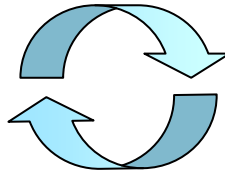


Betrieb[Ausbildungsrahmenplan
Nr. 11.1](#)**Berufsschule**[Rahmenlehrplan
Lernfelder 7, 8](#)

Standardarbeitsanweisung (SOP) Anfertigung und Differenzierung eines Blutausstrichs	„Firmenlogo“
Seite: 1 von 5 (+ Anlage I) Verfasser: „ Name “, Ausbilder/in	Dok.-Nr.: TBG/06/0002.1/03 Gültig ab: 01.12.2003

1 Change Control

Grund der Erstellung dieser Fassung:

- Überarbeitung des Layouts Ersetzt SOP TB/05/0002/01

2 Gegenstand, Zweck, Ziel

Die Standard-Arbeitsanweisung beschreibt das Prinzip und die Vorgehensweise der Anfertigung und Differenzierung eines Blutausstriches.

Die mikroskopische Untersuchung eines gefärbten Blutausstrichs eröffnet dem Untersucher eine neue Dimension: die Morphologie der Blutkörperchen und damit das Sichtbarwerden von Phänomenen, die nicht allein durch Zählung oder Messung quantitativ erfassbar sind. So kommen Formvarianten der Erythrocyten und Besonderheiten der Thrombocyten zur Darstellung. Im Vordergrund stehen jedoch die Leukocyten, welche durch die gewöhnlich verwendete panoptische Färbung nach Pappenheim oder durch weitere Spezialfärbungen in ihren Eigenarten differenzierbar werden und deren zahlenmäßige Anteile ermittelt werden können.

Ein kleiner Blutropfen wird an der Kante eines Ausstreichers über einen Objektträger geführt und dabei Zelle neben Zelle zur Ausbreitung auf dem Objektträger gebracht.

3 Geltungsbereich

Die SOP findet bei „**Firma**“ Anwendung. Sie dient ausschließlich didaktischen Zwecken.

4 Verantwortlichkeiten

Der/die betreuende Ausbilder/in ist für die korrekte Durchführung des Versuchs verantwortlich. Er/sie kann jedoch die Durchführung, Dokumentation als Auftrag an Auszubildende delegieren. Er/sie muss sich jedoch von der korrekten Durchführung und Dokumentation (Protokolle) überzeugen.

5 Arbeitssicherheit / Umweltschutz / Tierschutz

- Die R- und S-Sätze der verwendeten Gefahrstoffe sind zu beachten und im Protokoll zu dokumentieren
- Schutzbrillen- und Einmalhandschuhtragepflicht bei allen Arbeiten am Versuchstier
- Blut kann infektiös sein (Schutzbrillentragepflicht)
- Bissverletzungen durch die Versuchstiere sind durch fachgerechten und tierschutzgerechten Umgang mit den Versuchstieren zu vermeiden
- Kontaminiertes Material wird gemäß Abfallentsorgungsrichtlinie „Firma“ entsorgt
- Beim Anfertigen des Ausstreichers ist die Schutzbrille zu tragen, da beim Abbrechen einer Kante des Objektträgers eventuell Glassplitter ins Auge gelangen könnten (besser Einmalausstreicher verwenden)
- Gefahr der Schnittverletzungen durch Objektträger beachten
- Hände desinfizieren, anschließend mit Seife waschen und eincremen
- Materialien und Tische desinfizieren
- Tierversuche dürfen nur unter Aufsicht eines Ausbilders durchgeführt werden

6 Material

Versuchstier, Impflanzette (Hämostilet), Ausstreicher (selbst angefertigt oder Verwendung von Flexi Strip Ausstreicher für Objektträger), Schere, saubere fettfreie Objektträger, Zellstofftupfer, Ethanol 70 %, Wärmelampe oder warmes Wasser, Differenzierungstabelle, Dokumentenechter Stift, Schutzbrille, Einmalhandschuhe.

7 Durchführung

7.1 Versuchsdurchführung

7.1.2 Blutausstrich

- Der Tierart entsprechend wird Blut abgenommen (Maus und Ratte über retrobulbären Venenplexus oder Schwanzspitze, Meerschwein Ohrandvene siehe [SOP TBG/06/0001.1/03](#)). Der erste austretende Blutropfen ist zu verwerfen. Ein Blutropfen wird hinter der Ausstreichkante mit dem Ausstreicher aufgenommen. Dieser wird sofort an einem Ende des Objektträgers aufgesetzt. Durch Verringern des Winkels zwischen Ausstreicher und Objektträger wird das Blut hinter der angewinkelten Kante zum seitlichen Verlaufen gebracht. Danach wird der Ausstreicher zügig und gleichmäßig zu $\frac{3}{4}$ über die Objektträgerlänge gezogen. Objektträger und Deckglas sollten einen Winkel von 45 Grad bilden. Je kleiner der Winkel, umso dünner wird der Ausstrich, da die Kapillarkräfte (Adhäsion und Kohäsion) stärker wirksam sind als bei einem großen Winkel.

