

DIN 58932-6



ICS 11.100.30

**Hämatologie –
Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut –
Teil 6: Referenzverfahren zur Bestimmung der Konzentration von
CD4-positiven Lymphozyten;
Text Deutsch und Englisch**

Haematology –
Determination of the concentration of blood corpuscles in blood –
Part 6: Reference method for the determination of the concentration of CD4 positive
lymphocytes;
Text in German and English

Hématologie –
Détermination de la concentration des cellules sanguines –
Partie 6: Méthode de référence pour la détermination de la concentration des lymphocytes
CD4-positifs;
Texte en allemand et anglais

Gesamtumfang 35 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Begriffe	4
4 Symbole und Abkürzungen	5
5 Messgröße und Einheit	7
6 Referenzverfahren	7
6.1 Allgemeines	7
6.2 Prinzip des Referenzverfahrens	7
6.3 Herstellung der Messsuspension	7
6.4 Anforderungen an das CD4-Zellzählgerät	8
6.5 Auswahl und Anwendung der Reagenzien zur immunologischen Markierung der CD4-positiven Lymphozyten	11
6.6 Vorbereitung der Referenzmessung	11
6.7 Durchführung der Referenzmessung	13
6.8 Auswertung	14
6.9 Messunsicherheit	15
6.10 Qualitätskontrolle des Referenzverfahrens	15
Literaturhinweise	17

Bilder

Bild 1 — Plan zur Herstellung der Messsuspensionen	8
Bild 2 — Identifikationsschema für CD4-positive Lymphozyten	14

Tabellen

Tabelle 1 — Zusammenstellung der verwendeten Abkürzungen und mathematischen Symbole .	5
---	---

Vorwort

Dieses Dokument wurde vom Arbeitsausschuss NA 063-03-06 AA „Hämatologie“ im DIN-Normenausschusses Medizin (NAMed) 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., DGZ 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 der 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.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument ist anzuwenden für die Bestimmung der Konzentration CD4-positiven Lymphozyten im Humanblut mit einem Referenzverfahren. Es ist nur für die analytische Phase anzuwenden.

Die Einhaltung der in diesem Dokument festgelegten geräte- und messtechnischen Anforderungen bei der Durchführung des Referenzverfahrens stellt sicher, dass Referenzwerte für die Konzentration der CD4-positiven Lymphozyten im Blut mit einer möglichst geringen Messunsicherheit bestimmt wird.

Dieses Dokument ist auch zur Partikelzählung in stabilisierten Kontrollbluten mit fixierten humanen Blutkörperchen oder in Suspensionen mit Partikeln nicht biologischen Ursprungs (z. B. Mikropartikel mit Oberflächenantigenen) anzuwenden, wenn sich die zu messenden Partikel messtechnisch wie CD4-positive Lymphozyten (definiert in 3.1) 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; Text Deutsch und Englisch*

3 Begriffe

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

CD4-positive Lymphozyten

kernhaltige humane Zellen, die an ihrer Oberfläche die Antigene CD45, CD3 und CD4 exprimieren

3.2

CD4 Zellzählgerät

durchflusszytometrisches Analysegerät zur Zählung suspendierter Blutzellen, in welchem die CD4-positiven Lymphozyten registriert werden, mit der Möglichkeit die Fluoreszenz von gefärbten Teilchen und das Messvolumen zu erfassen und die elektronischen Signale zu verarbeiten

3.3

durchflusszytometrisches Messverfahren

Messverfahren, bei dem sich die Konzentration von CD4-positiven Lymphozyten in Blut ergibt aus:

- der Anzahl CD4-positiver Lymphozyten, welche während der Messung durch den Messwertaufnehmer strömen;
- dem Messvolumen und
- dem Volumenanteil des Blutes in der Messsuspension

Anmerkung 1 zum Begriff: Erläuterungen siehe Abschnitt 6.

