

Hämatologie
Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut
 Teil 4: Referenzverfahren zur Bestimmung der Konzentration
 der Leukozyten

DIN
58932-4

ICS 11.100

Haematology – Determination of the concentration of blood corpuscles in blood
 – Part 4: Reference procedure for the determination of the concentration of leucocytes

Hématologie – Détermination de la concentration des globules dans le sang –
 Partie 4: Procédure de référence pour la détermination de la concentration des leucocytes

Vorwort

Diese Norm wurde vom Arbeitsausschuss C 6 „Hämatologie“ des Normenausschusses Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V. erarbeitet und im Einvernehmen mit der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt Braunschweig und Berlin herausgegeben.

DIN 58932 „Hämatologie – Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut“ besteht aus:

- Teil 1: Blutentnahme, Probenvorbereitung, Einflussgrößen, Störfaktoren
- Teil 2: Kennzeichnende Größen für Erythrozyten (Erythrozytenindices)
- Teil 3: Bestimmung der Konzentration der Erythrozyten, Referenzmethode
- Teil 4: Referenzverfahren zur Bestimmung der Konzentration der Leukozyten

Es ist beabsichtigt, darüber hinaus den folgenden Teil herauszugeben:

- Ausgewählte Verfahren zur Bestimmung der Konzentration der Thrombozyten.

Die Anhänge A und B dienen lediglich zur Information.

Foreword

This standard was prepared by the Technical Committee C 6 “Hämatologie (Haematology)” of the Normenausschuss Medizin (Medical Standards Committee, NAMed) of DIN Deutsches Institut für Normung e.V. (German Institute for Standardization) and published in agreement with the Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Braunschweig and Berlin.

DIN 58932 consists of the following parts, under the general title *Haematology – Determination of the concentration of blood corpuscles in blood*:

- Part 1: Blood collection, sample preparation, biological influence factors, interference factors
- Part 2: Characteristic quantities for erythrocytes (erythrocyte indices)
- Part 3: Determination of the concentration of erythrocytes – Reference method
- Part 4: Reference procedure for the determination of the concentration of leucocytes

It is intended to publish the following additional part:

- Selected procedures for the determination of the concentration of thrombocytes.

Annexes A and B are for information only.

Fortsetzung Seite 2 bis 19

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

1 Anwendungsbereich

Diese Norm gilt für die Bestimmung der Konzentration der Leukozyten im Humanblut mit einer Referenzmethode, gegebenenfalls nach vorausgegangener Lyse der Erythrozyten. Sie gilt nur für die analytische Phase.

Die Einhaltung der in dieser Norm festgelegten geräte- und messtechnischen Anforderungen bei der Durchführung der Referenzmethode stellt sicher, dass Referenzwerte der Konzentration der Leukozyten im Blut mit einer quantifizierbaren, den medizinischen Erfordernissen genügenden Messgenauigkeit bestimmt werden.

Diese Norm gilt auch zur Partikelzählung in stabilisierten Kontrollbluten mit fixierten humanen oder tierischen Blutkörperchen oder Teilchen nicht biologischen Ursprungs (z.B. Kügelchen), wenn sich die zu messenden Partikel messtechnisch wie Leukozyten (siehe 3.1) verhalten.

2 Normative Verweisungen

Diese Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation (einschließlich Änderungen).

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

3 Begriffe

Für die Anwendung dieser Norm gelten die in DIN 58932-1 angegebenen und die folgenden Begriffe:

3.1 Leukozyten

kernhaltige Zellen im peripheren Blut gesunder Erwachsener

3.2 Leukozytenzählgerät

Gerät zur Zählung suspendierter Teilchen, einschließlich Blutkörperchenzählgeräten und anderer Durchflusssytometer, mit dem die Teilchen (Leukozyten) beim Durchströmen des sensitiven Bereiches eines Messwertaufnehmers nachgewiesen und die elektronischen Impulse anschließend verarbeitet werden

3.3 Durchflusssytometrisches Messverfahren

Messverfahren, bei dem sich die Konzentration der Leukozyten im Blut ergibt aus

- der Anzahl der Leukozyten, die während der Messung durch den sensitiven Bereich des Messwertaufnehmers strömen,
- dem Messvolumen,
- dem Volumenanteil des Blutes in der Messsuspension

ANMERKUNG Erläuterungen siehe A.1.

