

DIN 58932-3

ICS 11.100.30

Ersatz für
DIN 58932-3:2017-01

**Hämatologie –
Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut –
Teil 3: Referenzverfahren zur Bestimmung der Konzentration der
Erythrozyten;
Text Deutsch und Englisch**

Haematology –
Determination of the concentration of blood corpuscles in blood –
Part 3: Reference method for the determination of the concentration of erythrocytes;
Text in German and English

Hématologie –
Détermination de la concentration des globules dans le sang –
Partie 3: Procédure de référence pour la détermination de la concentration des érythrocytes;
Texte en allemand et anglais

Gesamtumfang 60 Seiten

DIN-Normenausschuss Gesundheitstechnologien (NAGesuTech)

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Begriffe	4
4 Symbole und Abkürzungen	6
5 Messgröße und Einheit	7
6 Referenzverfahren	8
6.1 Anforderungen an das Erythrozytenzählgerät	8
6.2 Vorbereitung der Referenzmessung	10
6.3 Durchführung der Referenzmessung	12
6.4 Auswertung	13
6.5 Messunsicherheit	14
6.6 Qualitätskontrolle des Referenzverfahrens	15
Anhang A (informativ) Erläuterungen	16
A.1 Durchflussszytometrisches Messverfahren zur Bestimmung der Erythrozytenkonzentration	16
A.2 Ableitung der Gleichung der Regressionsgeraden	16
A.3 Ableitung des Korrekturfaktors zur Berücksichtigung von Koinzidenzverlusten	17
Anhang B (informativ) Beispiel für die Berechnung der Erythrozytenkonzentration	18
B.1 Angabe der Messdaten	18
B.2 Ausreißertest	19
B.3 Auswertung durch Extrapolation auf verschwindenden Volumenanteil ($\phi \rightarrow 0$)	20
B.4 Berechnung der Messunsicherheit	23
B.5 Angabe der Ergebnisse	27
Literaturhinweise	29

Bilder

Bild B.1 — Darstellung des aus den Messwerten berechneten $\ln(\bar{N}_{ri}/\phi_i)$ als Funktion des Volumenanteils ϕ_i	21
---	----

Tabellen

Tabelle 1 — Symbole	6
Tabelle 2 — In der Durchflussszytometrie gebräuchliche Abkürzungen	7
Tabelle B.1 — Messdaten zur Bestimmung von Referenzwerten für die Erythrozytenkonzentration	18
Tabelle B.2 — Kritische Werte für Stichprobenumfänge n von 3 bis 12 [5]	20
Tabelle B.3 — Überprüfung der Messreihen der Tabelle B.1 auf Ausreißer nach dem Kriterium von Grubbs [5]	20
Tabelle B.4 — Berechnung der Größe $\ln(\bar{N}_{ri}/\phi_i)$ ausgehend von den Messwerten	22
Tabelle B.5 — Zahlenwerte für die Ableitungen der Geradenparameter a, b nach den Größen ϕ_i und $\ln(\bar{N}_{ri}/\phi_i)$, die aus Gleichung (B.25) bis Gleichung (B.28) folgen	27
Tabelle B.6 — Zusammenfassung aller für die Auswertung relevanten Größen sowie der Zielgrößen der Referenzmessung einschließlich ihrer Messunsicherheiten	28

Vorwort

Dieses Dokument wurde vom Arbeitsausschuss NA 176-08-05 AA „Hämatologie“ im DIN-Normenausschuss Gesundheitstechnologien (NAGesuTech) erarbeitet und im Einvernehmen mit der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt Braunschweig und Berlin herausgegeben.

Der Arbeitsausschuss setzt sich zusammen aus Vertretern der medizinischen Fachgesellschaften INSTAND e. V., DGKL e. V., DGHO e. V. und Vertretern der Diagnostikindustrie.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. DIN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

DIN 58932, *Hämatologie — Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut* besteht aus den folgenden Teilen:

- Teil 1: *Blutentnahme, Probenvorbereitung, Einflussgrößen, Störfaktoren*
- Teil 2: *Kennzeichnende Größen für Erythrozyten (Erythrozytenindices)*
- Teil 3: *Referenzverfahren zur Bestimmung der Konzentration der Erythrozyten*
- Teil 4: *Referenzverfahren zur Bestimmung der Konzentration der Leukozyten*
- Teil 5: *Referenzverfahren zur Bestimmung der Konzentration der Thrombozyten*
- Teil 6: *Referenzverfahren zur Bestimmung der Konzentration von CD4-positiven Lymphozyten*

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Änderungen

Gegenüber DIN 58932-3:2017-01 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) der Abschnitt 6 beschreibt genauer den Gebrauch von Erweiterungsfaktoren, die gewichtete lineare Regression und Ausreißertests;
- b) die Ableitung des Korrekturfaktors wurde detaillierter beschrieben (Abschnitt A.3);
- c) der ehemalige Anhang B wurde in Abschnitt 4 integriert;
- d) die Beispiele für die Berechnung der Erythrozytenkonzentration (vorher Anhang C, jetzt Anhang B) wurden korrigiert und aktualisiert;
- e) die Norm wurde an die neuen Gestaltungsregeln und die Begrifflichkeiten von DIN EN ISO 15193 angepasst und aktualisiert.

Frühere Ausgaben

DIN 58932-3: 1994-04, 2017-01

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument ist anwendbar für die Bestimmung der Konzentration der Erythrozyten im Humanblut mit einem Referenzverfahren in dem Konzentrationsbereich von $1,0 \text{ pl}^{-1}$ bis $8,0 \text{ pl}^{-1}$. Es ist nur anwendbar für die analytische Phase.

Die Einhaltung der in dieser Norm festgelegten geräte- und messtechnischen Anforderungen bei der Durchführung des Referenzverfahrens stellt sicher, dass die Konzentration der Erythrozyten im Blut mit einer möglichst geringen Messunsicherheit bestimmt wird.

Dieses Dokument ist auch anwendbar zur Partikelzählung in stabilisierten Kontrollbluten mit fixierten humanen Blutkörperchen oder in Suspensionen mit Teilchen nicht biologischen Ursprungs (z. B. Kügelchen mit Oberflächenantigenen), wenn sich die zu messenden Partikel messtechnisch wie Erythrozyten (definiert in 3.3) verhalten.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

DIN 58932-1, *Hämatologie — Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut — Teil 1: Blutentnahme, Probenvorbereitung, Einflussgrößen, Störfaktoren*

DIN 58932-2, *Hämatologie — Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut — Teil 2: Kennzeichnende Größen für Erythrozyten (Erythrozytenindices)*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach DIN 58932-1 und DIN 58932-2 und die folgenden Begriffe.

DIN und DKE stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- DIN-TERMinologieportal: verfügbar unter <https://www.din.de/go/din-term>
- DKE-IEV: verfügbar unter <http://www.dke.de/DKE-IEV>

3.1

Untergrund

Beitrag zum Messwert der Konzentration der Erythrozyten, verursacht durch nicht von Erythrozyten herrührende Impulse

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Untergrund kann verursacht werden durch:

- a) Rauschen der Detektoren (Messwertaufnehmer) und von elektronischen Baugruppen;
- b) Impulse, die nicht durch Partikel erzeugt werden (z. B. durch Netzteile);
- c) Partikel im Suspensionsmittel.

Weitere Beiträge zum Untergrund werden verursacht durch die zu untersuchende Probe, d. h. durch:

- d) Matrixeffekte (Partikel in der Probe, die keine Erythrozyten sind, jedoch den Erythrozyten entsprechende Messsignale verursachen, z. B. Thrombozytenagglomerate).