3.4

Leerwertbestimmung

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

[QUELLE: DIN 58932-4:2003-07, 3.4]

3.5

Untergrund

Beitrag zum Messwert der Konzentration der CD4-positiven Lymphozyten, verursacht durch nicht von CD4-positiven Lymphozyten herrührende Zählereignisse

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

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

Die Auswirkungen dieser Störgrößen werden durch die Leerwertbestimmung nachgewiesen und ihre Auswirkungen quantifiziert. Weitere Beiträge zum Untergrund werden verursacht durch die zu untersuchende Probe, d. h. Matrixeffekte (Partikel in der Probe, die keine Lymphozyten sind, jedoch entsprechende Zählereignisse verursachen, z. B. hervorgerufen durch Zellfragmente).

3.6

Probe

ungerinnbar gemachtes Blut humanen Ursprungs

[QUELLE: DIN 58932-5:2007-10, 3.6, modifiziert — Anmerkung 1 zum Begriff wurde nicht übernommen.]

3.7

Messsuspension

die auf einen bestimmten Volumenanteil verdünnte Probe

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

3.8

Messvolumen

Volumen der Messsuspension, die während der Messung von dem Messwertaufnehmer erfasst wird

4 Symbole und Abkürzungen

Alle für die Anwendung dieses Dokuments nötigen mathematischen Symbole sowie die verwendeten Abkürzungen befinden sich in Tabelle 1.

Tabelle 1 — Zusammenstellung der verwendeten Abkürzungen und mathematischen Symbole

Symbol oder Abkürzung	Bedeutung	Einheit
C	Konzentration CD4-positiver Lymphozyten in der Probe	l^{-1}
C_0	Festgelegte Konzentration CD4-positiver Lymphozyten oberhalb derer die relative Messunsicherheit einen geforderten Wert nicht überschreiten darf	l^{-1}

Tabelle 1 (fortgesetzt)

Symbol oder Abkürzung	Bedeutung	Einheit
C_{ij}	Konzentration CD4-positiver Lymphozyten in der Messprobe i , bei der Wiederholungsmessung j (abgeleitet von der registrierten Konzentration C_{rij} durch Korrektur der Koinzidenzverluste)	l^{-1}
C_{rij}	Berechnete (siehe Gleichung (2)) Konzentration CD4-positiver Lymphozyten in der Messsuspension i , Wiederholungsmessung j	l^{-1}
$\bar{C}$	Durch Mittelung der Messergebnisse bestimmte Konzentration CD4-positiver Lymphozyten in der Probe	l^{-1}
$\bar{C}_i$	Über alle Wiederholungsmessungen j gemittelte Konzentration der CD4-positiven Lymphozyten in der Messprobe i	l^{-1}
$\bar{C}_{ri}$	Über alle Wiederholungsmessungen j gemittelte registrierte oder berechnete Konzentration CD4-positiver Lymphozyten in der Messprobe i	l^{-1}
CD	Differenzierungscluster (en: cluster of differentiation)	—
i	Index der Verdünnung oder Messsuspension	1
j	Index der Wiederholungsmessungen der Verdünnung i	1
k	Erweiterungsfaktor zur Bestimmung der erweiterten Messunsicherheit entsprechend den effektiven Freiheitsgraden	1
K_{ij}	Koinzidenzkorrekturparameter	1
m	Anzahl der Verdünnungen	1
mAk	Monoklonale/r Antikörper	—
n	Anzahl von Wiederholungsmessungen für eine bestimmte Verdünnung, Stichprobenumfang	1
N	Anzahl von CD4-positiven Lymphozyten in dem Volumen V der Probe	1
N_{ij}	Anzahl von registrierten CD4-positiven Lymphozyten in einem Volumen V_{ij} der Messprobe i der Wiederholungsmessung j	1
N_{rij}	Anzahl von registrierten CD4-positiven Lymphozyten in einem Volumen V_{ij} der Messprobe i der Wiederholungsmessung j	1
$N_{ri,j}^{\text{total}}$	Gesamtanzahl aller bei der Wiederholungsmessung j registrierten Ereignisse in einem Volumen V_{ij} der Messprobe i	1
$\bar{N}_{ri}$	Über alle Wiederholungsmessungen j gemittelte Anzahl der registrierten CD4-positiven Lymphozyten in einem Volumen $\bar{V}_i$ der Messprobe i	1
t_{ij}	Messzeit der Messsuspension i , Wiederholungsmessung j	s
u	Standardmessunsicherheit	Einheit der jeweiligen Messgröße
u_{rel}	relative Standardmessunsicherheit	1
V	Volumen der Probe	l
V_i	Teilvolumen der Probe	l