- Anschließend lässt man die Ausstriche an der Luft trocknen (erkennbar am Verschwinden des feuchten Glanzes) und beschriftet sie. Man benutzt dazu die Klebeseite eines Gewebebandes. Dies wird auf der Unterseite des Objektträgers an dem nicht mit Blut behafteten Ende aufgeklebt. Nach der Blutentnahme muss zügig gearbeitet werden, damit das Blut nicht gerinnen kann. Ein typisches Kriterium für schon teilweise geronnenes Blut ist die "Geldrollenform" der Erythrocyten im Ausstrich.
- Zur Färbung werden die luftgetrockneten und beschrifteten Ausstriche randfrei und waagrecht auf die Färbebrücke aufgelegt und gefärbt ([siehe SOP TBG/06/ 0005.1/03](#))

7.1.3 Technik der mikroskopischen Differenzierung eines Blutausstrichs

- Zunächst wird der luftgetrocknete Ausstrich mit einer kleineren Vergrößerung zum Aufsuchen der "dünnen Stelle" betrachtet, bei der die Erythrocyten dicht beieinander und nicht übereinander liegen. In diesen Regionen können die Strukturmerkmale der Leucocyten und die Erythrocyten-Form richtig erkannt werden. Erst dann wird die Ölimmersion aufgebracht und die eigentlichen Zelldifferenzierung mit dem 100er Ölimmersionsobjektiv begonnen. Man zählt fortlaufend mindestens 100 Leucocyten. Ein Mehrfaches davon engt die Fehlerbreite ein. Die Auszählung von mehr als 500 Zellen erbringt jedoch keine Verbesserung der %-Verteilung. Im Zentrum des Ausstrichs kommt es zu einer Ungleichverteilung, d.h. Anhäufung von Lymphocyten, an den Rändern hingegen zur Anreicherung von Granulocyten und Monocyten (evtl. durch unterschiedliche Glashaftung bedingt). Deshalb muss ein Ausstrich mäanderförmig durchgemustert werden.

Die Angaben der Beurteilung erfolgt in Prozent der differenzierten Zelle und/oder in Absolutwerten nach folgender Formel:

Absolutzahl/mm^3	$= \text{Leucocytenzahl/mm}^3 \times \text{Relativ-\%} : 100$
$\text{Absolutzahl/mm}^3 \times 10^6$	$= \text{Absolut} \times 10^9/\text{L}$

7.1.4 Differenzierungstabelle

- Die Leucocytenarten werden zeilenweise getrennt ermittelt ([Differenzierungstabelle](#)). Die 10 Spalten dienen als Zählhilfe in der Weise, dass in jeder Spalte bis zu 10 Zellen durch Striche angegeben werden, bei Durchzählungen der 10 Spalten also 100 Zellen ausgezählt worden sind. In der letzten, der 11. Spalte, werden die Quersummen der einzelnen Zeilen gebildet, die das Differenzierungsergebnis in Prozent ausgedrückt wiedergeben, sofern wirklich 100 Zellen berücksichtigt worden sind.

Es sind Doppelbestimmungen durchzuführen!

		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	%	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	%
Lymphocyten																							
Granulocyten	Neutrophile																						
	Basophile																						
	Eosinophile																						
Monocyten																							
		Differenzierungstabelle für Leucocyten																					
		Untersucher:										Versuchstier:											
		Datum:										Färbung:											

7.1.5 Kriterien zur Charakterisierung einzelner Zellformen im Blutaussstrich

Zunächst betrachtet man die Zelle als Ganzes und beurteilt ihre:

- Größe: Zum Vergleich dienen die normalen Erythrocyten.
- Form: kreisförmig mehr oder weniger unregelmäßig.

Dann wendet man sich dem Zellkern zu und beurteilt nach:

- Form: kreisförmig, oval, nierenförmig, stabförmig, segmentiert.
- Chromatinstruktur: feinnetzig, grobnetzig, schollig.

Für die Charakterisierung des Cytoplasmas gelten als Kriterien:

- Relative Menge: Kern-Plasma-Reaktion.
- Anfärbung: basophil (bläulich), oxyphil (blaßrosa).
- Granula: körnige Einlagerungen.
- Menge: keine, selten, wenig, zahlreich.
- Art: eosinophile (leuchtend rot), neutrophile (blassrot), basophile (blauschwarz).