3.2**Leerwert**

erfasste Partikelkonzentration einer Vergleichssuspension ohne Beifügung der Probe

3.3**Erythrozyten**

rote Blutzellen

ausgereifte, kernlose Zellen im menschlichen peripheren Blut, welche für den Sauerstofftransport Hämoglobin enthalten und Expressionen des Oberflächen-Antigens CD235a (Glycophorin A) aufweisen

Anmerkung 1 zum Begriff: Bei gesunden Personen bilden Erythrozyten eine Form ähnlich einer bikonkaven Scheibe aus.

3.4**Erythrozytengeister**

rote Blutzellen, welche eine Hämolyse durchlaufen haben und deren Zellmembranen sich wieder geschlossen haben und die kein Hämoglobin mehr enthalten

Anmerkung 1 zum Begriff: Siehe [1].

3.5**Erythrozytenzählgerät**

Gerät zur Zählung suspendierter Teilchen, einschließlich Blutkörperchenzählgeräten und anderer Durchflusszytometer, mit dem die Teilchen (Erythrozyten) beim Durchströmen des sensitiven Bereiches eines Messwertaufnehmers registriert werden

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Teilchenzählung kann auf der Messung der Impedanzänderung beim Durchgang eines Teilchens durch eine kleine Messöffnung, auf der Messung des an Partikeln gestreuten Lichts und auf der Messung von Fluoreszenzemissionen von gefärbten Zellen beruhen. Die in der Erfassungszone erzeugten aufeinanderfolgenden elektronischen Pulse werden verarbeitet und in einer geeigneten Datenerfassung aufgezeichnet.

3.6**durchflusszytometrisches Messverfahren zur Bestimmung der Erythrozytenkonzentration**

Messverfahren zur Bestimmung der Konzentration von Erythrozyten im Durchfluss aus:

- a) der Anzahl der Erythrozyten, die während der Messung durch den sensitiven Bereich des Messwertaufnehmers strömen;
 - b) dem Messvolumen;
 - c) dem Volumenanteil der Probe in der Messsuspension;
- oder durch Bestimmung von:
- d) der Erfassungsrate von Erythrozyten, welche den sensitiven Bereich des Messwertaufnehmers während der Messung passieren;
 - e) der Durchflussrate des gemessenen Probenvolumens;
 - f) dem Volumenanteil der Probe in der Messsuspension

Anmerkung 1 zum Begriff: Erläuterungen siehe Abschnitt A.1 und Abschnitt 6.

3.7
Messvolumen

Volumen der Messsuspension, die während der Messung durch den Messwertaufnehmer strömt

[QUELLE: DIN 58932-4:2003-07, 3.8]

3.8
Probe

ungerinnbar gemachtes Blut humanen Ursprungs

Anmerkung 1 zum Begriff: Als Antikoagulan­z sollte EDTA bevorzugt werden.

[QUELLE: DIN 58932-5:2007-10, 3.6]

3.9
Messsuspension

die auf einen bestimmten Volumenanteil verdünnte Probe

[QUELLE: DIN 58932-4:2003-07, 3.7]

4 Symbole und Abkürzungen

Die in diesem Dokument verwendeten Symbole und Abkürzungen sind in Tabelle 1 bzw. Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 1 — Symbole

Symbol	Bedeutung	Einheit
a	Ordinatenabschnitt der Regressionsgeraden	1
b	Steigung der Regressionsgeraden	1
C	Konzentration der Erythrozyten in der Probe	l^{-1}
C_0	Festgelegte Erythrozytenkonzentration, bei der die relative erweiterte Messunsicherheit $k \times u_{rel}$ einen vorgegebenen Wert nicht überschreitet	l^{-1}
$C_{ri,j}$	Registrierte oder nach Gleichung (2) berechnete Konzentration der Erythrozyten in der Messsuspension i bei der Wiederholungsmessung j	l^{-1}
$\bar{C}_{ri}$	Über alle Wiederholungsmessungen j gemittelte registrierte oder nach Gleichung (2) berechnete Konzentration der Erythrozyten in der Messsuspension i	l^{-1}
$C_{i,j}$	Konzentration der Erythrozyten in der Messsuspension i , bei der Wiederholungsmessung j (abgeleitet von der registrierten Konzentration $C_{ri,j}$ durch Korrektur der Koinzidenzverluste)	l^{-1}
$\bar{C}_i$	Über alle Wiederholungsmessungen j gemittelte Konzentration der Erythrozyten in der Messsuspension i	l^{-1}
k	Erweiterungsfaktor zur Bestimmung der erweiterten Messunsicherheit $U = k \times u$	1
N	Anzahl der Erythrozyten in der Probe mit dem Volumen V	1
$N_{ri,j}$	Anzahl der bei der Wiederholungsmessung j registrierten Erythrozyten in einem Volumen $V_{i,j}$ der Messsuspension i	1
$\bar{N}_{ri}$	Über alle Wiederholungsmessungen j gemittelte Anzahl der registrierten Erythrozyten in einem Volumen V der Messsuspension i	1
$N_{i,j}$	Anzahl der Erythrozyten in dem Volumen $V_{i,j}$ der Messsuspension i in Wiederholungsmessung j	1

Tabelle 1 (fortgesetzt)

Symbol	Bedeutung	Einheit
$N_{ri,j}^{\text{total}}$	Gesamtanzahl aller bei der Wiederholungsmessung j registrierten Ereignisse in einem Volumen $V_{i,j}$ der Messsuspension i	1
n	Anzahl der Wiederholungsmessungen, Stichprobenumfang	1
p	Koinzidenzparameter	1
S_i	Standardabweichung der Größe $\bar{N}_{ri}$	1
S_x	Für die Datenanalyse benötigte Summe über die Werte x	1
S_{x^2}	Für die Datenanalyse benötigte Summe über die Quadrate der Werte x	1
S_{xy}	Für die Datenanalyse benötigte Summe über die Produkte xy	1
S_y	Für die Datenanalyse benötigte Summe über die Werte y	1
T_{krit}	Kritischer Wert beim Ausreißertest	1
$t_{i,j}$	Messzeit der Messsuspension i während Wiederholungsmessung j	s
u	Standardmessunsicherheit	Einheit der jeweiligen Messgröße
u_{rel}	Relative Standardmessunsicherheit	1
V	Volumen der Probe	l
$V_{i,j}$	Volumen der Messsuspension i in Wiederholungsmessung j	l
$\bar{V}_i$	Über alle Wiederholungsmessungen j gemittelttes Volumen der $V_{i,j}$ der Messsuspension i	l
τ	Impulsauflösungszeit, Totzeit	s
ϕ_i	Volumenanteil der Probe in der Messsuspension i	1

Tabelle 2 — In der Durchflusszytometrie gebräuchliche Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
BSA	Rinderserumalbumin (en: bovine serum albumin)
CD	Differenzierungscluster (en: cluster of differentiation)
CD235a	Antigen zur Oberflächenmarkierung der Erythrozyten
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (en: ethylenediamine tetraacetic acid)
FSC	Vorwärtsstreulicht (en: forward scatter (of light))
FL	Fluoreszenz
mAk	monoklonaler Antikörper
SSC	seitliche Lichtstreuung (en: side scattter (of light))
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (en: phosphate buffered saline)

5 Messgröße und Einheit

Die Messgröße ist die Erythrozytenkonzentration in der Probe. Die Einheit der Messgröße ist die auf die Probe bezogene reziproke Volumeneinheit l^{-1} oder deren dezimale Teile.