Tabelle 1 (fortgesetzt)

Symbol oder Abkürzung	Bedeutung	Einheit
V_{ij}	Volumen der Messsuspension i , Wiederholungsmessung j	l
$\bar{V}_i$	Über alle Wiederholungsmessungen j gemittelt 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 Konzentration von CD4-positiven Lymphozyten 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 Allgemeines

Das Referenzverfahren zur Bestimmung der Konzentration der Zellen basiert auf optischen Durchflusszytometern, die die Messung des Probenvolumens gestatten. Der spezifische Nachweis der Zellen ist durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper möglich [1] [2].

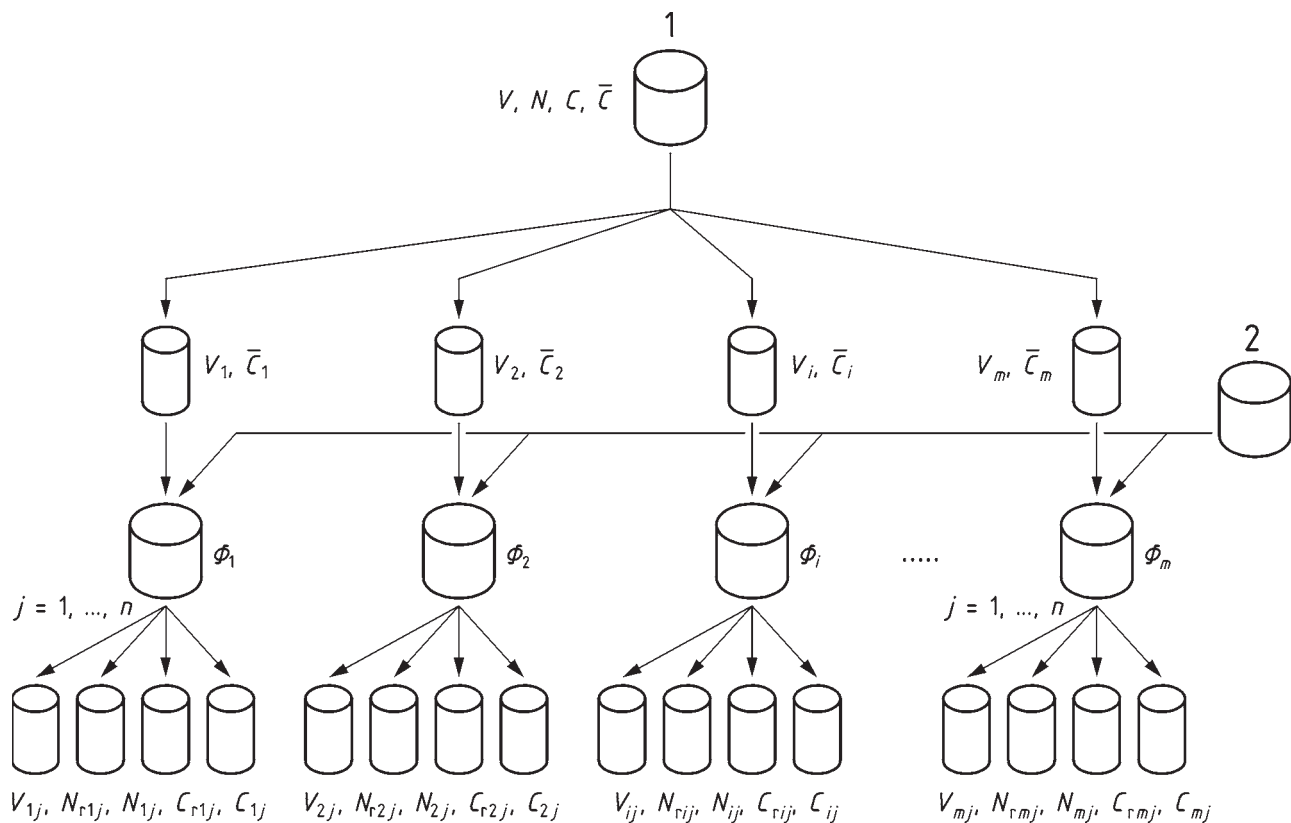
6.2 Prinzip des Referenzverfahrens

Das Referenzverfahren kann zur Bestimmung der Zellkonzentration von CD4-positiven Lymphozyten in der Probe angewendet werden. Um die Probenstabilität während der Anwendung des Referenzverfahrens sicherzustellen, muss die Blutprobe mit einer Antikoagulanzenz reagent versetzt werden. Als Antikoagulanzenz sollte Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) verwendet werden. Das Referenzverfahren basiert zum einen auf der immunologischen Färbung mit Antikörpern zum Zwecke der Identifikation und Zählung der Zielzellpopulation und zum anderen auf der Erfassung des mit der Zählung der CD4-positiven Lymphozyten korrelierten Messvolumens, entsprechend der Bestimmungsgleichung (1):

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

6.3 Herstellung der Messsuspension

Von dem Probenvolumen V wird nach gründlicher Durchmischung ein Teilvolumen V_i entnommen und mit den weiter unten spezifizierten monoklonalen Antikörpern zur spezifischen Färbung versetzt (siehe Bild 1). Nach Abschluss der Färbung kann es erforderlich sein, die Probe zu stabilisieren, oder