

DIN 58932-5

ICS 11.100.30

**Hämatologie –
Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut –
Teil 5: Referenzverfahren zur Bestimmung der Konzentration der
Thrombozyten; Text Deutsch und Englisch**

Haematology –

Determination of the concentration of blood corpuscles in blood –

Part 5: Reference method for the determination of the concentration of thrombocytes; Text in German and English

Hématologie –

Détermination de la concentration des globules dans le sang –

Partie 5: Procédure de référence pour la détermination de la concentration des plaquettes; Texte en allemand et anglais

Gesamtumfang 37 Seiten

Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Begriffe	4
4 Formelzeichen	5
5 Messgröße und Einheit	7
6 Referenzverfahren	7
6.1 Anforderungen an das Thrombozytenzählgerät	7
6.2 Auswahl und Anwendung der Reagenzien zur immunologischen Markierung der Thrombozyten	9
6.3 Vorbereitung der Referenzmessung	10
6.4 Durchführung der Referenzmessung	12
6.5 Auswertung	13
6.6 Messunsicherheit	15
6.7 Qualitätskontrolle des Referenzverfahrens	15
7 Ausgewählte Verfahren	15
Anhang A (informativ) Erläuterungen	16
A.1 Durchflusszytometrisches Messverfahren	16
A.2 Ableitung der Gleichung der Regressionsgeraden	16
Anhang B (informativ) Abkürzungen	18
B.1 In der Durchflusszytometrie verwendete Abkürzungen	18
Literaturhinweise	19

Vorwort

Diese Norm wurde vom Arbeitsausschuss NA 063-03-06 AA „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.

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

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*
- *Teil 5: Referenzverfahren zur Bestimmung der Konzentration der Thrombozyten.*

Es ist vorgesehen, Teil 5 durch einen Abschnitt, in dem ausgewählte Verfahren enthalten sind, zu ergänzen.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm gilt für die Bestimmung der Konzentration der Thrombozyten im Humanblut mit einem Referenzverfahren oder einem ausgewählten Verfahren. Sie gilt nur 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 Thrombozyten im Blut mit einer möglichst geringen Messunsicherheit bestimmt wird. Die Anwendung eines ausgewählten Verfahrens stellt die Vergleichbarkeit der in verschiedenen Laboratorien erhaltenen Ergebnisse mit einer quantifizierbaren, den medizinischen Erfordernissen genügenden Messgenauigkeit sicher.

Diese Norm gilt auch 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 Thrombozyten (siehe 3.1) verhalten.

Diese Norm gilt auch bei der Thrombozytenzählung für Patienten mit Störungen der Thrombozytenfunktion, bei denen eine Glanzmann-Thrombasthenie oder das Bernard-Soulier-Syndrom vorliegen, vorausgesetzt die Forderungen in 6.2 werden eingehalten.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. 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*

3 Begriffe

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

3.1

Thrombozyten

kernlose Blutkörperchen im menschlichen peripheren Blut mit Expression der Oberflächen-Antigene CD61, CD42 und CD41

3.2

Thrombozytenzählgerät

Gerät zur Zählung suspendierter Teilchen, einschließlich Blutkörperchenzählgeräten und anderer Durchflusszytometer, mit dem die Teilchen (Thrombozyten) beim Durchströmen des sensitiven Bereiches eines Messwertaufnehmers, der die Beobachtung der Fluoreszenz markierter Partikel erlaubt, nachgewiesen und die elektronischen Impulse anschließend verarbeitet werden

3.3

Durchflusszytometrisches Messverfahren

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

- der Anzahl der Thrombozyten, die während der Messung durch den sensitiven Bereich des Messwertaufnehmers strömen,
- dem Messvolumen,

4

— dem Volumenanteil des Blutes in der Messsuspension

ANMERKUNG Erläuterungen siehe A.1 und Abschnitt 6.

3.4

Leerwertbestimmung

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

[DIN 58932-4:2003-07]

3.5

Untergrund

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

ANMERKUNG Der Untergrund kann verursacht werden durch

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

Die Auswirkungen dieser Störgrößen werden durch die Leerwertbestimmung nachgewiesen und quantifiziert.