3.4 Leerwertbestimmung

Messung unter Verwendung des Suspensionsmittels nach Zugabe aller zur Herstellung der Messsuspension erforderlichen Reagenzien, jedoch ohne Beifügung der Probe

1 Scope

This standard applies to the determination of the concentration of leucocytes in human blood by a reference procedure, if appropriate after lysis of the erythrocytes. It is applicable to the analytical phase only.

When applying the reference procedure specified in this standard the technical and metrological requirements ensure that reference values for the concentration of leucocytes in blood are determined with a quantifiable accuracy of measurement, which meets medical needs.

This standard also applies to corpuscle counting in stabilised control bloods containing fixed human or animal blood corpuscles or particles of non-biological origin, e.g. beads, if the metrological behaviour of the corpuscles to be measured corresponds to that of leucocytes as defined in 3.1.

2 Normative references

This standard incorporates by dated or undated reference, provisions from other publications. These normative references are cited at the appropriate places in the text, and the publications are listed hereafter. For dated references, subsequent amendments to or revisions of any of these publications apply to this standard only when incorporated in it by amendment or revision. For undated references, the latest edition of the publication referred to applies (including amendments).

DIN 58932-1, *Haematology – Determination of the concentration of blood corpuscles in blood – Part 1: Blood collection, sample preparation, biological influence factors, interference factors*

3 Terms and definitions

For the purposes of this standard, the terms and definitions given in DIN 58932-1 and the following apply.

3.1 leucocytes

nucleated cells found in the peripheral blood of healthy adults

3.2 leucocyte counter

instrument for counting suspended particles, including blood cell counters and other flow cytometric analysers, in which the particles (leucocytes) are detected when passing the sensitive section of a sensor and the electronic pulses are processed subsequently

3.3 flow cytometric procedure

measurement procedure to deduce the concentration of leucocytes in blood by determination of

- the number of leucocytes which pass the sensitive section of the sensor during measurement,
- the measured volume,
- the volume fraction of blood in the test sample

NOTE See A.1 for comments.

3.4 determination of blank values

measurement using the diluting agent with all reagents required to prepare the test sample added, however, without addition of the sample

3.5 Untergrund

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

ANMERKUNG Der Untergrund kann verursacht werden durch

- Rauschen der Detektoren (Messwertaufnehmer) und elektronischen Baugruppen,
- Impulse, die nicht durch Partikel erzeugt werden (z. B. durch Stromversorgungen),
- Impulse durch Luftblasen,
- Partikel im Suspensionsmittel.

Die Auswirkungen dieser Störgrößen werden durch die Leerwertbestimmung quantifiziert.

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

- Matrixeffekte (Partikel in der Probe, die keine Leukozyten sind, jedoch den Leukozyten entsprechende Impulshöhen verursachen; mehrfach zusammengesetzte Impulse, die in den Impulshöhenbereich der zu messenden Leukozyten fallen, hervorgerufen z. B. durch Thrombozytenaggregat oder Gerinnsel).

3.6 Probe

dem gesunden, erwachsenen Probanden entnommenes, ungerinnbar gemachtes Blut

3.7 Messsuspension

die auf einen bestimmten Volumenanteil verdünnte Probe

3.8 Messvolumen

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

3.5 background

contribution to the measured value of the leucocyte concentration due to pulses not generated by leucocytes

NOTE The background can be caused by

- noise generated in detectors (sensors) and electronic modules,
- pulses not generated by particles (for example, by power supply units),
- pulses generated by air bubbles,
- particles contained in the suspending agent

The influence of these disturbances is quantified by determining the blank value.

Further contributions to the background arise from the sample itself, i.e.

- matrix effects (particles in the sample that are not leucocytes, but cause pulses with corresponding amplitudes; multiple composed pulses with amplitudes within the pulse height range of leucocytes, e.g. generated by thrombocyte aggregates or blood clots).