auch zu fixieren. Die bei diesen Prozessschritten entstehende volumetrische Verdünnung ϕ_i ($i = 1, \dots, m$) wird durch gravimetrische Kontrolle der zugesetzten Reagenzien bestimmt, wobei die Dichte der Blutprobe und der Reagenzien getrennt bestimmt werden muss. Dies gilt auch für das zur Einstellung verschiedener Konzentrationen eingesetzte Verdünnungsmittel. Die Konzentration der CD4-positiven Lymphozyten in der Messsuspension i wird wiederholt gemessen, wobei das jeweilige Volumen der Messsuspension V_{ij} ($j = 1, \dots, n$) ist (siehe Bild 1). Details der Präparation und zur Messung sind weiter unten beschrieben. Die Anzahl der erforderlichen Wiederholungsmessungen und Volumenanteile ist in 6.6 und 6.7 beschrieben.



Legende

- 1 Blutprobe
2 Reagenzien

ANMERKUNG 1 Wiederholungsmessungen der Verdünnung (d. h. Messsuspension) i werden mit dem Index j gekennzeichnet, die Anzahl von registrierten Ereignissen ist N_{rij} , und das Messvolumen ist V_{ij} .

ANMERKUNG 2 Alle weiteren Symbole sind in Tabelle 1 erklärt.

Bild 1 — Plan zur Herstellung der Messsuspensionen

6.4 Anforderungen an das CD4-Zellzählgerät

Als Referenzgerät kann jedes nach dem durchflusszytometrischen Messverfahren arbeitende Zellzählgerät verwendet werden, sofern es über mindestens fünf Detektoren verfügt, welche die simultane Erfassung von Vorwärts-, Seitwärtsstreuung und drei spektral unabhängigen Fluoreszenzsignalen zur Unterscheidung der CD4-positiven Lymphozyten von anderen Zell- oder Partikelpopulationen ermöglichen. Die drei Detektionskanäle zum Fluoreszenznachweis müssen verwendet werden, um die für CD4-positive Lymphozyten charakteristischen Antigene (CD4 sowie CD3 und CD45) mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper spezifisch nachzuweisen.

