



# PATENTSCHRIFT 143 179

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

Int. Cl.<sup>3</sup>

(11) 143 179

(44) 06.08.80

3(51) G 01 N 15/06  
G 01 N 33/48

(21) WP G 01 N / 212 901

(22) 16.05.79

) siehe (72)

) Diederich, Georg, Dipl.-Chem.; Neunzling, Charlotte; Grothkopf, Peter, Dipl.-Chem.; Rudolf, Karen; Lestin, Heiko-Gundmar, Dr.med.; Scherdin, Marita; Michaelis, Sylvia, DD

(73) siehe (72)

(74) I. Lobitz, Bezirkskrankenhaus Schwerin, BfN, 27 Schwerin, Werderstraße 30

(54) Verfahren zur elektronischen Thrombozytenzählung

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur elektronischen Zählung von Thrombozyten aus verdünntem Venenblut, Kapillarblut oder plättchenreichem Plasma mit Geräten, die nach dem Coulter-Prinzip arbeiten und die nur mit einem unteren, verstellbaren Diskriminator (Schwellenwert) ausgerüstet sind. Dabei kommt eine Methode zur Anwendung, nach der die Thrombozytenzahl aus der Zahl aller vorhandenen Blutzellen minus der bei anderer Diskriminatorstellung gesondert ermittelten Zahl der Blutzellen, die größer als Thrombozyten sind, erhalten wird (Differenzmethode). Diese Zählweise wird mit Verfahren zur schnellen Probenvorbereitung, wie Schrägsedimentation oder Zentrifugation kombiniert. Dabei kann diese Probenvorbereitung schon nach kurzer Frist in unvollkommenem Zustand abgebrochen werden, ohne daß eine Qualitätseinbuße bei den Meßergebnissen auftritt. Das Verfahren ist am ungarischen Teilchenzählgerät PS-4 erprobt und durch umfassende Vergleiche mit der traditionellen Kammerzählung abgesichert.

10 Seiten





# PATENTSCHRIFT 143 179

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(11) 143 179 (44) 06.08.80 Int. Cl.<sup>3</sup> 3(51) G 01 N 15/06  
G 01 N 33/48  
(21) WP G 01 N / 212 901 (22) 16.05.79

Zur PS Nr. 143.179.....

ist eine Zeitschrift erschienen.

(Teilweise bestätigt ~~abgegeben~~ gem. § 6 Abs. 1 d. Änd. Ges. z. Pat. Ges.)

(73) siehe (72)

(74) I. Lobitz, Bezirkskrankenhaus Schwerin, BfN, 27 Schwerin,  
Werderstraße 30

(54) Verfahren zur elektronischen Thrombozytenzählung

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur elektronischen Zählung von Thrombozyten aus verdünntem Venenblut, Kapillarblut oder plättchenreichem Plasma mit Geräten, die nach dem Coulter-Prinzip arbeiten und die nur mit einem unteren, verstellbaren Diskriminator (Schwellenwert) ausgerüstet sind. Dabei kommt eine Methode zur Anwendung, nach der die Thrombozytenzahl aus der Zahl aller vorhandenen Blutzellen minus der bei anderer Diskriminatorstellung gesondert ermittelten Zahl der Blutzellen, die größer als Thrombozyten sind, erhalten wird (Differenzmethode). Diese Zählweise wird mit Verfahren zur schnellen Probenvorbereitung, wie Schrägsedimentation oder Zentrifugation kombiniert. Dabei kann diese Probenvorbereitung schon nach kurzer Frist in unvollkommenem Zustand abgebrochen werden, ohne daß eine Qualitätseinbuße bei den Meßergebnissen auftritt. Das Verfahren ist am ungarischen Teilchenzählgerät PS-4 erprobt und durch umfassende Vergleiche mit der traditionellen Kammerzählung abgesichert.

