

Hämatologie
Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut
 Bestimmung der Konzentration der Erythrozyten
 Referenzmethode

DIN
58 932
 Teil 3

ICS 11.100

Haematology; Determination of the concentration of blood corpuscles in blood; Determination of the concentration of erythrocytes; Reference method

1 Anwendungsbereich und Zweck

Diese Norm gilt für die Bestimmung der Konzentration der Erythrozyten im Humanblut mit einer Referenzmethode. Sie gilt nur für die analytische Phase.

Die Einhaltung der in dieser Norm festgelegten geräte- und meßtechnischen Anforderungen bei der Durchführung der Referenzmethode soll sicherstellen, daß Referenzwerte der Konzentration der Erythrozyten im Blut mit einer quantifizierbaren, den medizinischen Erfordernissen genügenden Meßgenauigkeit bestimmt werden.

2 Begriffe

Nach DIN 58 932 Teil 1 und Teil 2

2.1 Erythrozytenzählgerät

Ein Erythrozytenzählgerät ist ein Blutkörperchenzählgerät oder hämozytometrisches Analysensystem, mit dem unter Anwendung des Durchfluß-Meßverfahrens mit elektronischer Impulsverarbeitung die Konzentration der Erythrozyten im Blut bestimmt wird.

2.2 Durchfluß-Meßverfahren

Das Durchfluß-Meßverfahren ist ein Meßverfahren, bei dem sich die Konzentration der Erythrozyten im Blut ergibt aus

- der Anzahl der Erythrozyten, die während der Meßzeit durch eine sensitive Zone des Meßwertaufnehmers (Detektor) strömt,
- dem Meßvolumen,
- dem Volumenanteil des Blutes in der Meßsuspension.

ANMERKUNG: Statt der Anzahl der Erythrozyten und des Meßvolumens können auch die Erythrozytenrate und der Volumenstrom der Meßsuspension zur Bestimmung der Erythrozytenkonzentration verwendet werden.

2.3 Untergrund

Beitrag zum Meßwert der Konzentration der Erythrozyten, verursacht durch nicht von Erythrozyten herrührenden Impulsen, auch mehrfach zusammengesetzte Impulse, die in den Impuls-Höhenbereich der zu messenden Erythrozyten fallen.

ANMERKUNG: Der Untergrund kann verursacht werden durch

- Rauschen,
- Störimpulse, die nicht durch Partikel erzeugt werden,
- Leerwert (Partikel im Suspensionsmittel),
- Matrixeffekt (Partikel in der Blutprobe, die keine Erythrozyten sind).

2.4 Probe

Im Sinne dieser Norm ist die Probe dem Probanden entnommenes, stabilisiertes Nativ-Blut oder eine Suspension mit erythrozytenähnlichen Partikeln (Kontrollblut).

2.5 Meßsuspension

Die Meßsuspension ist hier die mit dem Suspensionsmittel auf einen definierten Volumenanteil verdünnte Probe.

2.6 Meßvolumen

Das Meßvolumen ist das Volumen der Meßsuspension, das während der Meßzeit durch den Meßwertaufnehmer strömt.

3 Referenzmethode

Die Referenzmethode beruht auf der Anwendung eines Erythrozytenzählgerätes nach Abschnitt 2.1.

3.1 Meßgröße und Einheit

Die Meßgröße ist die Partikelkonzentration in der Probe. Die Einheit der Meßgröße ist die auf die Probe bezogene reziproke Volumeneinheit L^{-1} oder deren dezimale Teile.

3.2 Anforderungen an das Erythrozytenzählgerät

Als Referenzgerät kann jedes nach dem Durchfluß-Meßverfahren arbeitende Erythrozytenzählgerät verwendet werden, das so beschaffen und mit Zusatzeinrichtungen ausgestattet ist, daß die in der Definitionsgleichung (1) für die Partikelkonzentration

$$c = \frac{N}{V \cdot \varphi} \quad (1)$$

vorkommenden Größen mit der nachfolgend angegebenen Meßunsicherheit u (Vertrauensniveau 95 %) einzeln bestimmt werden können:

- V ist das Meßvolumen, das während der Meßzeit T durch den sensitiven Bereich des Meßwertaufnehmers strömt. Dieses Volumen muß z. B. mit einer gravimetrischen Methode oder durch Wägung der aus einem Behälter im Zeitintervall zwischen dem Start- und Stopp-Signal für die Zählung gesaugten Masse einer Flüssigkeit bekannter Dichte mit einer relativen Meßunsicherheit $u_v \leq 0,6\%$ bestimmt sein.
- φ ist der Volumenanteil der Ausgangsprobe in der Meßsuspension.