3.6 sample

blood collected from a healthy adult person and treated with anticoagulants

3.7 test sample

sample diluted to a specified volume fraction

3.8 measured volume

volume of the test sample that flows through the sensor during the measurement

4 Formelzeichen

Formelzeichen	Bedeutung	Einheit
a	Ordinatenabschnitt der Regressionsgeraden	1
b	Steigung der Regressionsgeraden	1
C	Konzentration der Leukozyten in der Probe	L^{-1}
$C_{ri,j}$	Registrierte oder nach Gleichung (1b) berechnete Konzentration der Leukozyten in der Messsuspension i bei der Wiederholungsmessung j	L^{-1}
k	Anzahl der Wiederholungsmessungen; Stichprobenumfang	1
N	Anzahl der Leukozyten in einem Volumen V der Probe	1
$N_{ri,j}$	Anzahl der bei der Wiederholungsmessung j registrierten Leukozyten in einem Volumen $V_{i,j}$ der Messsuspension i	1
$\bar{N}_{ri}$	Über alle Wiederholungsmessungen j gemittelte Anzahl der registrierten Leukozyten in einem Volumen V der Messsuspension i	1

4 Symbols

Symbol	Meaning	Unit
a	Ordinate intercept of the regression line	1
b	Slope of the regression line	1
C	Concentration of leucocytes in the sample	L^{-1}
$C_{ri,j}$	Recorded or calculated (see equation (1b)) concentration of leucocytes in a test sample i , repeat measurement j	L^{-1}
k	Number of repeat measurements; sample size	1
N	Number of leucocytes in a volume V of the sample	1
$N_{ri,j}$	Number of leucocytes counted in a volume $V_{i,j}$ of a test sample i , repeat measurement j	1
N_{ri}	Number of leucocytes counted in a volume V of a test sample i , averaged over all repeat measurements j	1

(fortgesetzt)

Formelzeichen	Bedeutung	Einheit
p	Koinzidenzparameter	1
s_i	Standardabweichung der Größe $\bar{N}_{ri}$	1
S_x	Für die Messunsicherheitsanalyse benötigte Summe über die Werte x	1
S_x^2	Für die Messunsicherheitsanalyse benötigte Summe über die Quadrate der Werte x	1
S_{xy}	Für die Messunsicherheitsanalyse benötigte Summe über die Produkte xy	1
S_y	Für die Messunsicherheitsanalyse benötigte Summe über die Werte y	1
T_{krit}	Kritischer Wert beim Ausreißertest	1
$t_{i,j}$	Messzeit bei der Wiederholungsmessung j der Messsuspension i	s
u	Standardmessunsicherheit	Einheit der jeweiligen Messgröße
u_{rel}	relative Standardmessunsicherheit	1
V	Volumen der Probe	L
$V_{i,j}$	Volumen bei der Wiederholungsmessung j der Messsuspension i	L
τ	Impulsauflösungszeit; Totzeit	s
ϕ_i	Volumenanteil der Probe in der Messsuspension i	1

(continued)

Symbol	Meaning	Unit
p	Coincidence parameter	1
s_i	Standard deviation of the quantity $\bar{N}_{ri}$	1
S_x	Sum over the x -values, required for the analysis of the uncertainty of measurement	1
S_x^2	Sum over the x -values squared, required for the analysis of the uncertainty of measurement	1
S_{xy}	Sum over the products xy , required for the analysis of the uncertainty of measurement	1
S_y	Sum over the y -values, required for the analysis of the uncertainty of measurement	1
T_{crit}	Critical value in outlier test	1
$t_{i,j}$	Measurement period of a test sample i , repeat measurement j	s
u	Standard uncertainty of measurement	Unit of the respective measurand
u_{rel}	Standard relative uncertainty of measurement	1
V	Volume of the sample	L
$V_{i,j}$	Volume of a test sample i , repeat measurement j	L
τ	Pulse resolution time; dead time	s
ϕ_i	Volume fraction of the sample in a test sample i	1