6 Referenzverfahren

6.1 Anforderungen an das Erythrozytenzählgerät

Als Referenzgerät kann jedes nach dem durchflusszytometrischen Messverfahren arbeitende Zellzählgerät verwendet werden, sofern es über einen geeigneten Messwertaufnehmer verfügt und die Unterscheidung der Erythrozyten von anderen Zellpopulationen und Partikeln erlaubt. Die Erythrozytenkonzentration ist definiert als der Quotient aus Erythrozytenanzahl und dem Volumen:

$$C = \frac{N}{V} \quad (1)$$

Das Gerät muss so beschaffen und mit Zusatzeinrichtungen ausgestattet sein, dass die in Gleichung (2) vorkommenden Größen zur Berechnung der Partikelkonzentration

$$C_{ri,j} = \frac{N_{ri,j}}{V_{i,j} \times \phi_i} \quad (2)$$

mit den nachfolgenden angegebenen erweiterten Messunsicherheiten $k \times u$ einzeln bestimmt werden können. Erweiterte Messunsicherheiten müssen für ein Vertrauensniveau von etwa 95 % angegeben werden. Für eine hinreichend hohe Anzahl an Wiederholungsmessungen und dem Vorliegen einer Normalverteilung beträgt $k \approx 2$ [2]. Für eine geringe Zahl von Wiederholungsmessungen kann $k \approx 2$ angemessen sein, wenn die Messunsicherheiten durch Vergleichsmessungen bestätigt sind (z. B. Kalibrierungen oder Vergleichsmessungen zwischen Referenzlaboren). Gegebenenfalls muss der Erweiterungsfaktor k gesondert bestimmt werden [2]. Die in Gleichung (1) und Gleichung (2) vorkommenden Größen sind wie folgt definiert:

- $V_{i,j}$ Volumen der Messsuspension i , die während der Messung j durch den sensitiven Bereich des Messwertaufnehmers strömt. Dieses Volumen und damit das Volumen V müssen mit einer relativen erweiterten Messunsicherheit von $k \times u_{\text{rel}}(V) \leq 0,6 \%$ bestimmt werden.
- ϕ_i Volumenanteil der Probe in der Messsuspension i definiert als Verhältnis von Probenvolumen zum Gesamtvolumen der verdünnten Probe. Der Volumenanteil muss mit einer relativen Messunsicherheit $k \times u_{\text{rel}}(\phi_i) \leq 0,6 \%$ bestimmt sein. Die Verdünnungen müssen gravimetrisch hergestellt und die Dichten von Probe, Verdünnungsmedium und anderen genutzten Reagenzien müssen gemessen und berücksichtigt werden.

ANMERKUNG 1 Der wesentliche Beitrag zur relativen erweiterten Messunsicherheit des Volumenanteils ergibt sich aus der Kalibrierung der zur Durchführung der gravimetrischen Verdünnung verwendeten Waage durch Anwendung des Erweiterungsfaktors $k = 2$ auf die bei der Kalibrierung bestimmte Messunsicherheit.

- $N_{ri,j}$ Anzahl der registrierten Ereignisse – von Erythrozyten verursacht – in dem untersuchten Volumen der Messsuspension $V_{i,j}$ mit einem Volumenanteil der Probe in der Messsuspension von ϕ_i .
- $C_{ri,j}$ registrierte Konzentration, entsprechend der Gleichung (2) aus der Anzahl der registrierten Ereignisse $N_{ri,j}$ bestimmt. Der Index r berücksichtigt die Tatsache, dass die Konzentration aus dem gemessenen Volumen und der Anzahl der registrierten Ereignisse direkt bestimmt werden kann.
- N die im Volumen V der Probe enthaltene Anzahl von Erythrozyten. N muss mit Hilfe der Methode der definierten Verdünnungsreihe zur Korrektur koinzidenzbedingter Zählverluste mit einer relativen erweiterten Messunsicherheit $k \times u_{\text{rel}}(N) \leq 1,5 \%$ (siehe 6.2 bis 6.6) bestimmt sein.

Die Berechnung von N erfolgt aus der bezüglich des Untergrundes korrigierten Anzahl der registrierten Impulse $N_{ri,j}$. Kann die automatische Koinzidenzkorrektur nicht ausgeschaltet werden, müssen die vom Messwertaufnehmer aufgenommenen, verstärkten Primärsignale verwendet werden. Elektronische Totzeiten (Zeitkonstanten, Impulsbewertungszeiten) müssen vernachlässigbar klein gegen die Impulsauflösungszeit τ der verstärkten Detektorimpulse sein.

ANMERKUNG 2 Die Wiederholungsmessungen bei einer Verdünnung (d. h. Messsuspension) i werden durch den Index j gekennzeichnet; die Anzahl der registrierten Ereignisse ist $N_{ri,j}$ und das Volumen $V_{i,j}$.

ANMERKUNG 3 Die registrierte oder nach Gleichung (2) berechnete Teilchenkonzentration $C_{ri,j}$ ist wegen der Koinzidenzverluste geringer als die Teilchenkonzentration $\phi_i \times C$ in der Messsuspension.

Für den Fall, dass zur Erhöhung der Spezifität der Erythrozytenidentifizierung Fluoreszenzmarkierungen eingesetzt werden, muss das Erythrozytenzählgerät für jedes verwendete fluoreszenzmarkierte Antigen über einen entsprechenden Detektionskanal verfügen. Für optische Teilchendetektion sollten simultan zur Fluoreszenzdetektion zusätzlich die Intensität des gestreuten Lichts in Vorwärts- und Seitwärtsrichtung erfasst werden. Die durch Zugabe von Färbereagenzien zusätzlich auftretenden Messunsicherheiten für den Volumenanteil müssen bei der Berechnung der kombinierten Messunsicherheit der Konzentration C berücksichtigt werden.

ANMERKUNG 4 Eine zusätzliche, simultane Messung der Fluoreszenzintensität in einem zweiten Emissionswellenlängenbereich würde die Zuordnung der registrierten Ereignisse zu bestimmten Zellpopulationen sowie die Identifikation von Störfaktoren vereinfachen. DIN 58932-5 und DIN 58932-6 geben weitere Hinweise zum Vorgehen bei Messungen mit simultaner Fluoreszenzdetektion.

Das Erythrozytenzählgerät muss mit einer Überwachungseinrichtung für die Messzeit $t_{i,j}$ und mit einem Impulsanalysator für jede Messgröße ausgerüstet sein. Das Gerät muss über eine manuell oder automatisch einstellbare untere Diskriminatorschwelle verfügen.

Die Zählrate muss durch einen geeignet gewählten Volumenanteil der Probe in der Messsuspension so gering sein, dass eine von den elektronischen Komponenten verursachte Basislinienverschiebung die Messung nicht beeinträchtigt.

Das Erythrozytenzählgerät sowie die verwendeten Gefäße für die Messsuspension müssen so beschaffen sein, dass ihre Einflüsse auf die Partikelkonzentration durch

- a) statische Entmischungseffekte wie Sedimentation, Adhäsion von Erythrozyten an Gefäß- und Schlauchwänden;
- b) dynamische Entmischungseffekte (Fåhræus-Effekt, Segré-Silberberg-Effekt, siehe auch [3]);
- c) Untergrund;
- d) Verschleppung;
- e) Expansionsblasen in der Erfassungsregion des Sensors;
- f) Rezirkulation von Erythrozyten in den sensitiven Bereichen des Detektors;
- g) Erythrozytengeister;
- h) Matrixeffekte (z. B.: Interferenzen mit Leukozyten)

minimiert sind und gegebenenfalls durch Korrekturen berücksichtigt werden können. Die relativen erweiterten Messunsicherheiten müssen einzeln untersucht oder – wo dies nicht möglich ist – abgeschätzt sein. Die erweiterten Messunsicherheiten dieser Korrekturen dürfen zusammen 1 % – bezogen auf die Erythrozytenkonzentration – nicht übersteigen (quadratische Addition der Komponenten, Vertrauensniveau 95 %).