ANMERKUNG: Zwischen der Partikelkonzentration c in der Probe und der Partikelkonzentration c_s in der Meßsuspension besteht der Zusammenhang $c_s = \varphi \cdot c$.

Fortsetzung Seite 2 bis 5

Normenausschuß Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

Der Volumenanteil muß mit einem kalibrierten Dilutor (Kalibrierung z. B. mit Farblösungen und einem Photometer), mit gravimetrisch kalibrierten Pipetten und Behältern oder durch gravimetrische Verdünnung unter Berücksichtigung der Dichten der Probe und des Verdünnungsmittels mit einer relativen Meßunsicherheit $u_{\varphi} \leq 0,6\%$ bestimmt sein.

— N ist die im Volumen V enthaltene Anzahl von Erythrozyten bzw. Partikeln in der Probe. Sie muß aus der bezüglich des Untergrundes korrigierten Anzahl der gezählten Impulse N_x mit Hilfe der Methode der definierten Verdünnungsreihe zur Korrektur koinzidenzbedingter Zählverluste mit einer relativen Meßunsicherheit $u_N \leq 1,5\%$ bestimmt sein (siehe Abschnitte 3.3 bis 3.7). Dabei muß eine gegebenenfalls im Zählgerät vorhandene automatische Zählverlust-Korrekturvorrichtung ausgeschaltet werden. Der zur Umrechnung des vom Gerät angezeigten Zahlenwertes α in die Anzahl der gezählten Impulse N_x erforderliche Faktor k , wobei $N_x = k \cdot \alpha$ gilt, muß bekannt sein (z. B. für Impulsuntersetzungs-schaltungen). Elektronische Totzeiten (Zeitkonstanten, Impulsbewertungszeiten) müssen vernachlässigbar klein gegen die Impulsauflösungszeit der verstärkten Detektorimpulse sein.

Das Referenzgerät muß mit einer Meß- und Überwachungseinrichtung für die Meßzeit T (relative Meßunsicherheit $< 1\%$) sowie einer manuell einstellbaren unteren Diskriminatorschwelle ausgerüstet sein.

Ein Impulshöhenanalysator zur Registrierung der Impulshöhenverteilung sollte zur Geräteausrüstung gehören.

Der Meßbereich muß den klinisch relevanten Bereich der Konzentration der Erythrozyten überdecken. Liegt ein Meßwert beim gerätespezifisch vorgeschriebenen Volumenanteil der Analysenprobe außerhalb des Meßbereiches, so kann durch Wahl eines anderen definierten Volumenanteils ein Meßwert innerhalb des Meßbereiches erzielt und mit dem Zahlenverhältnis der beiden Volumenanteile umgerechnet werden.

Am oberen Ende des Meßbereiches darf eine möglicherweise auftretende Basislinienverschiebung in den elektronischen Komponenten höchstens 2% der mittleren Impulsamplitude der Partikel betragen.

Das Erythrozytenzählgerät muß so beschaffen sein, daß Einflüsse auf die Partikelkonzentration durch

- statische Entmischungseffekte wie Sedimentation, Adhäsion von Erythrozyten an Gefäß- und Schlauchwänden, Aggregation,
- dynamische Entmischungseffekte infolge Rotationsströmungen, Fåhræus-Effekt,
- Untergrund (noise),
- Verschleppung (carry over),
- Expansionsblasen im Detektor und im Meßvolumen,
- Rezirkulationen von Erythrozyten in den sensitiven Bereichen des Detektors

minimiert sind und gegebenenfalls durch Korrekturen berücksichtigt werden können. Die verbleibenden relativen Meßunsicherheiten müssen einzeln untersucht und abgeschätzt sein und dürfen zusammen 1% nicht übersteigen (quadratische Addition der Komponenten, Vertrauensniveau 95%).