-4- 212901

Beschreibung der Erfindung

Titel der Erfindung

Verfahren zur elektronischen Thrombozytenzählung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Zählung von Thrombozyten aus Venenblut, Kapillarblut oder plättchenreichem Plasma unter Anwendung von elektronischen Zählgeräten, die nach dem Coulter-Prinzip arbeiten und nur mit einem unteren, verstellbaren Diskriminator ausgerüstet sind.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Verfahren zur elektronischen Zählung von Thrombozyten mit nach dem Coulter-Prinzip arbeitenden Geräten sind schon seit einiger Zeit bekannt (B.S. BULL et al , Amer.J.Clin.Pathol. 44(1965), 678-685 ; J.JÜRGENS, Ärztl.Lab. 14 (1968), 347-354). Dabei sind diese Verfahren je nach Art der angewandten Probenvorbereitung und der von der technischen Ausführung der benutzten Zählgeräte abhängigen Zählweise verschieden. Von BULL und JÜRGENS wurden Zählverfahren entwickelt, die auf Geräten mit nur einem unteren, verstellbaren Diskriminator Thrombozytenzählungen ermöglichen. Beide Verfahren arbeiten mit der Sedimentation als Probenvorbereitung. Nach BULL wird die Schrägsedimentation von Vollblut durchgeführt.

- Dabei ist jedoch eine Umrechnung der Zählergebnisse mit einem hämatokritabhängigen Korrekturfaktor notwendig. Bei zu hohem oder zu niedrigem Hämatokrit läßt sich diese Korrektur nicht durchführen (U.HOEFFLER u. K.OETTE; Z. Klin. Chem. Klin. Biochemie 12(1974) 198-206.
- 30 Ebenfalls nach HOFFLER und OETTE ergibt sich ein relativ hoher Prozentsatz von Untersuchungsgutproben, bei denen aufgrund schlechter Sedimentationseigenschaften das Ver-  
fahren nicht angewandt werden kann. Das Verfahren nach  
35 JÜRGENS bereitet die Proben mit Hilfe der Spontansedimen-  
tation in verdünntem Zitratblut vor. Die Sedimentations-  
zeit beträgt bei 5°C drei Stunden, was zu unvertretbar  
langen Bearbeitungszeiten, sowohl für die Einzelbestimmung,  
als auch für die Serie führt.
- 40 Die Zählung selbst wird nach der Differenzmethode durchge-  
führt. Zunächst ermittelt man bei geeigneter Diskriminator-  
stellung die Zahl aller in der Probe vorhandenen Blut-  
zellen. Im zweiten Zählschritt wird bei veränderter  
Diskriminatorstellung die Zahl aller Zellen bestimmt, die  
45 größer als Thrombozyten sind (Erythrozyten, Leukozyten).  
Die Thrombozytenzahl resultiert aus der Differenz beider  
Zählungen.
- Nach BULL sind wegen schwieriger Diskriminatoreinstellung  
stets zwei Geräte für diese Zählweise notwendig. Die auch  
50 nach JÜRGENS laufend notwendige Neueinstellung des Dis-  
kriminators ist ebenfalls schwierig. Die Umgehung dieses  
Problems durch geräteinterne Parallelzählung bringt jedoch  
erhebliche Qualitätsverluste bei den erhaltenen Ergebnissen.  
Sowohl nach BULL als auch nach JÜRGENS liegen die er-  
55 mittelten Zählergebnisse signifikant über den Werten, die  
mit der bisher klinisch bewährten Kammerzählung (H.STOBBE,  
Z.med.Labortechnik 1(1960),79) bestimmt werden.

Mit der technischen Vervollkommenung der elektronisch arbeitenden Zählgeräte werden Verfahren in den Vordergrund gerückt, welche die Anwendung einer unteren und einer oberen Diskriminatorschwelle voraussetzen und damit die Möglichkeit bieten, die Thrombozyten in nur einem Zählschritt zu erfassen (W.ADAM u. Mitarb., Blut 32 (1976), 347; E.BAUMGÄRTNER u. C.MAURER, Ärztl. Lab. 24 (1978), 186-190; B.S.BULL et al, Amer.J.Klin. Pathol. 44 (1965), 678-685; K.EISENBERG, Ärztl. Lab. 22 (1976), 263-266; M. de BRUYERE et al, Thrombos. Diathes. haemorrh.(Stuttg.) 32, 232 (1974); H.GADNER u. Mitarb., Schweiz.med.Wschr.104, 138-140 (1974); U.HOEFFLER u. K.OETTE, Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12 (1974) 198-206; R.KUSE u. Mitarb., Blut 35 (1977), 253-259; R. van BUUL u. A.O.M. von OUDHEUSEN, Ärztl. Lab. 21 (1975), 418-428). Die dabei auftretenden Fehlermöglichkeiten verlangen eine hohe gerätetechnische Perfektion (DT-AS 1598292 W.ADAM u. Mitarb., Blut 32 (1976), 347; R.KUSE u. Mitarb., Blut 35 (1977), 235-259)