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

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

3.6

Probe

ungerinnbar gemachtes Blut humanen Ursprungs

ANMERKUNG Als Antikoagulanzen sollte EDTA zu bevorzugt werden.

3.7

Messsuspension

die auf einen bestimmten Volumenanteil verdünnte Probe

[DIN 58932-4:2003-07]

3.8

Messvolumen

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

[DIN 58932-4:2003-07]

4 Formelzeichen

Formelzeichen	Bedeutung	Einheit
a	Ordinatenabschnitt der Regressionsgeraden	1
b	Steigung der Regressionsgeraden	1
C	Konzentration der Thrombozyten in der Probe	L^{-1}

Formelzeichen	Bedeutung	Einheit
C_0	Festgelegte Thrombozytenkonzentration, bei der die relative erweiterte Messunsicherheit $2u_{\text{rel}}$ einen geforderten Wert nicht überschreiten darf	L^{-1}
$C_{\text{ri},j}$	Registrierte oder nach Gleichung (2) berechnete Konzentration der Thrombozyten in der Messsuspension i bei der Wiederholungsmessung j	L^{-1}
$\bar{C}_{\text{ri}}$	Über alle Wiederholungsmessungen j gemittelte registrierte oder nach Gleichung (2) berechnete Konzentration der Thrombozyten in der Messsuspension i	L^{-1}
$C_{\text{i},j}$	Konzentration der Thrombozyten in der Messsuspension i , bei der Wiederholungsmessung j (abgeleitet von der registrierten Konzentration $C_{\text{ri},j}$ durch Korrektur der Koinzidenzverluste)	L^{-1}
$\bar{C}_{\text{i}}$	Über alle Wiederholungsmessungen j gemittelte Konzentration der Thrombozyten in der Messsuspension i	L^{-1}
k	Anzahl der Wiederholungsmessungen; Stichprobenumfang	1
N	Anzahl der Thrombozyten in einem Volumen V der Probe	1
$N_{\text{ri},j}$	Anzahl der bei der Wiederholungsmessung j registrierten Thrombozyten in einem Volumen $V_{\text{i},j}$ der Messsuspension i	1
$\bar{N}_{\text{ri}}$	Über alle Wiederholungsmessungen j gemittelte Anzahl der registrierten Thrombozyten in einem Volumen V der Messsuspension i	1
$N_{\text{i},j}$	Anzahl der Thrombozyten in einem Volumen $V_{\text{i},j}$ der Messsuspension i bei der Wiederholungsmessung j (abgeleitet von der registrierten Anzahl $N_{\text{ri},j}$ durch Korrektur der Koinzidenzverluste)	1
$N_{\text{ri},j}^{\text{total}}$	Gesamtanzahl aller bei der Wiederholungsmessung j registrierten Ereignisse in einem Volumen $V_{\text{i},j}$ der Messsuspension i	
p	Koinzidenzparameter	1
S_{i}	Standardabweichung der Größe $\bar{N}_{\text{ri}}$	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
$t_{\text{i},j}$	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
$V_{\text{i},j}$	Volumen bei der Wiederholungsmessung j der Messsuspension i	L

Formelzeichen	Bedeutung	Einheit
$\bar{V}_i$	Über alle Wiederholungsmessungen j gemitteltes Volumen V_{ij} der Messsuspension i	L
τ	Impulsauflösungszeit; Totzeit	s
ϕ_i	Volumenanteil der Probe in der Messsuspension i	1

5 Messgröße und Einheit

Die Messgröße ist die Thrombozytenkonzentration 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 Thrombozytenzählgerät

Als Referenzgerät kann jedes nach dem durchflusszytometrischen Messverfahren arbeitende Zellzählgerät verwendet werden, sofern es über einen geeigneten Messwertaufnehmer verfügt und die Unterscheidung der Thrombozyten von anderen Zellpopulationen und Partikeln erlaubt. Das Gerät muss so beschaffen und mit Zusatzeinrichtungen ausgestattet sein, dass die in Gleichungen (1) und (2) für die Partikelkonzentrationen vorkommenden Größen mit den nachfolgend angegebenen erweiterten Messunsicherheiten $2u$ (entsprechend einem Vertrauensniveau 95 % bei Annahme einer Normalverteilung) einzeln bestimmt werden können.