ANMERKUNG 1 Zusätzliche Detektionskanäle für die Fluoreszenz können die Diskriminierung verbessern, z. B. durch die Verwendung von Isotyp- oder Negativkontrollen wie die Markierung für CD8.

Das Gerät muss so beschaffen und mit Zusatzeinrichtungen ausgestattet sein, dass die in Gleichung (1) und Gleichung (2) vorkommenden Größen zur Berechnung der Partikelkonzentration im jeweiligen Volumen der Messsuspension:

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

mit den unten angegebenen erweiterten relativen Messunsicherheiten $k \cdot u_{\text{rel}}$ bestimmt werden können. Das CD4-Zellzählgerät muss geeignet sein die nachfolgend angegebenen Messunsicherheiten einzuhalten. Der Erweiterungsfaktor k muss entsprechend einem Vertrauensniveau von 95 % unter der Annahme einer Normalverteilung der Messwerte bei Wiederholungsmessungen gewählt werden.

ANMERKUNG 2 Ein Verfahren zur Bestimmung des Erweiterungsfaktors ist in JCGM 100:2008, Anhang G, [3] beschrieben.

Dabei gilt für:

N Die Anzahl der CD4-positiven Lymphozyten N , die im Volumen V der Probe enthalten sind, muss mit einer relativen Messunsicherheit von $u_{\text{rel}}(N) \leq 2,5 \%$ bestimmt werden (siehe 6.5 bis 6.9). Zählverluste CD4-positiven Lymphozyten aufgrund der Koinzidenz müssen durch Anwendung einer numerischen Korrektur berücksichtigt werden (siehe 6.8). Wenn die automatische Koinzidenzkorrektur des Zellzählgerätes nicht abgeschaltet werden kann, sind die vom Sensor aufgenommenen verstärkten Primärsignale zu verwenden. Elektronische Totzeiten (Zeitkonstanten, Impulsverarbeitungszeiten) müssen im Vergleich zur Impulsauflösungszeit der verstärkten Detektorimpulse vernachlässigbar klein sein.

ANMERKUNG 3 Verdünnungsreihen können verwendet werden, um zu prüfen, dass Zählverluste vernachlässigbar sind.

Im Falle einer Konzentration CD4-positiver Lymphozyten kleiner als $C_0 = 300 \mu\text{l}^{-1}$ muss die relative Messunsicherheit folgende Bedingung erfüllen:

$$u_{\text{rel}}(N) \leq 0,025 \times C_0/C, C \leq C_0,$$

d. h.

$$u_{\text{rel}}(N) |_{C \leq C_0} \leq \frac{7,5 \mu\text{l}^{-1}}{C}$$

N wird berechnet aus den registrierten Zählereignisse $N_{r,j}$ nach Abzug des Untergrunds.

$V_{i,j}$ Das Volumen der Messsuspension i , die während der Messung j durch den sensitiven Bereich des Messwertaufnehmers strömt, muss mit einer relativen Messunsicherheit von $u_{\text{rel}}(V_{i,j}) \leq 0,3 \%$ bestimmt werden.

ANMERKUNG 4 Die Bestimmung von $V_{i,j}$ unter Verwendung von Start-Stopp-Elektroden oder unter Verwendung von Partikelsuspensionen, die mit der Messsuspension gemischt werden, um die Durchflussrate zu bestimmen, erlaubt es normalerweise nicht, die erforderliche Messunsicherheit zu erreichen [4].

ϕ_i Der Volumenanteil der Probe in der Messsuspension i muss mit einer relativen Messunsicherheit $u_{\text{rel}}(\phi_i) \leq 0,5 \%$ bestimmt werden.