Zur Ermittlung des Einflusses der Adhäsion der Erythrozyten an den Becherwandungen oder des Einflusses der Reagenzien wird die Erythrozytenkonzentration 30 s sowie 10 min nach Herstellung der Messsuspension bestimmt. Jede Messsuspension muss unmittelbar vor der Messung gemischt werden. Die Differenz der beiden Messwerte darf 2 % des ersten Messwertes nicht übersteigen (Annahme einer linearen Zeitabhängigkeit der Adhäsion).

ANMERKUNG 5 Zur Probenpräparation eignen sich insbesondere Behälter oder Röhrchen aus Polypropylen.

Die Abweichung der Erythrozytenkonzentrationen bei Messungen vor und nach fünfmaligem Umfüllen der Suspension in einen jeweils frischen Probenbecher darf 2 % des ersten Messwertes nicht übersteigen.

Die Gesamtzahl der registrierten Ereignisse $\sum_{j=1}^n N_{ri,j}$ muss für jede Messsuspension i ausreichend groß gewählt werden, so dass die relative erweiterte Messunsicherheit (entsprechend zu Gleichung (3)) kleiner oder gleich 1,0 % ist.

$$k \times u_{\text{rel}} \left(\sum_{j=1}^n N_{ri,j} \right) = \frac{k}{\sqrt{\sum_{j=1}^n N_{ri,j}}} \leq 0,01 \quad (3)$$

Damit müssen mindestens 40 000 Ereignisse registriert werden, d. h. $\sum_{j=1}^n N_{ri,j} \geq 40\,000$.

6.2 Vorbereitung der Referenzmessung

Die primäre Probe ist mit Antikoagulant (vorzugsweise EDTA) versetztes Blut. Blutentnahme und Probenvorbereitung müssen nach DIN 58932-1 durchgeführt werden. Das hier beschriebene Verfahren kann auch auf andere Proben angewendet werden, die entsprechende Eigenschaften besitzen, wie z. B. Kontrollblut oder Partikelsuspensionen, die gegebenenfalls weniger stark verdünnt werden.

Das Verdünnungsmittel muss mit dem eingesetzten Messverfahren kompatibel sein (z. B. Leitfähigkeit) und darf die Stabilität der Erythrozyten nicht beeinträchtigen.

ANMERKUNG 1 Zur Verdünnung kann beispielsweise 0,01 molar PBS-Lösung (en: phosphate buffered saline) verwendet werden.

Die folgenden Anforderungen müssen erfüllt werden:

- Wenn zur besseren Identifizierung der Zielzellpopulation Signale in mehreren Messkanälen gleichzeitig erfasst werden, muss die Triggerung der Datenerfassung auf dem Kanal mit dem besten Signal-Untergrund-Verhältnis und/oder dem Kanal mit der besten Diskriminierung von Zielzellpopulation und Restzellen erfolgen. Untergrundsignale, z. B. von Restzellen, können größer sein als die Signale der Zielzellpopulation. Die Anzahl solcher Signale muss klein sein gegen die Anzahl der Signale von der Zielzellpopulation.
- Die Nachweisempfindlichkeit, die Linearität und die Verstärkereinstellungen bezüglich der optimalen Nutzung des dynamischen Bereiches bei Messung der verschiedenen optischen oder Impedanz-Signale unter Verwendung geeigneten Kontrollmaterials muss überprüft und gegebenenfalls verbessert werden. Zu diesem Zweck muss geeignetes Kontrollmaterial künstlichen oder biologischen Ursprungs verwendet werden.

ANMERKUNG 2 Die Empfindlichkeit beim Nachweis der Laser-induzierten Fluoreszenz, gestreuten Laserlichts oder Impedanz-Signalen kann mit Polystyrolkugeln verschiedener Volumina oder verschiedener Fluoreszenzintensität bestimmt werden.

Beim Einsatz von Polystyrolkugeln zur Überprüfung der Nachweisempfindlichkeit sollte beachtet werden, dass wegen der geringeren Brechungsindizes der Blutzellen ihre Streulichtintensität im Vergleich zu Polystyrolkugeln gleichen Volumens geringer ist. Für die Detektion der Lichtstreuung von z. B. Erythrozyten mit ausreichendem Signal-Untergrund-Verhältnis muss der Nachweis der Lichtstreuung von Polystyrolkugeln mit einem Durchmesser von etwa 1 µm erbracht werden.

Zur Überprüfung der Empfindlichkeit und der Linearität beim Nachweis der Laser-induzierten Fluoreszenz werden Polystyrolkugeln empfohlen, die mit einer bekannten Anzahl von Fluorophoren markiert sind und Signalamplituden im Bereich der mit mAk-markierten Zielzellpopulation aufweisen.

Die Nachweisempfindlichkeit und Impulshöhenverteilung bei Impedanzmessungen können mit Polystyrolkügelchen verschiedener Volumina, entsprechend dem Volumenbereich der Zielzellpopulation, überprüft werden. Für die Detektion von Impedanzsignalen von Erythrozyten mit ausreichendem Signal-Untergrund-Verhältnis muss der Nachweis von Polystyrolkügelchen mit einem Durchmesser von etwa $2\text{ }\mu\text{m}$ (mit einem ungefähren Volumen von 4 fl) erbracht werden.

- c) Probe und verwendete Reagenzien müssen an eine Temperatur von $(21 \pm 3)\text{ }^{\circ}\text{C}$ angeglichen werden.
- d) Die primäre Probe muss durch mindestens 10-malige Überkopfbewegung gründlich gemischt werden, wobei Schaumbildung vermieden werden muss.
- e) Eine Messsuspension muss durch den Zusatz eines für das Erythrozytenzählgerät geeigneten Verdünnungsmittels hergestellt werden. Mit dieser Messsuspension wird der untere Diskriminatorschwellenwert manuell oder automatisch eingestellt. Dabei muss sichergestellt sein, dass alle den Erythrozyten entsprechenden Signale erfasst werden.
- f) Der Beobachtungsraumwinkel beim Streulichtnachweis bezüglich der bestmöglichen Unterscheidung zwischen Erythrozyten und anderen Blutzellen muss überprüft und gegebenenfalls eingestellt werden.

ANMERKUNG 3 Die Differenzierung verschiedener Zellpopulationen anhand der Lichtstreuung hängt stark von dem Beobachtungsraumwinkel der Vorwärtsstreuung ab. Daneben hat auch die zur Lichtstreuung benutzte Wellenlänge einen Einfluss auf die Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen [4].

- g) Für den Fall, dass optische Instrumente mit der Möglichkeit Fluoreszenzintensitäten gefärbter Erythrozyten zu erfassen verwendet werden, muss die Identifizierung der Erythrozytenpopulation anhand der Streulichtsignale erfolgen. In diesen Geräten kann Immunmarkierung mit z. B. dem monoklonalen Antikörper CD235a genutzt werden, um eine Validierung der Erythrozytenidentifikation und der Diskriminatoreinstellungen im Erfassungskanal der Lichtstreuung durchzuführen. Für den Fall der Durchführung der Validierung muss die Probe mit dem monoklonalen Antikörper CD235a entsprechend der Anleitung des Antikörperherstellers inkubiert und auf eine Zellkonzentration entsprechend des Messbereiches des Gerätes verdünnt werden.