Als Probenvorbereitung findet oft die schnell durchführbare Zentrifugation Anwendung (M. de BRUYERE et al, Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.) 32, 232 (1974); H.GADNER u. Mitarb., Schweiz.med. Wschr. 104, 138-140 (1974); R.KUSE u. Mitarb., Blut 35 (1977), 253-259). Auch ist ein Verfahren bekannt, nach welchem man direkt aus Vollblut mit Hilfe einer automatisierten Verhältnismethode Thrombozyten zählen kann (DT-AS 2 812 517). Hierbei muß jedoch eine vorhergehende Bestimmung der Erythrozytenzahl der jeweiligen Blutprobe erfolgen, was den durch Umgehung der Probenvorbereitung erhaltenen Zeitgewinn beträchtlich schmälert. Jedoch werden die Vorteile aller genannten Verfahren durch die hohe Empfindlichkeit der benutzten Geräte, den damit verbundenen großen Wartungsaufwand und den sehr hohen Anschaffungspreis aufgewogen.

90 So kommt es, daß sich die sehr objektiv und mit ausgezeichnete Präzision arbeitenden elektronische Thrombozytenzählung bisher in der Praxis wenig hat durchsetzen können.

95 Die ungarischen Medicor-Werke entwickelten mit dem elektronischen Teilchenzähler Picoscale (PS-4) ein Gerät, das in eigener technisch einfacher und leicht zu wartender Ausführung wieder das Zählprinzip mit nur einer unteren Diskriminatorschwelle zur Anwendung bringt (DL-PS 65681). Allerdings geht das vom Hersteller in der  
100 Bedienungsanleitung (Medicor-Werke Budapest, Bedienungsanleitung zum Teilchenzählgerät PS-4, 1976) verfaßte Zählverfahren von der falschen Voraussetzung einer möglichen, vollkommenen Spontansedimentation von Erythrozyten und Leukozyten bei gleichzeitigem Erhalt der ursprünglichen  
105 Thrombozytendichte aus. Es liefert so keine akzeptablen, mit der Kammerzählung (H.STOBBE, Z.med.Labortechnik 1 (1960), 79) vergleichbaren Werte. Zudem ist eine Probenvorbereitungszeit von über zwei Stunden im Routinebetrieb eines Labors nicht vertretbar.

110 Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zu entwickeln, mit dessen Hilfe, bei leicht durchführbarer, zeitsparender Probenvorbereitung, an Geräten, die nach dem Coulter-Prinzip arbeiten und nur einen unteren verstellbaren  
115 Diskriminator besitzen, Thrombozytenzahlen in einfacher Zählweise bestimmt werden können. Dabei muß eine gute Vergleichbarkeit der ermittelten Ergebnisse mit denen der bisher üblichen Kammerzählung gewährleistet sein. Das entwickelte Verfahren muß mit einer wesentlich besseren  
120 Präzision arbeiten als die manuell-optische Zählmethode.

Außerdem soll der Zeitaufwand für das entwickelte Verfahren möglichst dem anderer moderner elektronischer Zählverfahren entsprechen und damit bedeutend unter dem Zeitbedarf des traditionellen Kammerzählverfahrens liegen.

125 Darlegung des Wesens der Erfindung

Das Wesen der Erfindung besteht in der Entwicklung einer günstigen Kombination von schneller, unkomplizierter Probenvorbereitung mit einer, dem angewandten Zählgerät angepaßten Durchführung der Differenzmethode, die zur Bestimmung von Thrombozytenzahlen mit nur einem unteren, verstellbaren Diskriminator unumgänglich ist. Erfindungsgemäße Voraussetzung ist es, daß eine vollständige Abtrennung der Erythrozyten und Leukozyten von den zu bestimmenden Thrombozyten ohne hohen technischen und methodischen Aufwand nicht nur nicht möglich, sondern auch in weitem Maße nicht notwendig ist.