Bei manueller und teilmechanisierter Probenvorbereitung wird die Adhäsion der Erythrozyten an Becherwandungen in den Meßsuspensionen durch Bestimmung der Partikelkonzentration 30 s sowie 30 min nach Herstellung der Suspension untersucht. Die Differenz der beiden Meßwerte, bezogen auf den ersten Meßwert, darf 2% nicht übersteigen (Annahme eines zeitlich linearen Effektes).

Die relative Abweichung der Partikelkonzentrationen bei Messungen vor und nach fünfmaligem Umfüllen der Suspension in einen jeweils frischen Probenbecher darf 2% nicht übersteigen.

Durch Verlängerung der Meßzeit T oder Wiederholung des Zählvorganges muß N_x so groß gewählt werden können, daß die relative statistische Komponente der Zählunsicherheit $u_{N_x} \leq 1\%$ ist ($N_x \geq 40\,000$).

ANMERKUNG: Wird die Partikelkonzentration aus der Partikelrate dN/dt und dem Volumenstrom dV/dt bestimmt, müssen dabei die gleichen relativen Meßunsicherheiten eingehalten werden wie bei der Bestimmung von N und V . Die Durchführung und die Auswertung der Referenzmessungen erfolgen entsprechend den Abschnitten 3.4 bis 3.7 mit den differentiellen Größen dN_x/dt , dN/dt und dV/dt .

3.3 Vorbereitung der Referenzmessung

— Angleich der Probe an eine Temperatur von $(21 \pm 3)^\circ\text{C}$. Bei Abweichungen von dieser Temperatur muß der kubische Ausdehnungskoeffizient berücksichtigt werden.

— Durchmischung im Probenfläschchen vor der Entnahme: Mit Antikoagulans, z. B. EDTA, versetztes stabilisiertes Nativ-Blut 5 min auf einem Überkopfmischer oder einem anderen geeigneten Mischer mischen; Kontrollmaterial nach Angaben des Herstellers behandeln.

— Herstellung einer Meßsuspension durch Verdünnen der Probe mit dem gerätespezifischen (isotonen) Verdünnungsmittel. Der Volumenanteil ist so zu wählen, daß der Meßwert im Meßbereich liegt. (Gegebenenfalls sind Konzentrationsveränderungen durch den Zusatz von Antikoagulanslösungen zur Ausgangsprobe zu berücksichtigen.)

— Mit dieser Meßsuspension Bestimmung der Plateau-Kurve (integrale Impulshöhenverteilung) durch Zählung der Impulsanzahl N_x in Abhängigkeit von der Diskriminatoreinstellung bei konstanten übrigen Einflußgrößen oder Registrierung der differentiellen Impulshöhenverteilung mit einem Impulshöhenanalysator.

— Einstellung des Diskriminator-Schwellenwertes auf das Minimum der differentiellen Impulshöhenverteilung zwischen Thrombozyten und Erythrozyten bzw. auf die entsprechende Stelle des Plateaus der integralen Impulshöhenverteilung.

— Herstellung von mindestens 5 Meßsuspensionen S_1 bis S_5 , deren Volumenanteile φ_1 bis φ_5 sich etwa wie 1 : 0,8 : 0,6 : 0,4 : 0,2 verhalten und mit einer relativen Meßunsicherheit $\leq 0,8\%$ bestimmt sind. Für φ_1 kann entweder der vom Gerätehersteller angegebene, an das Gerät angepaßte Wert (z. B. $\varphi_1 = 1 : 50\,000 = 2 \cdot 10^{-5}$) oder ein größerer Wert gewählt werden, jedoch so, daß der Meßwert noch in den Meßbereich des Gerätes fällt. Bei gravimetrischer Verdünnung müssen die Dichten der Probe und des Verdünnungsmittels unter Einbeziehung ihrer Temperaturabhängigkeit berücksichtigt werden.

3.4 Durchführung der Referenzmessung

Nach Durchmischung der Meßsuspensionen werden die vom Gerät angezeigten, unkorrigierten Zahlenwerte der Partikelkonzentrationen α_1 bis α_5 für die Suspensionen S_1 bis S_5 bei abgeschalteter automatischer Zählverlust-korrekturvorrichtung registriert. Danach werden die Untergrundwerte von den Meßwerten α_i subtrahiert, in die gezählten Impulsanzahlen N_{xi} mit dem Umrechnungsfaktor k umgerechnet (siehe Abschnitt 3.2) und die