ANMERKUNG 4 Eine Messung, die eine Markierung der Erythrozyten mit CD235a einschließt, führt aufgrund des zusätzlichen Vorbereitungsschritts zu zusätzlichen Unsicherheiten. Im Falle von Blut von Personen mit seltenen Blutgruppen (z. B. En(a-)) kann die Identifikation der Erythrozyten auf Basis von CD235a-Immunmarkierungen gestört sein. Bei diesen Personen fehlt die CD235a-Oberflächenexpression oder hämatopoetische Vorläuferzellen der Erythrozytenbildung, welche ebenfalls CD235a exprimieren, werden detektiert. Letzte Zellpopulation kann mit einer geeigneten Fluoreszenzfärbung der Nukleinsäure von ausgereiften Erythrozyten unterschieden werden.

ANMERKUNG 5 Die bei bestimmten Erkrankungen auftretenden Mikro-Erythrozyten oder vergrößerte Thrombozyten erschweren eine richtige Identifizierung aller Erythrozyten. Durch den Einsatz von z. B. Immunmarkierungen von Erythrozyten und/oder Thrombozyten kann in diesen Fällen trotzdem eine korrekte Identifizierung erreicht werden.

- h) Bei (Impedanz-)Geräten ohne Impulsanalysator muss mit dieser Messsuspension die Plateau-Kurve der integralen Impulshöhenverteilung durch Zählung der Impulsanzahl N_r in Abhängigkeit von der Diskriminatoreinstellung aufgenommen werden, und der Diskriminatorschwellenwert muss anschließend auf das aus dieser Messung generierte Minimum der differentiellen Pulshöhenverteilung, d. h. im Bereich zwischen Erythrozyten und Thrombozyten, eingestellt werden.
- i) Eine Mindestanzahl von Messpunkten ist für die Bestimmung der analytischen Messfunktion zur Koinzidenzkorrektur erforderlich. Es müssen drei weitere Verdünnungen aus der Probe zur Ermittlung der Koinzidenzkorrektur hergestellt werden, so dass mindestens vier Messsuspensionen ($i = 1$ bis 4) gemessen werden. Die Volumenanteile ϕ_i der Probe in den Messsuspensionen ϕ_1 bis ϕ_4 müssen sich etwa wie $1 : 0,75 : 0,5 : 0,25$ verhalten und mit einer relativen erweiterten Messunsicherheit $k \times u_{\text{rel}}(\phi_i) \leq 0,6\%$

bestimmt sein; das Verhältnis zwischen maximalem und minimalem Volumenanteil muss ≥ 4 sein:

$$\frac{\max(\phi_i)}{\min(\phi_i)} \geq 4 \quad (4)$$

Für ϕ_1 kann entweder der vom Gerätehersteller empfohlene gerätespezifische Wert (z. B. $\phi_1 = 1 : 400$) oder ein größerer Wert gewählt werden. Jedoch muss ϕ_1 so gewählt werden, dass die Messwerte bei allen Verdünnungen noch in den Messbereich des Gerätes fallen.

6.3 Durchführung der Referenzmessung

Vor jeder Messung muss der Leerwert bestimmt werden. Die Messung muss unter Verwendung des Suspensionsmittels nach Zugabe aller zur Herstellung der Messsuspension erforderlichen Reagenzien erfolgen, jedoch ohne Beifügung der Probe. Die Einstellung der Diskriminatorschwelle des Triggerkanals und das Messvolumen müssen bei der Bestimmung des Leerwertes und der Konzentration der Erythrozyten identisch sein. Ist die Verwendung identischer Volumina nicht möglich, müssen die Leerwerte entsprechend umgerechnet werden.

Der Leerwert darf 100 Zählimpulse je Milliliter Verdünnungsmittel nicht überschreiten. Außerdem darf der Leerwert den Wert $\sqrt{N_{ri,j}}/10$ in dem Volumen $V_{i,j}$ nicht übersteigen. Die Größe $\sqrt{N_{ri,j}}$ entspricht der statistischen Messunsicherheit der registrierten Anzahl von Erythrozytensignalen $N_{ri,j}$ einer Einzelmessung.

Werden diese Bedingungen nicht erfüllt, müssen die Ursachen gesucht und beseitigt werden. Erhöhte Leerwerte können verursacht werden durch das Verdünnungsmittel, durch die für eine hydrodynamische Fokussierung verwendete Lösung, durch elektrische oder thermische Störungen im Zählgerät oder durch Einflüsse am Aufstellungsort.

Nach gründlicher Durchmischung der Messsuspension müssen von den einzelnen Verdünnungen i mindestens drei Wiederholungsmessungen j durchgeführt werden, um sicherzustellen, dass eine ausreichende Anzahl von Erythrozyten registriert wird. Dabei darf die erweiterte relative Unsicherheit der Erythrozytenanzahl $\bar{N}_{ri}$ nicht mehr als 1,0 % betragen (siehe Gleichung (2) und Gleichung (3) in 6.1), d. h.:

$$k \times u_{\text{rel}}(\bar{N}_{ri}) = k \times u_{\text{rel}}\left(\sum_{j=1}^n N_{ri,j}\right) \leq 0,01 \quad (5)$$

ANMERKUNG 1 Die Gesamtmessunsicherheit der Konzentration ist für die i -te Verdünnung gegeben durch $u(\bar{C}_{ri}) = \bar{C}_{ri} \sqrt{\{u_{\text{rel}}(\bar{N}_{ri})\}^2 + \{u_{\text{rel}}(\bar{V}_i)\}^2 + \{u_{\text{rel}}(\phi_i)\}^2}$.

Es muss sichergestellt sein, dass sich die Volumendurchflüsse bei der Messung des Leerwertes und der Messsuspensionen um weniger als 1,5 % unterscheiden. Treten größere Abweichungen auf, müssen die Messwerte $N_{ri,j}$ verworfen und die Messung nach Reinigung des Messwertaufnehmers oder der Beseitigung anderer Störungen (z. B. das Auftreten nichtlaminarer Strömungen) wiederholt werden.

ANMERKUNG 2 Bei Geräten mit konstantem Messvolumen führen Variationen des Volumendurchflusses zu entsprechenden Änderungen der Messzeit $t_{i,j}$. Damit lässt sich der Volumendurchfluss durch einen Vergleich der Messzeiten [bestimmt mit einer relativen erweiterten Messunsicherheit von $k \times u_{\text{rel}}(t_{i,j}) < 1\%$] verschiedener Messungen kontrollieren.

Bei Geräten mit einer Vorwahl der Anzahl $N_{ri,j}$ der zu messenden Erythrozyten oder der Vorwahl der Messzeit wird zur Überprüfung des Volumenstromes für jede Messung sowohl das jeweilige Volumen $V_{i,j}$ (mit der in 6.1 angegebenen Messunsicherheit) als auch die Messzeit $t_{i,j}$ mit $k \times u_{\text{rel}}(t_{i,j}) < 1\%$ bestimmt.

Für jede Messsuspension i wird die Anzahl $N_{ri,j}$ der Impulse im Volumen $V_{i,j}$ für die verschiedenen Mehrfachmessungen j gezählt. Zur Auswertung muss jeder Wert $N_{ri,j} \pm \sqrt{N_{ri,j}}$ auf dasselbe Volumen $\bar{V}_i$ bezogen werden. Diese skalierten Werte sollten einem statistischen Ausreißertest unterzogen werden. Anhang B beschreibt

als Beispiel die Anwendung des Grubbs Tests, mit dem die Abwesenheit eines Ausreißers statistisch geprüft werden kann. Ein möglicher Ausreißer sollte weiter untersucht werden, ob er für die weitere Auswertung ausgeschlossen werden sollte [5]. Danach werden die jeweiligen Mittelwerte $\bar{N}_{ri}$ gebildet, die in die Berechnung eingehen.