5 Referenzmethode

5.1 Messgröße und Einheit

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

5.2 Anforderungen an das Leukozytenzählgerät

Als Referenzgerät kann jedes nach dem durchflusszytometrischen Messverfahren arbeitende Leukozytenzählgerät verwendet werden, sofern das Gerät über einen geeigneten Messwertaufnehmer verfügt und die Unterscheidung von anderen Zellpopulationen erlaubt. Das Gerät muss so beschaffen und mit Zusatzeinrichtungen ausgestattet sein, dass die in Gleichungen (1a) und (1b) für die Partikelkonzentrationen

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

5 Reference procedure

5.1 Measurand and unit

The measurand is the leucocyte concentration in the sample. The unit of the measurand is the reciprocal unit of volume, L^{-1} , related to the sample, or its decimal parts.

5.2 Requirements to be met by the leucocyte counter

Any leucocyte counter employing the flow cytometric procedure can be used as a reference instrument, provided the instrument is equipped with a suitable sensor and allows leucocytes to be discriminated from other cell populations. The instrument design shall be such and be equipped with auxiliary devices, that the quantities in equations (1a) and (1b), which define the corpuscle concentrations

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

$$C_{ri,j} = \frac{N_{ri,j}}{V_{i,j} \cdot \phi_i} \quad (1b)$$

vorkommenden Größen mit der nachfolgend angegebenen erweiterten Messunsicherheit $2u$ (entsprechend einem Vertrauensniveau 95 % bei Annahme einer Normalverteilung) einzeln bestimmt werden können. Dabei ist

N die im Volumen V der Probe enthaltene Anzahl von Leukozyten. N muss mit Hilfe der Methode der definierten Verdünnungsreihe zur Korrektur koinzidenzbedingter Zählverluste mit einer relativen erweiterten Messunsicherheit $2u_{rel}(N) \leq 1,5\%$ bestimmt sein (siehe 5.3 bis 5.7). 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 der verstärkten Detektorimpulse sein.

$V_{i,j}$ das 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 $2u_{rel}(V) \leq 0,6\%$ bestimmt sein.

ANMERKUNG 1 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 $V_{i,j}$.

ϕ_i der Volumenanteil der Probe in der Messsuspension i . Der Volumenanteil muss mit einer relativen erweiterten Messunsicherheit $2u_{rel}(\phi_i) \leq 1\%$ bestimmt sein.

ANMERKUNG 2 Die registrierte oder nach (1b) berechnete Leukozytenkonzentration $C_{ri,j}$ ist wegen der Koinzidenzverluste geringer als die Leukozytenkonzentration $\phi_i \cdot C$ in der Messsuspension.

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

Die Impulshöhenverteilung sollte mit einem oder – bei der korrelierten Erfassung mehrerer Messsignale eines einzelnen Partikels – mit mehreren zur Messanordnung gehörenden Impulshöhenanalysatoren ermittelt werden.

Die Zählrate muss so gering gewählt werden, dass eine von den elektronischen Komponenten verursachte Basislinienverschiebung höchstens 2 % der mittleren Impulsamplitude der Leukozyten beträgt.

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

- statische Entmischungseffekte wie Sedimentation, Adhäsion von Leukozyten an Gefäß- und Schlauchwänden,
- dynamische Entmischungseffekte (Fåhræus-Effekt),
- Untergrund, z. B. durch Mikroexpansionsblasen im Messwertaufnehmer,
- Verschleppung

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 Leukozytenkonzentration – nicht übersteigen (quadratische Addition der Komponenten, Vertrauensniveau 95 %).

$$C_{ri,j} = \frac{N_{ri,j}}{V_{i,j} \cdot \phi_i} \quad (1b)$$

can be determined individually with the expanded uncertainty of measurement, $2u$, stated below (corresponding to a confidence level of 95 % assuming normal distribution). The quantities in equations (1a) and (1b) are defined as follows:

N number of leucocytes contained in the volume V of the sample. Counting losses due to coincidence shall be corrected by the method of a defined dilution series. N shall be determined with a relative expanded uncertainty of measurement of $2u_{rel}(N) \leq 1,5\%$ (see 5.3 to 5.7). N is calculated from the background-subtracted number of recorded pulses $N_{ri,j}$. If the automatic coincidence correction system cannot be switched off, the amplified primary signals picked up by the sensor shall be used. Electronic dead times (time constants, pulse processing times) shall be negligibly small compared with the pulse resolution time of the amplified detector pulses.