ANMERKUNG 5 Aufgrund der Koinzidenzverluste ist die erfasste bzw. berechnete (entsprechend Gleichung (2)) Konzentration CD4-positiver Lymphozyten $C_{r,j}$ kleiner als die Konzentration CD4-positiver Lymphozyten $\phi_i \times C$ in der Messsuspension.

Um CD4-positive Lymphozyten identifizieren zu können, muss das Referenzmessgerät für jedes registrierte Teilchen in der Messsuspension neben der Lichtstreuung in Vorwärts- und Seitwärtsrichtung die Fluoreszenzintensitäten mindestens in jeweils drei Emissionsbanden aufzeichnen. Das Referenzmessgerät muss mit einer Überwachungseinrichtung für die Messzeit $t_{i,j}$ und mit einem Impulshöhenanalysator für jede Messgröße ausgestattet 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 Messprobe so gering sein, dass eine von den elektronischen Komponenten verursachte Basislinienverschiebung die Messung nicht beeinträchtigt.

Das CD4-Zellzählgerät sowie die verwendeten Gefäße für die Messproben müssen so beschaffen sein, dass ihre Einflüsse auf die Partikelkonzentration durch:

- a) statische Entmischungseffekte wie Sedimentation, Adhäsion von Lymphozyten an Gefäß- und Schlauchwänden;
- b) dynamische Entmischungseffekte (Fåhræus Effekt);
- c) den Untergrund;
- d) Verschleppung;

minimiert sind und gegebenenfalls durch Korrekturen berücksichtigt werden können.

ANMERKUNG 6 Der Untergrund kann verursacht werden durch:

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

Die Störgrößen werden durch die Leerwertbestimmung nachgewiesen und ihre Auswirkungen quantifiziert. Weitere Beiträge zum Untergrund werden verursacht durch die zu untersuchende Probe, d. h. Matrixeffekte (Partikel in der Probe, die keine CD4-positiven Lymphozyten sind, jedoch entsprechende Zählereignisse verursachen, z. B. hervorgerufen durch Zellfragmente).

Die relativen Messunsicherheiten der angewendeten Korrekturen müssen einzeln untersucht oder — wo dies nicht möglich ist — abgeschätzt sein. Die erweiterten Messunsicherheiten dieser Korrekturen dürfen zusammen 1 % der Konzentration CD4-positiver Lymphozyten nicht übersteigen (quadratische Addition der Komponenten, Vertrauensniveau 95 %).

Zur Ermittlung des Einflusses der Adhäsion der CD4-positiven Lymphozyten an den Becherwandungen oder des Einflusses der Reagenzien wird die Konzentration der CD4-positiven Lymphozyten 30 s sowie 10 min nach Herstellung der Messsuspension bestimmt. Die Messsuspension muss unmittelbar vor der Messung gemischt werden. Diese Messung muss mindestens 10-mal wiederholt werden. Die Differenz der beiden gemittelten Messwerte darf 2 % des ersten Messwertes nicht übersteigen (Annahme einer linearen Zeitabhängigkeit der Adhäsion).

ANMERKUNG 7 Zur Probenpräparation eignen sich insbesondere Behälter oder Röhrchen aus Polypropylen.

Die Abweichung der Konzentration CD4-positiver Lymphozyten bei Messungen vor und nach fünfmaligem Umfüllen der Suspension in einen jeweils frischen Probenbecher darf 2 % des ersten Messwertes im Mittel von zehn Wiederholungsmessungen nicht übersteigen.