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

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

Dabei ist

N die im Volumen V der Probe enthaltene Anzahl von Thrombozyten. N muss mit Hilfe der Methode der definierten Verdünnungsreihe zur Korrektur koinzidenzbedingter Zählverluste mit einer relativen erweiterten Messunsicherheit $2u_{rel}(N) \leq 5\%$ bestimmt sein (siehe 6.3 bis 6.7). Für Thrombozytenkonzentrationen, die kleiner als $C_0 = 20\,000\ \mu L^{-1}$ sind, muss für die relative erweiterte Messunsicherheit

$$2u_{rel}(N)|_{C \leq C_0} \leq 2u_{rel}(N)|_{C=C_0} \times \frac{C_0}{C}$$

erfüllt sein, d. h. es muss wegen $2u_{rel}(N) \leq 5\%$ für $C_0 = 20\,000\ \mu L^{-1}$

$$2u_{rel}(N)|_{C \leq C_0} \leq \frac{1\,000\ \mu L^{-1}}{C} \text{ gelten.}$$

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 $2u_{\text{rel}}(V) \leq 0,6 \%$ 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 $N_{i,j}$ und das Volumen $V_{i,j}$.

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

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

Das Thrombozytenzählgerät muss für jedes Partikel in der Messsuspension simultan die Fluoreszenzintensität in mindestens einem Emissionswellenlängenbereich und die Intensität des in Vorwärtsrichtung oder in seitlicher Richtung gestreuten Lichtes detektieren.

ANMERKUNG 3 Eine zusätzliche, simultane Messung der Fluoreszenzintensität in einem zweitem Emissionswellenlängenbereich würde die Zuordnung der registrierten Ereignisse zu bestimmten Zellpopulationen sowie die Identifikation von Störfaktoren vereinfachen.

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

Die Zählrate muss durch Wahl des Volumenanteils der Probe in der Messsuspension so gering gewählt werden, dass für jede Messgröße eine von den elektronischen Komponenten verursachte Basislinienverschiebung die Messung nicht beeinträchtigt.

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

- statische Entmischungseffekte wie Sedimentation, Adhäsion von Thrombozyten an Gefäß- und Schlauchwänden,
- dynamische Entmischungseffekte (Fåhræus-Effekt),
- Untergrund,
- 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 2 % – bezogen auf die Thrombozytenkonzentration – nicht übersteigen (quadratische Addition der Komponenten, Vertrauensniveau 95 %).

Zur Ermittlung des Einflusses der Adhäsion der Thrombozyten an den Becherwandungen oder des Einflusses der Reagenzien wird die Thrombozytenkonzentration 30 s sowie 10 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).

ANMERKUNG 4 Zur Probenvorbereitung eignen sich insbesondere Behälter oder Röhrchen aus Polypropylen.

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

Für Thrombozytenkonzentrationen, die größer oder gleich $C_0 = 20\,000\ \mu\text{L}^{-1}$ sind, muss die Gesamtanzahl der registrierten Ereignisse $\sum_{j=1}^k N_{ri,j}$ für jede Messsuspension i so groß sein, dass die relative erweiterte Unsicherheit kleiner gleich 5 % ist

$$2u_{\text{rel}}\left(\sum_{j=1}^k N_{ri,j}\right) = \frac{2}{\sqrt{\sum_{j=1}^k N_{ri,j}}} \leq 0,05. \quad (3)$$

Damit müssen mindestens 1 600 Ereignisse registriert werden, d. h. $\sum_{j=1}^k N_{ri,j} \geq 1\,600$.