Die zur Anwendung gelangende Probenvorbereitungsart kann, sowohl als Sedimentation oder als Zentrifugation ausgeführt, in einem sehr unvollkommenen Zustand abgebrochen werden.

140 Dadurch wird bei der Sedimentation eine große Zeitersparnis erzielt, bei der Zentrifugation die ausschließliche Anwendung spezieller, aufwendiger Technik umgangen.

Der Zeitpunkt, an dem der Abbruch der Probenvorbereitung gerade schon möglich ist, hängt ab von der Empfindlichkeit des angewandten Zählgerätes, mit der es in der Lage ist, eine kleine Anzahl von Thrombozyten in einer ebenso großen oder größeren Anzahl von größeren Zellen (z.B. Erythrozyten) quantitativ exakt mit zu erfassen. Es ergeben sich bei der in verdünntem Untersuchungsgut ausgeführten Probenvor-

150 bereitung erfahrungsgemäß keine untersuchungsgutbedingten Ausnahmen, bei denen eine Zählung der Thrombozyten unmöglich ist. Weiterhin ist das Verfahren erfindungsgemäß durch eine geeignete große Verdünnung und durch unvollkommen ausgeführte Sedimentation oder Zentrifugation unabhängig von hämatokrit-spezifischen Korrekturfaktoren.

155

160 An den technisch relativ einfach aufgebauten Zählgeräten mit nur einem unteren, verstellbaren Diskriminator, die bisher vorrangig zur Zählung von Leukozyten und Erythrozyten eingesetzt sind, kann dann erfindungsgemäß aus dem nach obiger Beschreibung vorbereiteten, verdünnten Untersuchungs-  
 165 gutproben die Thrombozytenzahl pro Volumeneinheit nach der Differenzmethode bestimmt werden. Voraussetzung ist dabei die gerätetechnisch gegebene Möglichkeit, die Diskriminator-schwelle im ersten Zählschritt jeweils soweit abzusenken, daß auch die kleinsten Thrombozyten in entsprechend abgestimmten Meßöffnungen (Poren) erfaßt und vom Zählgerät registriert werden können.

Es werden zunächst bei abgesenkter Diskriminatorschwelle alle in der Suspension enthaltenen Blutzellen gezählt. Im zweiten  
 170 Zählschritt erfaßt man bei erhöhter Diskriminatorschwelle alle Blutzellen, außer den Thrombozyten. Die Thrombozytenzahl ergibt sich dann aus der Differenz beider Zählwerte, abzüglich eventuell zu bestimmender Leerwerte.

#### Ausführungsbeispiel

175 Verfahren zur Thrombozytenzählung am ungarischen Teilchenzählgerät PS-4:

#### Probenvorbereitung:

Zu 6,100 ml filtrierter HPJ-Lösung (MEDICOR-Werke Budapest, Bedienungsanleitung zum Teilchenzählgerät PS-4, 1976), die  
 180 in einem silikonisiertem Glasröhrchen vorgelegt sind, werden 0,200 ml EDTA-Blut pipettiert. Nach gründlicher Durchmischung des Inhalts wird das Röhrchen um 45° geneigt und offen zur Sedimentation abgestellt. Ist die Sedimentationszeit von einer halben Stunde abgelaufen, pipettiert man vom klaren  
 185 Überstand in ein weiteres silikonisiertes Glasröhrchen oder Plastgefäß ab. Hieraus werden zur Messung am PS-4 0,050 ml entnommen, und in 9,950 ml mehrmals filtrierte HPJ-Lösung pipettiert (Endverdünnung 1:6 300).

## Messung:

190 Alle Messungen für eine bestimmte Patientenprobe erfolgen aus ein und derselben Endverdünnung und werden mit einer Meßöffnung (Meßrohr) vom Durchmesser 60  $\mu$ m durchgeführt. In der Erstverdünnung sind die Thrombozyten mindestens 8 h haltbar. Innerhalb dieser Frist muß die Messung erfolgen

| 195 | Meßvorgang                                      | Diskriminatorstellung | Meßergebnis       |
|-----|-------------------------------------------------|-----------------------|-------------------|
|     | 1. Leerwertbestimmung der Gesamtteilchenzählung | PBC / 400             | LW <sub>GTZ</sub> |
| 200 | 2. Leerwertbestimmung der Erythrozytenzählung   | RBC / 400             | LW <sub>EZ</sub>  |
|     | 3. Bestimmung der Erythrozytenzahl              | RBC / 400             | EZ                |
|     | 4. Bestimmung der mittleren Gesamtteilchenzahl  | PBC / 400             | <u>GTZ</u>        |

205 Beide Leerwertbestimmungen erfolgen bei Einzelbestimmungen generell; bei der Durchführung von Serien entscheidet die Qualität der filtrierten Verdünnungslösung über die notwendige Häufigkeit dieser Meßvorgänge.