Die Gesamtzahl der registrierten CD4-positiven Ereignisse $\sum_{j=1}^n N_{ri,j}$ muss für jede Messsuspension i ausreichend groß gewählt werden, so dass die relative Messunsicherheit aufgrund von Zählstatistiken kleiner gleich 2,5 % ist, d. h.:

$$\sum_{j=1}^n N_{ri,j} \geq 1\,600 \quad (3)$$

Im Falle von Konzentrationen von CD4-positiven Lymphozyten geringer als $C_0 = 300 \mu\text{l}^{-1}$ muss die Unsicherheit aufgrund von Zählstatistiken für jede Messsuspension i kleiner als $7,5 \mu\text{l}^{-1}$ sein. Damit hängt die relative Unsicherheit von der Konzentration C der CD4-positiven Lymphozyten in der Probe ab; die Gesamtzahl der

registrierten Ereignisse hängt von der Konzentration C ab, nach:

$$\sum_{j=1}^n N_{ri,j} \geq 1600 \cdot \left(\frac{C}{C_0}\right)^2 \quad (4)$$

Um sicherzustellen, dass die benötigte Anzahl von Ereignissen $\sum_{j=1}^n N_{ri,j}$ auch erfasst wird, kann, wenn nötig, eine angemessene Anzahl n von Wiederholungsmessungen der gleichen Messsuspension durchgeführt werden. Die Anzahl N von CD4-positiven Lymphozyten wird berechnet aus der Größe $\bar{N}_{ri}$, deren relative Messunsicherheit sich ergibt nach:

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

Die Totzeit τ des CD4-Zellzählgerätes muss mit einer relativen Standardunsicherheit von 10 % bekannt sein.

Falls das CD4-Zellzählgerät keine Vorrichtung zur Messung der Totzeit besitzt, muss die Totzeit getrennt bestimmt werden. Die Totzeit kann durch Messung einer Verdünnungsreihe bestimmt werden. Das Probenmaterial muss dabei eine Signalhöhe im Trigger-Kanal besitzen, die dem der gemessenen CD4-positiven Lymphozyten entspricht.

6.5 Auswahl und Anwendung der Reagenzien zur immunologischen Markierung der CD4-positiven Lymphozyten

Die Antigene an die anti-CD4 sich binden kann, werden von reifen CD4-positiven Lymphozyten und einigen ihrer Vorläuferzellen (verschiedene Thymozyten) als auch mit niedriger Expression von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen ausgebildet. Um andere Zellen als CD4-positive Lymphozyten auszuschließen, ist die zusätzliche Benutzung von anti-CD3 und anti-CD45 vorgeschrieben.

Die Fluorochrome, an die die monoklonalen Antikörper (mAk) kovalent gebunden 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 CD4-positiven Lymphozyten gut von der Fluoreszenz der CD4-positiven Monozyten und von der Fluoreszenz von Zellen, die mit den ausgewählten mAk nicht reagieren, zu trennen.

Für jede neue Charge der eingesetzten mAk muss eine Titration zur Bestimmung der optimalen mAk-Konzentration vorgenommen werden. Die Anwendung dieses Verfahrens erlaubt es, eine bestmögliche Differenzierung zwischen markierten CD4-positiven Zellen und Zellen zu erhalten, die nicht spezifisch mit den mAk reagieren, zu erreichen.

6.6 Vorbereitung der Referenzmessung

Die folgenden Anforderungen müssen erfüllt werden:

- die Datenerfassung muss auf dem Fluoreszenzsignal entsprechend der benutzten CD4-Fluorochrom Kombination getriggert werden, damit ein möglichst gutes Signal-Untergrund-Verhältnis und ein bevorzugter Nachweis der Zielpopulation erreicht wird;
- die Nachweisempfindlichkeit, die Linearität und die Verstärkereinstellung/en müssen geprüft und gegebenenfalls korrigiert werden, um die optimale Nutzung des dynamischen Bereichs bei der Messung verschiedener optischer Signale sicherzustellen. Zu diesem Zweck ist geeignetes Kontrollmaterial zu verwenden;

ANMERKUNG 1 Die Empfindlichkeit beim Nachweis der Laser-induzierten Fluoreszenz kann mit einer bekannten Anzahl von Fluorophoren gefärbten Partikel bestimmt werden, welche Signalamplituden zeigen, die denen von mit mAk markierten Lymphozyten entsprechen.

- Blutentnahme und Probenvorbereitung nach DIN 58932-1;