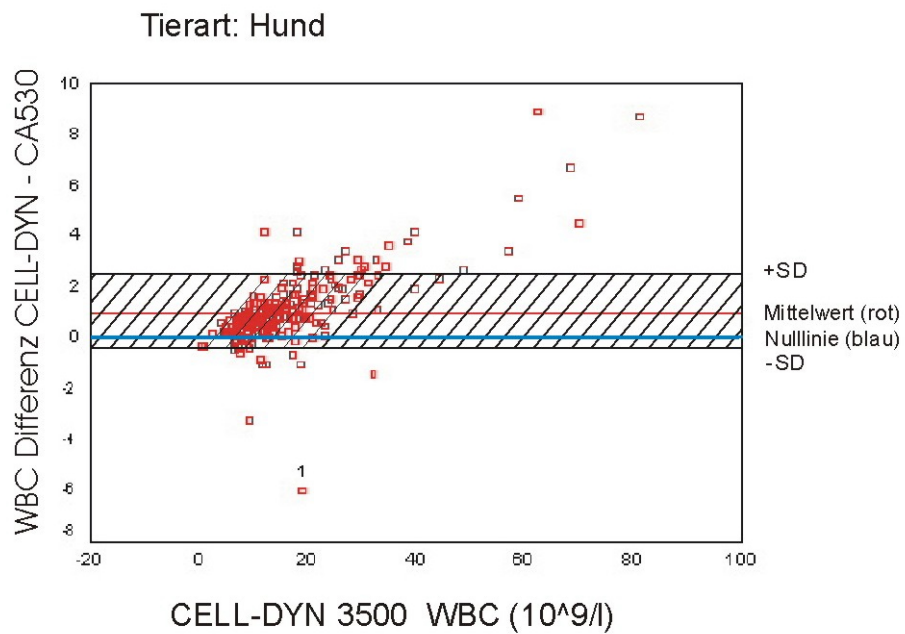


Abb. 3.9: Beispielgraph Leukozytenzählung der Tierart Hund. Die Messdifferenzen zwischen CELL-DYN 3500 und CA530-VET auf der Y-Achse sind gegen die Messergebnisse der Referenzmethode (CELL-DYN 3500) auf der X-Achse aufgetragen. Dem arithmetischen Mittel und der zugehörigen Standardabweichung (SD) entspricht im Schaubild die rote Linie mit schraffiertem Bereich. Im Idealfall deckt sich die Nulllinie (blaue Linie) mit dem arithmetischen Mittel, d. h. die Messdifferenzen zwischen den beiden Methoden sind Null