Für Thrombozytenkonzentrationen, die kleiner sind als $C_0 = 20\,000\ \mu\text{L}^{-1}$, muss für jede Messsuspension i die erweiterte Messunsicherheit geringer als $1\,000\ \mu\text{L}^{-1}$ sein. Die relative erweiterte Messunsicherheit ändert sich daher mit der Konzentration C der Thrombozyten in der Probe entsprechend

$$2u_{\text{rel}}\left(\sum_{j=1}^k N_{ri,j}\right)\Big|_{C \leq C_0} \leq 2u_{\text{rel}}\left(\sum_{j=1}^k N_{ri,j}\right)\Big|_{C=C_0} \times \frac{C_0}{C} \quad (4)$$

Die Gesamtanzahl der zu registrierenden Ereignisse $\sum_{j=1}^k N_{ri,j}$ für jede Messsuspension ergibt sich aus

$$\sum_{j=1}^k N_{ri,j} \geq \left(\frac{C}{u_{\text{rel}}\left(\sum_{j=1}^k N_{ri,j}\right)\Big|_{C=C_0} \times C_0} \right)^2 = \left(\frac{C}{500\ \mu\text{L}^{-1}} \right)^2 \quad (5)$$

Um sicherzustellen, dass die erforderliche Anzahl von Ereignissen $\sum_{j=1}^k N_{ri,j}$ registriert wird, muss gegebenenfalls eine hinreichend große Anzahl k von Wiederholungsmessungen unter Verwendung derselben Messsuspension durchgeführt werden. Für die Berechnung der Anzahl N der Thrombozyten wird die Größe $\bar{N}_{ri}$ benötigt, die relative erweiterte Messunsicherheit ist

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

Bei Thrombozytenkonzentrationen von $10\,000\ \mu\text{L}^{-1}$ oder $5\,000\ \mu\text{L}^{-1}$ ist nach Gleichung (5) die Registrierung von mindestens 400 oder 100 Ereignissen, die von Thrombozyten verursacht sind, erforderlich.

6.2 Auswahl und Anwendung der Reagenzien zur immunologischen Markierung der Thrombozyten

Für die Markierung der Thrombozyten müssen mindestens zwei der in 3.1 angegebenen monoklonalen Antikörper (mAk) eingesetzt werden, die gegen verschiedene Oberflächenepitope der Thrombozyten gerichtet sind.

ANMERKUNG 1 Monoklonale Antikörper gegen verschiedene Epitope des Fibrinogenrezeptorkomplexes (CD61 und CD41) und gegen den von-Willebrand-Faktor Rezeptorkomplex (CD42a, b, c, d) sind aufgrund ihrer Plättchenspezifität

einsetzbar. Die Zahl der von-Willebrand-Faktor Rezeptorkomplexe ist jedoch deutlich niedriger als die der Fibrinogenrezeptorkomplexe pro Thrombozyt und sinkt auf aktivierten Plättchen weiter ab. Daher ist die Verwendung der beiden gegen den Fibrinogenrezeptorkomplex (CD61 oder CD41) gerichteten mAk zu bevorzugen.

Für die Bestimmung der Thrombozytenkonzentration im Blut von Patienten mit Thrombasthenie Glanzmann muss ein Antikörper gegen CD42 verwendet werden, da bei dieser angeborenen Thrombozytopathie die Fibrinogenbindungsstelle GPIIb-IIIa (CD41) fehlt oder einen Defekt aufweist.

Bei Patienten mit Bernard-Soulier-Syndrom muss die Antikörperkombination CD61 und CD41 eingesetzt werden, da bei dieser Erkrankung ein Defekt oder Fehlen der von-Willebrand-Faktor-Bindungsstelle GPIb-IX-V (CD42a-d) vorliegt, die die Bindung von CD42 Antikörpern verhindern kann.