Bei einigen Geräten werden zur Unterscheidung der Erythrozyten von anderen Zellen und Zellbruchstücken für jedes einzelne Ereignis mehrere Signale (z. B. Amplitude, Breite und Fläche eines Pulses einer Messgröße und/oder verschiedene Messgrößen wie Fluoreszenz oder Lichtstreuung) gleichzeitig gemessen. Bei der Auswertung der erhaltenen mehrdimensionalen Datensätze wird die Anzahl $N_{ri,j}$ bestimmt durch die Abgrenzung der Zielzellpopulation in geeigneten ein- oder zweidimensionalen (Histogramm oder „Streudiagramm“) Darstellungen der Messsignale. Der Datensatz kann gegebenenfalls auf ausgewählte Populationen reduziert werden („gating“), wobei die Auswahl durch Eingrenzung in anderen Histogrammen oder zweidimensionalen Darstellungen („Streudiagrammen“) erfolgt. Die als Erythrozyten identifizierte Population oder „Punktwolke“ wird manuell (z. B. durch Polygone) eingegrenzt. Bei dieser manuellen Eingrenzung sollten die Trennungslinien möglichst in die Mitte zwischen die Linien gleicher Partikelanzahl der Punktwolken der Erythrozyten und der den anderen Zellpopulationen (z. B. Thrombozyten) oder den restlichen Zellfragmenten entsprechenden Punktwolken gelegt werden. Nach erfolgter Abgrenzung werden die Ereignisse $N_{ri,j}$ in den zu den Erythrozyten gehörenden Punktwolken gezählt.

ANMERKUNG 3 Alternativ kann die zur weiteren Auswertung benötigte Anzahl $N_{ri,j}$ der den Erythrozyten entsprechenden Impulse automatisch durch Verwendung eines geeigneten Algorithmus (z. B. zur Clusteranalyse in zwei oder mehr Dimensionen) bestimmt werden.

Messunsicherheiten aufgrund der manuellen Abgrenzung verschiedener Zellpopulationen im Histogramm einer differentiellen Impulshöhenverteilung oder in einem zweidimensionalen Streudiagramm müssen durch mehrfache Auswertung desselben Datensatzes abgeschätzt werden. Sie müssen bei der Abschätzung des Gesamtfehlers berücksichtigt werden.

Algorithmen zur automatischen Abgrenzung verschiedener Zellpopulationen und Algorithmen zur automatischen Zuordnung müssen validiert sein (z. B. durch den Vergleich mit Ergebnissen der manuellen Abgrenzung).

Einflussgrößen, die relative Messabweichungen unter 0,2 % verursachen, brauchen nicht berücksichtigt werden.

6.4 Auswertung

Die Messfunktion ist eine Regressionsgerade. Die Auswertung der Messungen erfolgt durch die numerische Bestimmung der Parameter einer linearen Regressionsgeraden (siehe Abschnitt A.2) nach Gleichung (6):

$$\ln \frac{\bar{N}_{ri}}{\phi_i} = \ln N - \phi_i \times N \times p \quad (6)$$

mit den Variablen $\ln \left(\frac{\bar{N}_{ri}}{\phi_i} \right)$ als Ordinate und dem Volumenanteil ϕ_i als Abszisse ($i = 1, 2, 3, 4$), p ist der Koinzidenzparameter (p -Factor).

Aus dem Ordinatenabschnitt wird die koinzidenzkorrigierte Anzahl N der Partikel im Volumen V der Probe bestimmt. Die für N aus der rechnerischen Anpassung erhaltene relative erweiterte Messunsicherheit muss kleiner oder gleich 1,5 % sein [$k \times u_{\text{rel}}(N) \leq 1,5 \%$]. Der korrigierte Messwert der Partikelkonzentration C in der Probe ($C = N/V$) folgt nach Division von N durch das Volumen V der Probe, das sich aus den Messvolumina $V_{i,j}$ ableitet.

Ist es nicht möglich, das gleiche statistische Gewicht des Mittelwertes der registrierten Impulse $\bar{N}_{ri}$ für alle Messsuspensionen sicherzustellen, können die entsprechenden Wichtungen bei der rechnerischen Anpassung berücksichtigt werden.

ANMERKUNG 1 Die Wichtung kann in der Regel nicht direkt aus der beobachteten Streuung der einzelnen Messpunkte bestimmt werden [6].

ANMERKUNG 2 Der Anstieg der Regressionsgeraden ist vom Koinzidenzparameter p und somit von allen auf diesen wirkenden Einflussgrößen (Partikel- und Geräteeigenschaften sowie Geräteeinstellungen) abhängig.

Zur rechnerischen Anpassung kann auch die nichtlineare Form der Gleichung (6) (siehe Gleichung (A.3)), verwendet werden. Die Forderung der Bestimmung der koinzidenzkorrigierten Anzahl N mit einer erweiterten Unsicherheit $k \times u_{\text{rel}}(N) \leq 1,5 \%$ ist auch in diesem Fall einzuhalten.

Das mathematische Modell zur Ableitung der Gleichung (A.3) und Gleichung (6) erlaubt die Korrektur von Zählverlusten, die durch den Messwertaufnehmer verursacht werden. Einflüsse von elektronischen Totzeiten in Impulsverstärkern und Zählschaltungen sind unter Umständen nicht vollständig berücksichtigt. Können diese elektronischen Totzeiten nicht vernachlässigt werden, weichen die Messwerte von der Regressionsgeraden nach Gleichung (6) ab. Mit ansteigenden koinzidenzbedingten Zählverlusten (d. h. mit ansteigendem Volumenanteil ϕ_i) werden diese Abweichungen größer. Messwerte $\ln(\bar{N}_{ri}/\phi_i)$, die nicht entsprechend Gleichung (6) linear vom Volumenanteil ϕ_i abhängen, sondern auf einer konkaven Kurve liegen, zeigen, dass das Zählgerät nicht für eine Referenzmessung geeignet ist oder die Verdünnungsreihe nicht entsprechend angepasst wurde.

Bei Geräten, die die Registrierung der integralen Totzeit $N_{ri,j}^{\text{total}} \times \tau$ während der Messung ermöglichen, können die Koinzidenzverluste unter Verwendung des in Abschnitt A.3 abgeleiteten Korrekturfaktors für jede einzelne Messung i,j korrigiert werden [7]:

$$N_{i,j} = N_{ri,j} \left(\frac{1}{1 - (N_{ri,j}^{\text{total}} \times \tau / t_{i,j})} \right) \quad (7)$$

Dabei muss beachtet werden, dass in den Korrekturfaktor die Gesamtanzahl aller registrierten Ereignisse $N_{ri,j}^{\text{total}}$ eingeht und nicht die Anzahl $N_{ri,j}$ der registrierten Erythrozyten, da Koinzidenzen auch durch andere Zellpopulationen verursacht werden. Unter Verwendung von Gleichung (2):

$$C_{i,j} = \frac{N_{i,j}}{V_{i,j} \times \phi_i}$$

kann damit für jede Messung i,j die Konzentration $C_{i,j}$ und für jede Verdünnung i der entsprechende koinzidenzkorrigierte Mittelwert berechnet werden:

$$\bar{C}_i = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n C_{i,j} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \left(\frac{N_{i,j}}{V_{i,j} \times \phi_i} \right) \quad (8)$$

Die Extrapolation auf den verschwindenden Volumenanteil ϕ_i nach Gleichung (6) ist nicht erforderlich. Bei dieser Auswertung muss die direkte Korrektur der Koinzidenzverluste für jede Einzelmessung kontrolliert werden durch die Berechnung der Ausgleichsgeraden der Messwerte $\bar{C}_i$ als Funktion des Volumenanteils ϕ_i . Innerhalb der Messunsicherheit muss die Steigung null sein, d. h. die Messwerte $\bar{N}_i$ oder $\bar{C}_i$ müssen auf einer horizontalen Geraden liegen.

