



Wirtschaftspatent

Teilweise bestaetigt gemaeß § 6 Absatz 1 des
Aenderungsgesetzes zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

1431 79

Int.Cl.³

3(51) G 01 N 15/06

G 01 N 33/48

G 01 N 1/28

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21) WP G 01 N/ 2129 01

(22) 16.05.79

(45) 30.03.83

(44) 06.08.80

(71) siehe (72)

(72) DIEDERICH, GEORG, DIPL.-CHEM.; NEUNZLING, CHARLOTTE; GROTHKOPF, PETER, DIPL.-CHEM.;
POLAK, KAREN; DD;

LESTIN, HEIKO-GUNDMAR, DR. MED.; BILDAT, MARITA; MICHAELIS, SYLVIA; DD;

(73) siehe (72)

(74) HORST JUNGE, BEZIRKSKRANKENHAUS SCHWERIN, BFN, 2700 SCHWERIN, WERDERSTR. 30

(54) VERFAHREN ZUR ELEKTRONISCHEN THROMBOZYTENZAEHLUNG

Titel der Erfindung

Verfahren zur Probenvorbereitung für die elektronische
Thrombozytenzählung

Anwendungsgebiet der Erfindung

- 5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Vorbereitung von Thrombozytenzählproben aus verdünntem Venenblut, Kapillarblut oder plättchenreichem Plasma für elektronische Zählgeräte, die nach dem Coulter-Prinzip arbeiten.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

- 10 Die elektronische Zählung der Thrombozyten nach dem Coulter-Prinzip wurde anfangs ausschließlich aus verdünntem Blut durchgeführt. Dabei mußte vor der eigentlichen Zählung der Verfahrensschritt Probenvorbereitung erfolgen, der eine von allen störenden Einflüssen (Leuko-
- 15 zyten, Erythrozyten) befreite Thrombozytenzählsuspension zum Ziel hat. Hierzu entwickelte Verfahren über Sedimentation (B.S. BULL et al, Amer.J.Clin.Pathol. 44 (1965), 678-685; J.JÜRGENS, Ärztl.Lab. 14 (1968) 347-354) oder Zentrifugation (R.KUSE u. Mitarb., Blut 35 (1977),
- 20 253-259) verlangen einerseits einen hohen arbeitszeitmäßigen und verfahrenstechnischen Aufwand, zum anderen werden die sehr empfindlichen Blutzellen auch starker osmotischer und mechanischer Belastung ausgesetzt (M. des BRUYERE et al, Thrombös.Diathes.haemorrh.(Stuttg.)
- 25 32, 232 (1974); H.GADNER u. Mitarb., Schweiz.med.Wschr. 104 (1974), 138-140), so daß fehlerhafte Zählungen durch Volumenveränderung der Zellen nicht mehr ausgeschlossen

werden können. Um diese Nachteile zu umgehen, wurden
in jüngster Zeit die elektronischen Zählgeräte derart
30 vervollkommen, daß die Bestimmung der Thrombozytenzahl
direkt aus Vollblut möglich ist (W.ADAM u. Mitarb.,
Blut 32 (1976); DT-PS 28 12 517). Der hierzu notwendige
apparative Aufwand bedingt aber einen sehr hohen An-
schaffungspreis und ist auch in Wartungs- und Reparatur-
35 fragen von den meisten Anwendern nicht mehr zu bewältigen.
So werden parallel zu diesen Entwicklungen wieder An-
strengungen unternommen, technisch einfache und leicht
zu wartende Zählgeräte zu bauen, mit deren Hilfe eine
Bestimmung der Thrombozytenzahl aus verdünntem Unter-
40 suchungsgut allgemein möglich ist (DL-PS 65 681). Die
Probleme der damit erneut notwendigen, umständlichen
Probenvorbereitung blieben aber nach wie vor ungelöst.
Beispiel hierfür ist das in der Bedienungsanleitung zum
Teilchenzählgerät Picoscale (PS-4) (MEDICOR-Werke
45 Budapest 1976) verfaßte Zählverfahren. Man geht dabei von
der falschen Voraussetzung einer möglichen, vollkommenen
Spontansedimentation der Erythrozyten und Leukozyten bei
gleichzeitigem Erhalt der ursprünglichen Thrombozyten-
dichte aus. Das Verfahren liefert so keine akzeptablen,
50 mit der Kammerzählung (H.STOBBE, Z.med.Labortechnik 1
(1960), 79 ff) vergleichbaren Werte. Zudem ist eine
Probenvorbereitungszeit von über zwei Stunden im Routine-
betrieb eines Labors nicht vertretbar.