Die Fluorochrome, mit denen die mAk kovalent verbunden sind, müssen so gewählt sein, dass ihre Absorptionsbanden an die Wellenlänge der eingesetzten Laser angepasst sind. Die photochemische Stabilität und die Quantenausbeuten der Fluorochrome müssen möglichst groß sein, um die Fluoreszenz der spezifisch markierten Thrombozyten gut von der Eigenfluoreszenz der Thrombozyten und von der Fluoreszenz von Zellen, die mit den ausgewählten mAk nicht reagieren, zu trennen.

ANMERKUNG 2 Beispielsweise ist die Fluoreszenzausbeute von Phycoerythrin (PE) größer als die von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) bei Anregung mit einem Laserstrahl der Wellenlänge 488 nm, so dass die Verwendung Plättchen-spezifischer mAk mit kovalenter PE-Konjugation zu bevorzugen ist.

Für jede neue Charge der eingesetzten mAk muss eine Titration zur Bestimmung der optimalen Konzentration der mAk nach den bekannten Protokollen der Durchflusszytometrie vorgenommen werden. Damit wird eine möglichst gute Unterscheidbarkeit gefärbter Thrombozyten und Zellen, die nicht mit den Plättchen-spezifischen mAk reagieren, erreicht.

ANMERKUNG 3 Die Titrationsreihe kann mit einer Vorverdünnung der Probe, z. B. unter Verwendung eines Volumens von 100 µL EDTA-Vollblut einer Probe mit $(400\,000 \pm 50\,000)$ Thrombozyten μL^{-1} und 1,9 mL PBS/BSA Lösung, die 1 g/L IgG enthält, durchgeführt werden. Nach 15 min werden Teilproben von jeweils 100 µL mit 5 µL, 10 µL, 15 µL, 20 µL, 30 µL der Lösung mit dem direktmarkierten monoklonalen Antikörper (z. B. CD41-PE) über 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird auf ein Gesamtvolumen von etwa 2 mL mit PBS/BSA aufgefüllt und am Durchflusszytometer gemessen. Die mittlere Fluoreszenzintensität der Thrombozyten wird als Funktion der Konzentration des verwendeten mAk analysiert. Als sättigend wird die Konzentration bewertet, bei der die Verdoppelung des Volumen des Antikörpers nur zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität von kleiner als 15 % führt. Das so bestimmte Volumen des Antikörperreagenzes wird – nach linearer Skalierung auf die Konzentration der Thrombozyten in der zu untersuchenden Blutprobe – zur Färbung der Proben für die Messung der Thrombozytenkonzentration verwendet. Typische Volumina einer Antikörperlösung, bei der alle Oberflächenbindungsstellen gesättigt werden, betragen etwa 10 µL.

6.3 Vorbereitung der Referenzmessung

Die folgenden Anforderungen müssen erfüllt werden:

- zum Triggern der Datenaufnahme muss die Intensität der Fluoreszenz der Emissionswellenlänge des eingesetzten Fluorochromes verwendet werden;

ANMERKUNG 1 Bei gleichzeitiger Verwendung verschiedener Fluorochrome ist für das Triggern der Datenaufnahme der Fluoreszenzfarbstoff, der eine bessere Diskriminierung spezifisch gefärbter und nicht gefärbter Partikel erlaubt, zu bevorzugen.

- Überprüfung und gegebenenfalls Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit, der Linearität und der Verstärkereinstellungen bezüglich der optimalen Nutzung des dynamischen Bereiches bei der Messung der Fluoreszenzintensität unter Verwendung geeigneten Kontrollmaterials;

ANMERKUNG 2 Die Empfindlichkeit beim Nachweis der Laser-induzierten Fluoreszenz kann überprüft werden mit Polystyrolkugeln, die mit einer bekannten Anzahl von Fluorophoren markiert sind und Signalamplituden im Bereich der mit mAk-markierten Thrombozyten aufweisen.