$V_{i,j}$ measured volume of the test sample i which flows through the sensitive section of the sensor during the measurement j . This measured volume and hence the volume V shall be determined with a relative expanded uncertainty of measurement of $2u_{rel}(V) \leq 0,6\%$.

NOTE 1 Repeat measurements at a dilution (i.e. test sample) i are marked by the index j , the number of recorded events is $N_{ri,j}$, and the measured volume $V_{i,j}$.

ϕ_i volume fraction of the sample in the test sample i . The volume fraction shall be determined with a relative expanded uncertainty of measurement of $2u_{rel}(\phi_i) \leq 1\%$.

NOTE 2 The recorded or calculated (according to (1b)) leucocyte concentration $C_{ri,j}$ is less than the leucocyte concentration $\phi_i \cdot C$ in the test sample due to coincidence losses.

The reference instrument shall be equipped with a device monitoring the measurement period $t_{i,j}$. The instrument shall have a manually or automatically adjustable lower discriminator threshold.

The pulse height distribution should be determined with a pulse height analyser. In case of the correlated detection of several measuring signals of a single corpuscle, several of such analysers should be used.

The counting rate shall be selected sufficiently low to ensure that a displacement of the base line caused by electronic components does not exceed 2 % of the mean pulse amplitude of leucocytes.

The leucocyte counter and the containers used for the test sample shall be such that their effects on the corpuscle concentration due to

- static segregation effects, such as sedimentation, adhesion of leucocytes to the walls of containers and flexible tubes,
- dynamic segregation effects (Fåhræus effect),
- background, e.g. micro expansion bubbles in the sensor,
- carry over

are minimised and can be taken into account by corrections, if appropriate. The relative expanded uncertainties of measurement shall be examined separately or – if this is not possible – estimated. The expanded uncertainties of all these corrections with respect to the leucocyte concentration shall not exceed 1 % (quadratic addition of components, confidence level of 95 %).

Zur Ermittlung des Einflusses der Adhäsion der Leukozyten an den Becherwänden oder des Einflusses der Reagenzien wird die Leukozytenkonzentration 30 s sowie 30 min nach Herstellung der Messsuspension bestimmt. Die 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). Die Abweichung der Leukozytenkonzentrationen bei Messungen vor und nach fünfmaligem Umfüllen der Suspension in einen jeweils frischen Probenbecher darf 2 % des ersten Messwertes nicht übersteigen.

Die Gesamtanzahl der registrierten Ereignisse $\sum_{j=1}^k N_{ri,j}$

muss für jede Messsuspension so groß sein, dass die relative erweiterte Unsicherheit

$$2u_{rel}\left(\sum_{j=1}^k N_{ri,j}\right) = \frac{2}{\sqrt{\sum_{j=1}^k N_{ri,j}}} \leq 0,01 \quad (2)$$

ist, d. h. $\sum_{j=1}^k N_{ri,j} \geq 40\,000$. Dies wird erreicht durch eine

ausreichende Anzahl k von Wiederholungsmessungen unter Verwendung derselben Messsuspension. Für die Berechnung der Anzahl N der Leukozyten wird die Größe N_{ri} benötigt, die relative erweiterte Messunsicherheit

$$\text{ist } 2u_{rel}(\bar{N}_{ri,j}) = 2u_{rel}\left(\sum_{j=1}^k N_{ri,j}\right).$$

5.3 Vorbereitung der Referenzmessung

Die folgenden Anforderungen müssen erfüllt werden:

- Blutentnahme und Probenvorbereitung nach DIN 58932-1;
- Angleich der Probe und der verwendeten Reagenzien an eine Temperatur von $(21 \pm 3)^\circ\text{C}$;
- mit Antikoagulans, z. B. EDTA, versetztes Nativblut 5 min durch Überkopfmischbewegungen gründlich mischen, wobei Schaumbildung zu vermeiden ist;
- Herstellung einer Messsuspension durch Verdünnen der Probe mit dem gerätespezifisch geeigneten Verdünnungsmittel; Konzentrationsveränderungen durch den Zusatz von Reagenzien zur Ausgangsprobe sind zu berücksichtigen;
- bei Geräten mit Impulshöhenanalysator wird mit dieser Messsuspension der untere Diskriminatorschwellenwert manuell oder automatisch auf das Minimum der differentiellen Impulshöhenverteilung zwischen Leukozyten und übrigen verbleibenden Blutkörperchen eingestellt; bei der Verwendung von mehreren Impulshöhenanalysatoren zur korrelierten Erfassung verschiedener Messsignale muss durch Einstellung der jeweiligen unteren Diskriminatorschwelle sichergestellt sein, dass alle den Leukozyten entsprechenden Signale erfasst werden;

bei Geräten ohne Impulshöhenanalysator wird mit dieser Messsuspension die Plateau-Kurve der integralen Impulshöhenverteilung durch Zählung der Impulsanzahl $N_{ri,j}$ in Abhängigkeit von der Diskriminatoreinstellung bei konstanten übrigen Einflussgrößen aufgenommen und der Diskriminatorschwellenwert auf die Mitte des waagerechten Abschnittes im Bereich zwischen Leukozyten und in der Messsuspension befindlichen kleinen Blutkörperchen eingestellt;

To quantify the influence of leucocyte adhesion to the container walls or the influence of reagents, the leucocyte concentration is determined 30 s and 30 min after preparation of the test sample. Each test sample shall be mixed immediately before carrying out the measurement. The difference between these two measured values shall not exceed 2 % of the first measured value (assuming a linear time-dependence of adhesion).

The deviation of leucocyte concentrations measured prior to and after five-times transfer of the test sample into a new container each, shall not exceed 2 % of the first measured value.

The total number of recorded events $\sum_{j=1}^k N_{ri,j}$ shall be

sufficiently large for each test sample to ensure that the relative expanded uncertainty is

$$2u_{rel}\left(\sum_{j=1}^k N_{ri,j}\right) = \frac{2}{\sqrt{\sum_{j=1}^k N_{ri,j}}} \leq 0,01 \quad (2)$$

i.e. $\sum_{j=1}^k N_{ri,j} \geq 40\,000$. This is achieved by an adequate

number k of repeat measurements using the same test sample. The number N of leucocytes is calculated from the quantity N_{ri} , whose relative expanded uncertainty is

$$2u_{rel}(\bar{N}_{ri,j}) = 2u_{rel}\left(\sum_{j=1}^k N_{ri,j}\right).$$

5.3 Preparation of reference measurement

The following requirements shall be met:

- collection of blood and sample preparation as specified in DIN 58932-1;
- adaptation of the sample and reagents to a temperature of $(21 \pm 3)^\circ\text{C}$;
- thorough mixing of blood to which an anticoagulant was added (e.g. EDTA) by 360° tilt movements of the vial transverse to its longitudinal axis for five minutes, formation of foam is to be avoided;
- preparation of a test sample by dilution of the sample with a diluting agent suitable for the specific instrument; changes in concentration due to the addition of reagents to the original sample have to be taken into account;
- in instruments equipped with a pulse height analyser, the test sample prepared is used to set the lower value of the discriminator threshold manually or automatically to the minimum of the differential pulse height distribution between leucocytes and other remaining blood corpuscles. When several pulse height analysers are used for the correlated detection of different measuring signals, setting of the respective lower discriminator threshold shall ensure that all signals arising from leucocytes are detected.

In instruments without pulse height analyser, the test sample prepared is used to record the plateau curve of the integrated pulse height distribution by counting the number of pulses $N_{ri,j}$ as a function of the discriminator threshold, with the other influence quantities being constant. The discriminator threshold is set to the middle of the horizontal section in the region between leucocytes and small blood corpuscles in the test sample.