



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

206 842

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

3(51) G 01 N 33/48

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP G 01 N/ 2366 415

(22) 11.01.82

(44) 08.02.84

(71) siehe (72)

(72) OLESCH, BERND, DR. RER. NAT. DIPL.-CHEM.; WARTIG, PETER, DR. RER. NAT. DIPL.-BIOL.; RAUSCHERT, KUNZ, DIPL.-BIOL.; DD;

(73) siehe (72)

(74) VOSS, KARL HEINZ IM VEB NAHRUNGSGUETER/MASCHINENBAU 2000 NEUBRANDENBURG STR. D. BEFREIUNG PSF324

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES HAEMATOLOGISCHEN KONTROLLMATERIALS

(57) Die Erfindung betrifft die Herstellung eines hämatologischen Kontrollmaterials zur Bestimmung der Parameter des roten Blutbildes und der Leukozytenzahl mittels elektronischem Teilchenzählgerät. Ziel der Erfindung ist die Vereinfachung der Herstellung. Es wird die Aufgabe gelöst, auf der Basis von Humanblut eine Suspension mit stabilen Bestandteilen, bei Einhaltung der erforderlichen Parameter zu schaffen. Die Aufgabe wird gelöst durch Abnahme des Blutes auf EDTA-Konservierungslösung, Separierung der Erythrozyten, Härtung der Leukozyten des Buffy-coat und Einstellung der gewünschten Leukozytenkonzentration durch entsprechendes Mischen mit dem Nativerythrozytensediment.

Verfahren zur Herstellung eines hämatologischen Kontrollmaterials

---

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die Herstellung eines hämatologischen Kontrollmaterials zur Bestimmung der Parameter des roten Blutbildes und der Leukozytenzahl mittels elektronischer Teilchenzählgeräte.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Kontrollmaterialien für die Eichung elektronischer Teilchenzählgeräte zur Bestimmung hämatologischer Parameter sowie die Kontrolle der Präzision der mit diesen Geräten erhaltenen Meßergebnisse sind bekannt. Zur Herstellung von geeigneten Standardsuspensionen für die Qualitätskontrolle wurden unterschiedliche Substanzen erprobt, wie z.B. Pollen (GABRIELI, E.R. u. WERTHEIMER, M., Amer. J. clin. Path. 36 (1962), 277 - 280, Latexpartikel (SCHEIDT, R.A., Amer. J. clin. Path. 35 (1961), 293 - 294, andere nicht native Polymereteilchen (HUMMEL, K.A., Bibl. haemat. (Basel) 18 (1964), 21 - 22, formalinbehandelte Erythrozyten (BENEDEK, E., Bibl. haemat. (Basel) 24 (1966) 67 - 70. Die Stabilisierung der Erythrozyten kann nach Entfernung der Leukozyten auch mit Chlorkohlensäureethylester vorgenommen werden (DORNHEIM, G., Z. med. Labortechn. 11 (1970), 148 - 153. Alle diese Präparationen liefern lediglich ein Kontrollmaterial für die Teilchenzählung der Erythrozyten bzw. die erythrozytären Parameter (RBC, MCH, MCHC, PCV, MCV). Eine gleichzeitige Qualitätskontrolle der Leukozyten-

zahlen (WBC) wurde durch Zumischen von fixierten Vogelerythrozyten zur stabilisierten Erythrozytensuspension nach Entfernen der Leukozyten erreicht (z.B. DADE CH-60) oder, wie in DE-OS 2830524 beschrieben, indem eine mittels Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaureat behandelte Vollblutprobe mit Formaldehydlösung bei 55° C bis 62° C 2 Minuten lang inkubiert wird. Ein Kontrollmaterial für die hämatologische Qualitätskontrolle mittels elektronischer Teilchenzählgeräte, das auch die Thrombozyten erfaßt, wird nach DE-OS 2923957 durch Zumischen einer mit Harnstoff behandelten Thrombozytensuspension zu einem im Handel erhältlichen Kontrollreagenz (BAKER Haem-C, DADE CH-60 oder COULTER 4 C) erhalten. Auch die separate Herstellung eines Leukozytenstandards durch Fixierung von Humanleukozyten mit Glutaraldehyd wurde beschrieben (PINTHANOND, D. u. PETCHCLAT, B., Amer. J. clin. Path. 63 (1975), 32 - 34. Die oben beschriebenen Verfahren erfassen entweder nur die Erythrozyten als Blutzellen oder sind wegen der angestrebten Universalität der Anwendung der nach ihnen hergestellten Kontrollmaterialien für elektronische Teilchenzählgeräte, die neben den Parametern des roten Blutbildes auch Leukozyten und Thrombozyten umfassen, vergleichsweise aufwendig.

#### Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat den Zweck, ein Kontrollmaterial für die hämatologische Analytik mittels elektronischer Teilchenzählgeräte ohne Thrombozytenzählung in einem einfachen Verfahren herzustellen und die Qualität hämatologischer Untersuchungen zu erhöhen.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, auf der Basis von Humanblut ein Kontrollmaterial für die Parameter RBC, HB, PCV, MCV, MCHC, RVD und WBC herzustellen, das direkt verwendbar ist

und dessen Bestandteile nicht zur Aggregation oder Agglutination neigen, leicht suspendierbar und stabil sind. Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß auf EDTA-Stabilisator abgenommenes Humanblut zentrifugiert, Plasma und Buffy-coat separat entfernt werden, das Buffy-coat, das noch viele Erythrozyten enthält, zentrifugiert und der Überstand verworfen wird, das Sediment in Erythrozytenkonservierungslösung aufgeschwemmt und mit Formalin-Natriumchlorid-Lösung zur Fixierung der Leukozyten versetzt wird. Die fixierten Leukozyten werden gewaschen und mit Thiomersal enthaltender Erythrozytenkonservierungslösung aufgeschwemmt. Diese Suspension gehärteter Leukozyten wird mit dem Erythrozytensediment, das von der Konservierungslösung und Resten des Buffy-coat befreit wurde, im gewünschten Mischungsverhältnis vereinigt. Das so gewonnene Material wird nach gründlicher Durchmischung in kalt sterilisierte Plaströhrchen abgefüllt. Alle Arbeiten werden im aseptischen Arbeitsraum durchgeführt. Die Erfindung wird nachfolgend durch ein Ausführungsbeispiel erläutert, aber nicht eingeschränkt.

#### Ausführungsbeispiel

Auf EDTA-Stabilisator abgenommenes Humanblut (1 Teil Stabilisatorlösung und 8 Teile Blut) wird spätestens 1 h nach der Abnahme in einer Kühlzentrifuge K 70 bei  $1800 \text{ U min}^{-1}$  und  $4^{\circ} \text{ C}$  30 min zentrifugiert. Anschließend wird das Plasma zur Weiterverarbeitung entfernt und das Buff-Coat von mehreren Bluten in einer 500-ml-Blutkonservenflasche gesammelt. Die Mischung enthält noch sehr viele Erythrozyten. Die Leukozyten - Thrombozyten - Erythrozyten-Mischung wird bei  $1800 \text{ U min}^{-1}$  und  $4^{\circ} \text{ C}$  in einer K 70-Zentrifuge 30 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Sediment in 100 ml Erythrozyten-Konservierungslösung aufgeschwemmt und mit der gleichen Menge Formalin-NaCl-Gemisch (1 Teil 30 proz. Formalin und 3 Teile 0,9 proz. NaCl-Lösung) versetzt. An-

236641 5 4

schließlich erfolgt eine Inkubation für 20 h im Wasserbad bei 37° C. Nach Härtung der zellulären Bestandteile werden diese dreimal mit je 400 ml 0,9 proz. Na-Cl-Lösung gewaschen. Das gewaschene Sediment wird mit 400 ml Erythrozytenkonservierungslösung, der 200 mg Thiomersal zugegeben wurden, aufgeschwemmt. Man bestimmt die Leukozytenzahl (WBC) des Sediments und nimmt eine solche Verdünnung mit o.g. Konservierungslösung vor, daß die Endkonzentration an Leukozyten nach Mischung mit dem buffy-coat-freien Erythrozytensediment im gewünschten Bereich liegt. Letzteres wird vor der Vereinigung mit der Leukozytensuspension von der Konservierungslösung befreit, wobei noch vorhandene Reste an Buffy-coat mit entfernt werden. Zur Erzielung einer Leukozytenkonzentration von 5000 bis 8000/ul werden 200 ml Erythrozytensediment und 100 ml Leukozytensuspension vereinigt. Nach gründlichem Durchmischen wird das so gewonnene Kontrollmaterial in mittels Ethylenoxid sterilisierten Plaströhrchen mit Stopfen in Portionen von 5 bis 8 ml abgefüllt.

Das Kontrollmaterial ist bei 4° C mindestens 48 d haltbar. Dabei weisen die Parameter RBC, PCV, MCV, MCH, MCHC, HB, RVD sowie WBC eine zeitliche Konstanz im Rahmen der Präzision der elektronischen Teilchenzählgeräte und Analysenautomaten, z.B. Hämatologischer Analysenautomat PHA-1, auf.

## Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung eines Kontrollmaterials für die hämatologische Analytik mittels elektronischer Teilchenzählgeräte und Analysenautomaten auf der Basis eines Human-Nativblutes, gekennzeichnet dadurch, daß Vollblut auf herkömmliche EDTA-Konservierungslösung abgenommen wird, die Erythrozyten separiert und vom Buffy-coat befreit werden, die Leukozyten des Buffy-coat mit Formalin-Natriumchlorid-Lösung gehärtet und unter Einstellen der gewünschten Leukozytenkonzentration mit dem Nativerythrozytensediment vereinigt werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Härtung der Leukozyten mit Formalin-Natriumchlorid während 20 h bei 37° C vorgenommen wird.
3. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Kontrollmaterial hinsichtlich der erythrozytären Parameter und der Leukozytenzahl sowohl für den normalen als auch für beliebige pathologische Bereiche hergestellt wird.