- Überprüfung und gegebenenfalls Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit und des dynamischen Bereiches bei der Messung der Lichtstreuung;

ANMERKUNG 3 Zur Überprüfung der Nachweisempfindlichkeit bei Streulichtmessungen sind Polystyrolkugeln verschiedener Volumina geeignet. Dabei ist zu beachten, dass wegen der geringeren Brechungsindices der Blutzellen ihre Streulichtintensität im Vergleich zu Polystyrolkugeln gleichen Volumens geringer ist. Um die Lichtstreuung von Thrombozyten mit ausreichendem Signal-Untergrund Verhältnis zu detektieren, ist der Nachweis der Lichtstreuung von Polystyrolkugeln mit einem Durchmesser von etwa 500 nm erforderlich.

- Blutentnahme und Probenvorbereitung nach DIN 58932-1;
- Angleich der Probe und der verwendeten Reagenzien an eine Temperatur von $(21 \pm 3) ^\circ\text{C}$;

ANMERKUNG 4 Zur Verdünnung ist beispielsweise 0,01-molare PBS-Lösung (phosphate buffered saline) ohne Calcium und Magnesium geeignet, die bovines Serumalbumin (BSA) von 1 g/L enthält.

- mit Antikoagulanzen (vorzugsweise EDTA), versetztes Blut durch mindestens 10 malige Überkopfbewegungen gründlich mischen, wobei Schaumbildung zu vermeiden ist;
- Herstellung einer Vorverdünnung durch den Zusatz von PBS/BSA Lösung mit IgG. Die eingesetzten Mengen sind hinreichend groß zu wählen, so dass die in 6.1 geforderten Messunsicherheiten der Volumina $V_{i,j}$ und der Volumenanteile ϕ_i eingehalten werden und die Thrombozytenkonzentration zur nachfolgenden Färbung mit mAk gut geeignet ist;
- Färbung der Thrombozyten erfolgt durch Hinzufügen von fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern in der durch die Titrationsreihe bestimmten Menge (siehe ANMERKUNG 3 in 6.2);
- Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur für 15 Minuten oder gemäß den Angaben der Hersteller der mAk. Bei unzureichender Differenzierung der Thrombozyten von anderen Zellen, können gegebenenfalls Temperatur verringert und Inkubationsdauer verlängert werden;
- Herstellung einer Messsuspension durch Verdünnen der zur Färbung verwendeten Suspension mit einem geeigneten Verdünnungsmittel; Änderungen der Thrombozytenkonzentration durch den Zusatz der verschiedenen Reagenzien zur Probe sind zu berücksichtigen;
- mit dieser Messsuspension wird der untere Diskriminatorschwellenwert manuell oder automatisch eingestellt. Dabei muss sichergestellt sein, dass alle den Thrombozyten entsprechenden Signale erfasst werden. Der Anteil der Untergrundimpulse bei geringen Signalamplituden (z. B. durch Verstärker-rauschen) muss geringer sein als 10 % bezogen auf die Anzahl der registrierten Ereignisse, die von Thrombozyten hervorgerufen werden;
- Überprüfung und gegebenenfalls Einstellung der Intensität der Laserstrahlen bezüglich der bestmöglichen Unterscheidung zwischen den mit mAk gefärbten Thrombozyten und anderen Blutzellen;

ANMERKUNG 5 Zu geringe Laserleistungen haben eine geringe Nachweisempfindlichkeit zur Folge. Bei zu hohen Laserleistungen kann die Fluoreszenz der kovalent an die mAk gebundenen Fluorophore bereits gesättigt sein, während die durch interne Bestandteile verursachte Eigenfluoreszenz der Zellen noch linear mit zunehmender Laserleistung ansteigt. Damit wird die Trennung zwischen gefärbten und nicht gefärbten Zellen verschlechtert.

- Überprüfung und gegebenenfalls Einstellung der Beobachtungsraumwinkel beim Streulichtnachweis bezüglich der bestmöglichen Unterscheidung zwischen Thrombozyten und anderen Blutzellen;

ANMERKUNG 6 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.