6.5 Messunsicherheit

Die relative Messunsicherheit der Erythrozytenkonzentration errechnet sich ausgehend von der Gleichung (1) nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz aus der quadratischen Addition der relativen Messunsicherheiten. Die Unsicherheiten für

- a) die auf den wahren Wert der Erythrozytenanzahl N korrigierte Anzahl von Zählimpulsen und
- b) das aus Messvolumina $V_{i,j}$ abgeleitete Volumen $\bar{V}_i$

tragen zur Unsicherheit der Erythrozytenkonzentration bei.

ANMERKUNG Die bei der Verdünnung auftretenden Messunsicherheiten der Volumenanteile sind in der Unsicherheit $u(N)$ bei der Bestimmung des Achsenabschnittes durch Extrapolation (siehe Anhang A) enthalten.

Zusätzlich müssen bei der Bestimmung der Messunsicherheit Änderungen der Erythrozytenkonzentration aufgrund der in 6.1 genannten Einflüsse einbezogen werden.

6.6 Qualitätskontrolle des Referenzverfahrens

Die Rückführbarkeit der Referenzmethodenwerte muss sichergestellt werden durch eine geeignete Kalibrierung der zur Verdünnung der Probe genutzten Geräte und der Geräte zur Bestimmung des Messvolumens. Die Kalibrierung muss vor Inbetriebnahme des Referenzmessinstrumentes, nach jeder Reparatur, mindestens jedoch einmal im Jahr durchgeführt werden. Unmittelbar nach der Kalibrierung muss eine bezüglich der Konzentration und der Impulshöhe des Fluoreszenz-, Lichtstreu- und Impedanz-Signals den Erythrozyten ähnliche, langzeitstabile Kontrollprobe (z. B. artifizielle Partikel) bei festgelegten Geräteeinstellungen analysiert werden.

ANMERKUNG Wegen mangelnder Langzeitstabilität eignen sich Blutproben nur zur Bestimmung der Wiederholpräzision innerhalb eines kurzen Zeitraums, jedoch nicht zur Bestimmung der Vergleichpräzision.

Der Referenzwert, bestimmt aus der Analyse von mindestens 4 Messsuspensionen, muss innerhalb seiner Messunsicherheit mit den Ergebnissen der vorherigen Analysen derselben Kontrollprobe übereinstimmen. Die in 6.1 geforderten zulässigen Messunsicherheiten der einzelnen Messgrößen (z. B. das Volumen) müssen dabei eingehalten werden. Werden bei den Kontrollen größere Messabweichungen festgestellt, so müssen die Ursachen gesucht und beseitigt werden.

Der Referenzwert einer neuen Kontrollprobe muss zurückgeführt werden auf den vorherigen Referenzwert durch Vergleichsmessungen in einem geeigneten Zeitraum unter Verwendung der beiden Kontrollproben. Damit wird eine ununterbrochene Kontrolle des Referenzverfahrens sichergestellt.

Zur Validierung der Referenzmethode und der Funktionsfähigkeit des Erythrozytenzählgerätes müssen mindestens einmal im Jahr Vergleichsmessungen mit anderen Referenzlaboratorien durchgeführt werden, falls die entsprechende messtechnische Infrastruktur besteht. Die Ergebnisse müssen innerhalb der Messunsicherheiten übereinstimmen und müssen protokolliert werden. Für diese Messungen sind Proben (siehe 3.8) geeignet, wenn sie innerhalb der nach DIN 58932-1 festgelegten Zeit von 6 h in allen teilnehmenden Laboratorien untersucht werden. Kontrollmaterialien dürfen nur innerhalb der deklarierten Laufzeit verwendet und müssen vorschriftsmäßig gelagert werden.

Erythrozytengesteir, veränderte Erythrozyten oder zerstörte Erythrozyten können die Ursache für eine verringerte Reproduzierbarkeit der Erythrozytenkonzentration insbesondere in Kontrollbluten sein. Zusätzlich verursachen Erythrozytengesteir Abweichungen hinsichtlich der Zellidentifizierung beim Einsatz verschiedener Messtechniken, d. h. bei Lichtstreu- und Impedanzmessungen. Um den Einfluss von Erythrozytengesteir zu bestimmen, müssen die relativen Konzentrationen von intakten Erythrozyten, Erythrozytengesteir und Zellmembranfragmenten durch die Benutzung von Antikörperfärbungen nach 6.2, Listenpunkt g), gemessen werden. Erythrozytengesteir tragen zu systematischen Abweichungen bei, welche berücksichtigt werden können. Allerdings darf die relative Konzentration von Erythrozytengesteir und Fragmenten einen Anteil von 1 % der Konzentration intakter Erythrozyten nicht übersteigen. Wenn dieses nicht sichergestellt werden kann, kann der Probe kein Referenzmesswert zugewiesen werden. Somit sind solche Proben auch nicht geeignet für den Einsatz bei Inter-Laborvergleichen, z. B. für die externe Qualitätssicherung.

Anhang A (informativ)

Erläuterungen

A.1 Durchflusszytometrisches Messverfahren zur Bestimmung der Erythrozytenkonzentration

Das Erythrozytenzählgerät muss zum Zwecke der Erythrozytenzählung mit einem Messwertaufnehmer ausgerüstet sein, der die Erfassung von Teilchen mittels Lichtstreuung oder Impedanzänderung ermöglicht [4] [8] [9].

Zusätzlich können in das Gerät Messkanäle integriert sein, die die Erfassung von Fluoreszenz immunmarkierter (Blut-)Zellen oder gefärbter Teilchen nicht biologischen Ursprungs ermöglichen. Alternativ kann auch ein anderes Messgerät mit Fluoreszenzerfassung für die Bestimmung des Anteils von Erythrozytegeistern und Erythrozytenfragmenten zur Qualitätskontrolle genutzt werden.

Beim Impedanz-Prinzip entstehen die Impulse durch die Änderung des elektrischen Widerstandes beim Durchgang eines Partikels durch eine Kapillare, in der sich ein Elektrolyt befindet.

Beim optischen Prinzip entstehen die Impulse durch Änderung des Strahlungsfeldes im sensitiven Bereich des Messwertaufnehmers beim Durchgang der Partikel durch einen quer zur Strömungsrichtung orientierten Lichtstrahl. Jedes Partikel ist charakterisiert durch seine

- a) Streuung (Beugung, Brechung, Reflexion),
- b) Absorption,
- c) Fluoreszenz.

Die vom Zählgerät (mit Hilfe der optischen oder dem Impedanz-Verfahren) gezählten Impulse können von einem einzelnen Partikeln erzeugte einzelne Impulse oder infolge zufälliger Koinzidenzen [7] [10] [11] [12] [13] aus einzelnen Impulsen zusammengesetzte Impulspakete sein.

A.2 Ableitung der Gleichung der Regressionsgeraden

Die in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Korrektur der Zählverluste durch zufallsbedingte Koinzidenzen basieren auf der Herstellung einer Verdünnungsreihe und der Messung der Partikelanzahl in diesen verschiedenen Suspensionen [13] [14] [15] [16] [17].

N ist die Anzahl der Partikeln, die im Volumen V der Messsuspension während der Messzeit t durch den sensitiven Bereich des Messwertaufnehmers strömen. Wegen der koinzidenzbedingten Zählverluste werden in einem bestimmten Volumen der Suspension nur N_r und nicht N Impulse registriert. Unter der Annahme von Partikeln mit verschwindend kleinem Volumen ergibt sich folgende Gleichung:

$$N_r = N \times e^{-N \times p} \quad (\text{A.1})$$

aus der Theorie der zufälligen Koinzidenzen mit:

$$p = r/t \quad (\text{A.2})$$

Dabei ist

p der Koinzidenzparameter;

τ die Impulsauflösungszeit;

t die Messzeit.