Ziel der Erfindung

55 Ziel der Erfindung ist ein Verfahren zur Probenvorbe-
reitung für die elektronische Thrombozytenzählung nach
dem Coulter-Prinzip, das unter geringster Belastung der
zu zählenden Zellen in kürzester Frist Zählproben liefert,
aus denen die Konzentration an Thrombozyten auch mit ein-
60 fachen Teilchenzählgeräten bestimmt werden kann.

65 Darlegung des Wesens der Erfindung

Das Wesen der Erfindung besteht in der Ausführung des Verfahrens zur Probenvorbereitung als partielle Sedimentation bzw. partielle Zentrifugation von verdünntem Untersuchungsgut. Erfindungsgemäße Voraussetzung ist es, 70 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.

75 Die zur Anwendung gelangende Probenvorbereitungsart kann in einem sehr unvollkommenen Zustand abgebrochen werden. Dadurch wird bei der Sedimentation eine große Zeiterparnis erzielt, bei der Zentrifugation die sonst notwendige Anwendung spezieller, aufwendiger Technik um- 80 gangen.

Der Zeitpunkt, an dem der Abbruch der Probenvorbereitung gerade schon möglich ist, hängt von der Empfindlichkeit des angewandten Zählgerätes ab, mit der es in der Lage ist, eine kleine Anzahl von Thrombozyten in einer ebenso 85 großen oder größeren Anzahl von größeren Zellen (z.B. Erythrozyten) quantitativ exakt zu erfassen. Die Gesamtkonzentration aller in der Zählsuspension noch enthaltenen Zellen kann ohne Qualitätseinbuße bei der Zählung so hoch gewählt werden, daß die erzeugte Impulsdichte 90 das maximale Impulstrennvermögen des Gerätes voll in Anspruch nimmt.

Es ergeben sich bei der in verdünntem Untersuchungsgut ausgeführten partiellen Sedimentation bzw. partiellen Zentrifugation erfahrungsgemäß keine untersuchungsgut- 95 bedingten Ausnahmen, ebenso besteht keine Abhängigkeit von hämatokrit-spezifischen Korrekturfaktoren.

Ausführungsbeispiel

Verfahren zur Thrombozytenzählung am ungarischen Teilchenzählgerät PS-4

100 Probenvorbereitung:

Zu 6.100 ml filtrierter HPJ-Lösung (MEDICOR-Werke Budapest, Bedienungsanleitung zum Teilchenzählgerät PS-4, 1976), die in einem silikonisiertem Glasröhrchen vorgelegt sind, werden 0.200 ml EDTA-Blut pipettiert.

- 105 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 Überstand in ein weiteres silikonisiertes Glasröhrchen oder Plastikgefäß ab. Hieraus werden zur Messung am PS-4 0.050 ml entnommen und in 9.950 ml mehrmals filtrierter HPJ-Lösung pipettiert (Endverdünnung 1:6 300).

Messung:

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

120	Meßvorgang	Diskriminatorstellung	Meßergebnis
	1. Leerwertbestimmung der Gesamtteilchenzählung	PBC / 400	LW_{GTZ}
125	2. Leerwertbestimmung der Erythrozytenzählung	RBC / 400	LW_{EZ}
	3. Bestimmung der Erythrozytenzahl	RBC / 400	EZ
	4. Bestimmung der mittleren Gesamtteilchenzahl	PBC / 400	$\overline{GTZ}$

- 130 Beide Leerwertbestimmungen erfolgen bei Einzelbestimmungen generell; bei der Durchführung von Serien entscheidet die Qualität der filtrierten Verdünnungslösung über die notwendige Häufigkeit dieser Meßvorgänge. Zur Bestimmung der mittleren Gesamtteilchenzahl wird der 4. Meßvorgang so-
- 135 lange 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:

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

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

- Eine Berücksichtigung des Hämatokritwertes der Blutprobe ist bei der vorgegebenen Erstverdünnung von
145 1:31,5 und dem unvollkommenen Stand der Sedimentation zur Zeit der Überstandsentnahme nicht erforderlich.

Erfindungsanspruch

Verfahren zur Probenvorbereitung für die elektronische
Thrombozytenzählung nach dem Coulter-Prinzip,
150 dadurch gekennzeichnet, daß aus verdünntem Untersuchungs-
material, insbesondere Venenblut, Kapillarblut oder
plättchenreichem Plasma, die Erythrozyten und Leukozyten
lurch partielle Sedimentation, insbesondere partielle
Schrägsedimentation oder partielle Zentrifugation soweit
155 abgetrennt werden, daß die durch die Gesamtkonzentration
der in der Zählsuspension enthaltenen Zellen erzeugte
Impulsdichte kleiner ist, als es das Impulsauflösever-
mögen des angewandten Zählgerätes zuläßt.