- Herstellung von mindestens drei weiteren Verdünnungen aus der Probe zur Ermittlung der Koinzidenzkorrektur, 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 doppelten Messunsicherheit $2u_{\text{rel}}(\phi_i) \leq 1\%$ bestimmt sein; das Verhältnis zwischen maximalem und minimalem Volumenanteil muss ≥ 4 sein:

$$\frac{\max(\phi_i)}{\min(\phi_i)} \geq 4 \quad (6)$$

für ϕ_1 kann entweder der vom Gerätehersteller empfohlene (z. B. $\phi_1 = 1 : 400$) oder ein abweichender Wert gewählt werden, wenn sichergestellt ist, dass die Messwerte bei allen Verdünnungen noch in den Messbereich des Gerätes fallen. Bei gravimetrischer Verdünnung müssen die Dichten der Probe, des Verdünnungsmittels und der weiteren verwendeten Reagenzien gemessen und berücksichtigt werden.

6.4 Durchführung der Referenzmessung

Vor jeder Messung muss der Leerwert bestimmt werden. Die Einstellung der Diskriminatorschwelle des Triggerkanals und das Messvolumen müssen bei der Bestimmung des Leerwertes und der Konzentration der Thrombozyten identisch sein. Ist die Verwendung identischer Volumina nicht möglich, müssen die Leerwerte entsprechend umgerechnet werden.

Der Leerwert darf in der Region, in der die Thrombozytensignale auftreten, 100 Zählpulse je Milliliter Verdünnungsmittel einschließlich aller Zusätze von Reagenzien (Färbemittel, Fixative) nicht überschreiten. Außerdem darf der Leerwert den Wert $1/\sqrt{N_{\text{ri},j}}$, der der statistischen Messunsicherheit der registrierten Thrombozytensignale einer Einzelmessung entspricht, nicht übersteigen.

Werden diese Bedingungen nicht erfüllt, sind die Ursachen zu suchen und zu beseitigen. Erhöhte Leerwerte können verursacht werden durch das Verdünnungsmittel, durch die für eine hydrodynamische Fokussierung verwendete Lösung, durch elektrische oder thermische Störungen im Thrombozytenzählgerät oder durch Einflüsse am Aufstellungsort.

Nach gründlicher Durchmischung der Messsuspensionen werden von den einzelnen Verdünnungen i mindestens drei Wiederholungsmessungen j durchgeführt, um sicherzustellen, dass eine ausreichende Anzahl von Thrombozyten registriert wird. Dabei darf die erweiterte relative Unsicherheit der Thrombozytenanzahl $\bar{N}_{\text{ri}}$ für Thrombozytenkonzentrationen größer oder gleich $20\,000\ \mu\text{L}^{-1}$ höchstens 5 % betragen (siehe Gleichung (2) in 6.1), d. h.

$$2u_{\text{rel}}(\bar{N}_{\text{ri}}) = 2u_{\text{rel}}\left(\sum_{j=1}^k N_{\text{ri},j}\right) \leq 5\%$$

Für Thrombozytenkonzentrationen kleiner als $C_0 = 20\,000\ \mu\text{L}^{-1}$ darf die erweiterte Messunsicherheit aufgrund der Zählstatistik (siehe Gleichungen 2b, 2c in 6.1) den Wert

$$2u_{\text{rel}}(\bar{N}_{\text{ri}}) = 2u_{\text{rel}}\left(\sum_{j=1}^k N_{\text{ri},j}\right) \leq \frac{2 \times 500\ \mu\text{L}^{-1}}{C}$$

nicht überschreiten.

ANMERKUNG 1 Die Gesamtmessunsicherheit ist gegeben durch $2u(\bar{C}_{\text{ri}}) = C \{2u_{\text{rel}}(\bar{N}_{\text{ri}}) + 2u_{\text{rel}}(\bar{V}_i) + 2u_{\text{rel}}(\phi_i)\}$. Für $C < 20\,000\ \mu\text{L}^{-1}$ darf der statistische Beitrag $C \{2u_{\text{rel}}(\bar{N}_{\text{ri}})\}$ zu dieser Gesamtmessunsicherheit den Wert $1\,000\ \mu\text{L}^{-1}$ nicht überschreiten.