210 Zur Bestimmung der mittleren Gesamtteilchenzahl wird der 4. Meßvorgang solange wiederholt, bis zwei aufeinanderfolgende Werte nicht mehr als 10 % des kleineren Wertes voneinander abweichen. Diese beiden Werte werden dann zur Mittelwertbildung herangezogen.

## Berechnung der Thrombozytenzahl:

215 Die Zahl der Thrombozyten pro l Blut (X) wird nach folgender Formel berechnet:

$$X = \overline{GTZ} - (EZ - LW_{EZ}) - LW_{GTZ}$$

220 Eine Berücksichtigung des Hämatokritwertes der Blutprobe ist bei der vorgegebenen Erstverdünnung von 1:31,5 und dem unvollkommenen Stand der Sedimentation zur Zeit der Überstandsentnahme nicht erforderlich.

## Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur elektronischen Zählung von Thrombozyten mit Zählgeräten, die nach dem Prinzip der Leitfähigkeitsmessung in einer Mikroöffnung (Meßöffnung, Meßkanal, Pore), durch welche eine Suspension von nicht - oder schlechtleitenden Teilchen, suspendiert in einer leitenden Flüssigkeit, befördert wird, in der Lage sind, die durch die Mikroöffnung tretenden Teilchen zu zählen und damit die Teilchenzahl pro Volumeneinheit bestimmen können (Coulter-Prinzip), dadurch gekennzeichnet, daß diese Geräte nur mit einem unteren, diskontinuierlich oder kontinuierlich verstellbaren Diskriminator (Schwellenwert) ausgerüstet sind, wodurch erstens die Zählung der Gesamtzahl der suspendierten Blutzellen (Thrombozyten, Erythrozyten, Leukozyten u.a.) bei Einstellung einer die kleinsten Thrombozyten miterfassenden, das sogenannte Rauschen aber noch ausschließenden Diskriminatorstellung erfolgen muß, zweitens die Zählung aller Zellen, die größer als Thrombozyten sind, bei einer Diskriminatorstellung, mit der die größten Thrombozyten noch nicht erfaßt werden, notwendig wird und drittens die Thrombozytenzahl pro Volumeneinheit sich aus der Differenz beider Zählwerte, von denen vorher noch, entsprechend der Reinheit der Suspensions- oder Verdünnungsflüssigkeit, der bei der jeweiligen Diskriminatorstellung ermittelte Blind- oder Leerwert der Suspensionsflüssigkeit subtrahiert werden muß, ergibt,

gleichzeitig gekennzeichnet dadurch, daß die Bestimmung der Thrombozytenzahl aus verdünntem Untersuchungsmaterial (antikoaguliertes Venenblut, Kapillarblut, plättchenreiches Plasma u.a.) vorgenommen wird, wobei die größeren Zellen (Erythrozyten, Leukozyten) durch unvollständige Sedimentation, insbesondere Schrägsedimentation, zum großen Teil abgetrennt werden, und aus der, die Thrombozyten in günstigem Verhältnis zu den anderen Zellen enthaltenden Schicht (visuell fast klarer Überstand), die eventuell weiter zu verdünnende Zählprobe entnommen werden muß.

2. Verfahren zur elektronischen Zählung von Thrombozyten nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Probenvorbereitung notwendige Sedimentation durch eine nichtquantitative Abzentrifugation der Zellen, die größer als Thrombozyten sind, durchgeführt in isotonem oder isopycnischem Milieu, ersetzt ist, wobei der größte Teil dieser Zellen aus einem nach der Zentrifugation bestehenden, visuell fast klaren Zentrifugationsüberstand entfernt sein muß, ohne daß schon eine Abwanderung der Thrombozyten in die mit größeren Zellen angereicherte Schicht (Zentrifugationsrückstand) geschehen ist.