Wird N variiert durch Änderung des Volumenanteils ϕ der Probe in der Messsuspension, variiert auch N_i . Für die i -te Verdünnung (z. B. Messsuspension) gilt für die Anzahl N_{ri} der um den Untergrund korrigierten registrierten Impulse:

$$N_{ri} = N \times e^{-N_i \times p} \quad (\text{A.3})$$

Da $N_i = \phi_i \times N$, ändert sich die Gleichung (A.3) wie folgt:

$$N_{ri} = \phi_i \times N \times e^{-\phi_i \times N \times p} \quad (\text{A.4})$$

Durch Logarithmieren der Gleichung (A.4) ergibt sich die folgende lineare Beziehung zwischen $\ln(N_{ri}/\phi_i)$ und dem Volumenanteil ϕ_i der i -ten Messsuspension (siehe 6.4, Gleichung (6)):

$$\ln \frac{N_{ri}}{\phi_i} = \ln N - \phi_i \times N \times p \quad (\text{A.5})$$

Wird $\ln(N_{ri}/\phi_i)$ als Ordinate und ϕ_i als Abszisse gewählt, lässt sich aus dem Ordinatenabschnitt $a = \ln N$ der Regressionsgeraden $y = a + b \cdot x$, die Gleichung (A.5) entspricht, die koinzidenzkorrigierte Partikelkonzentration der Probe $C = N/V = e^a/V$ errechnen. Der Koinzidenzparameter p folgt aus der Steigung $b = -N \times p$ der Regressionsgeraden und dem Ordinatenabschnitt, d. h. $p = -b \times e^{-a}$.

A.3 Ableitung des Korrekturfaktors zur Berücksichtigung von Koinzidenzverlusten

Als Näherung für hinreichend geringe Koinzidenzverluste darf in Gleichung (A.3) der Korrekturterm $N_i \times p$ im Exponenten der Exponentialfunktion ersetzt werden durch $N_{ri} \times p$, da die registrierte Anzahl N_{ri} nur geringfügig von der wahren Anzahl N_i abweicht und $N_{ri} \approx N_i$ gilt. Damit geht Gleichung (A.3) über in:

$$N_{ri} \approx N_i \times e^{-N_{ri} \times p} \quad (\text{A.6})$$

Nach Entwicklung der Exponentialfunktion in eine Taylorreihe entsprechend:

$$e^x = \sum_{\alpha=0}^{\infty} \frac{x^\alpha}{\alpha!} \quad (\text{A.7})$$

und Abbruch nach dem linearen Term ($\alpha=1$) kann die Anzahl der registrierten Ereignisse N_{ri} geschrieben werden als:

$$N_{ri} \approx N_i \times (1 - N_{ri} \times p) \quad (\text{A.8})$$

Durch Umformung erhält man die koinzidenzkorrigierte Anzahl:

$$N_i \approx N_{ri} \times \left(\frac{1}{1 - (N_{ri} \times \tau/t_i)} \right) \quad (\text{A.9})$$

Diese Gleichung gilt für Suspensionen, die nur eine Partikelpopulation enthalten. In Referenz [7] wird der Begriff zur Koinzidenzkorrektur als K_{N8} bezeichnet. Befinden sich mehrere Partikelpopulationen in der Suspension, dann ist die entsprechende Formel nur anwendbar, wenn die Koinzidenzverluste aller Partikelpopulationen gleich sind.

Anhang B
(informativ)

Beispiel für die Berechnung der Erythrozytenkonzentration

B.1 Angabe der Messdaten

Die Erythrozytenkonzentration wird durch die Bestimmung der Regressionsgeraden nach Gleichung (6) berechnet. In Tabelle B.1 sind die Ergebnisse einer Referenzmessung mit einem Impedanz-Zellzählgerät, bei der vier verschiedene Verdünnungen (d.h. Messsuspensionen) der zu untersuchenden Probe vermessen wurden, aufgeführt. In der ersten Spalte ist der Index i ($1 \leq i \leq 4$), der die jeweilige Verdünnung charakterisiert, angegeben. In der zweiten Spalte steht der Volumenanteil ϕ_i der Ausgangsprobe in der Messsuspension. Um möglichst geringe Messunsicherheiten zu erreichen, werden die verschiedenen Verdünnungen gravimetrisch hergestellt. Die zur Bestimmung der Volumenanteile erforderliche Dichte der Blutprobe und der Verdünnungsreagenzien wird mit einem Biegeschwinger-Dichtemessinstrument gemessen [18] [19]. Die für jede Verdünnung durchgeführten verschiedenen Messungen sind durch den Index j in der dritten Spalte gekennzeichnet ($1 \leq j \leq n$), wobei n (Spalte 4) für die Anzahl der Messungen aus einer Messsuspension steht. Die Anzahl der registrierten Ereignisse $N_{ri,j}$ für die Verdünnung i und die Messung j ist in der fünften Spalte zusammen mit der Messunsicherheit $u(N_{ri,j}) = \sqrt{N_{ri,j}}$ angegeben.

Aus allen Einzelmessungen j der Messsuspension i folgt der Mittelwert $\bar{N}_{ri} = \frac{1}{k} \sum_{j=1}^k N_{ri,j}$ in Spalte 6. Die Standardabweichung S_i in der letzten Spalte der Tabelle B.1 ergibt sich aus der Streuung der Messwerte.

Es muss dabei beachtet werden, dass bei dem hier angegebenen Beispiel ein Gerät verwendet wurde, bei dem ein bestimmtes Messvolumen festgelegt ist. Deshalb sind die Messvolumina $V_{i,j}$ und die Messzeiten $t_{i,j}$ nicht in Tabelle B.1 aufgeführt. Bei Instrumenten mit Vorwahl der Anzahl $N_{ri,j}$ der zu messenden Erythrozyten oder der Messzeit $t_{i,j}$ sollte eine vollständige Dokumentation der Daten zusätzliche Spalten für das Messvolumen $V_{ri,j}$, die Messzeit $t_{i,j}$ und die auf dasselbe Volumen V normierte Anzahl der registrierten Ereignisse einschließen. Anschließend werden die Mittelwerte der registrierten Ereignisse und die Standardabweichungen unter Verwendung der normierten Anzahl der registrierten Ereignisse berechnet. Alternativ kann die Auswertung mit den registrierten Konzentrationen der Messsuspensionen mit einer entsprechend modifizierten Gleichung (6) durchgeführt werden.

Tabelle B.1 — Messdaten zur Bestimmung von Referenzwerten für die Erythrozytenkonzentration

Verdünnung	Volumenanteil	Messung	Anzahl der Wiederholungsmessungen	Anzahl der registrierten Ereignisse	Mittelwert der Anzahl der registrierten Ereignisse	Standardabweichung
i	ϕ_i	j	n	$N_{ri,j} \pm \sqrt{N_{ri,j}}$	$\bar{N}_{ri} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n N_{ri,j}$	S_i
1	$24,47 \times 10^{-6}$	1	3	$50\,745 \pm 225$	50 795,7	83,5 ^a
		2		$50\,892 \pm 226$		
		3		$50\,750 \pm 225$		
2	$18,08 \times 10^{-6}$	1	4	$37\,712 \pm 194$	38 156,8	330,0 ^a
		2		$38\,099 \pm 195$		
		3		$38\,357 \pm 196$		
		4		$38\,459 \pm 196$		