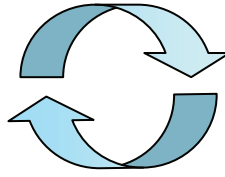


**Betrieb**[Ausbildungsrahmenplan  
Nr. 11.1](#)**Berufsschule**[Rahmenlehrplan  
Lernfeld 8](#)

<b>Standardarbeitsanweisung (SOP)</b> <b>Bestimmung der Erythrocytenzahl</b>	<b>„Firmenlogo“</b>
Seite: 1 von 6 Verfasser: „ <b>Name</b> “, Ausbilder/in	Dok.-Nr.: TBG/06/0006.1/03 Gültig ab: 01.12.2003

**1 Change Control**

Grund der Erstellung dieser Fassung:

- Überarbeitung des Layouts Ersetzt SOP TB/05/0006/01

**2 Gegenstand, Zweck, Ziel**

Die Standard-Arbeitsanweisung beschreibt das Prinzip und die Vorgehensweise der Bestimmung der Erythrocytenzahl in der Zählkammer nach Thoma.

Sieht man von der photometrischen teil- bzw. vollautomatischen elektronischen Zählung ab, dann kommt grundsätzlich noch die Zählung in der Kammer in Betracht.

Blut wird in einer Erythrocytenmischpipette mit isotonischer NaCl verdünnt. Die Erythrocyten werden nach gründlicher Mischung in der Zählkammer ausgezählt.

**3 Geltungsbereich**

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

**4 Verantwortlichkeiten**

Der betreuende Ausbilder ist für die korrekte Durchführung des Versuchs verantwortlich. Er kann jedoch die Durchführung, Dokumentation als Auftrag an Auszubildende delegieren. Er 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
- Blut kann infektiös sein (Schutzbrillentragepflicht)
- Einmalhandschuhe und Schutzbrille im Umgang mit Versuchstieren tragen
- Verletzungsgefahr durch Kanülen (Kanülenschutz und Kanülenbox verwenden)
- Kontaminiertes Material wird gemäß Abfallentsorgungsrichtlinie „Firma“ entsorgt
- Hände desinfizieren, anschließend mit Seife waschen und eincremen
- Materialien und Tische desinfizieren
- Tierschutzbestimmungen beachten
- Tierversuche werden unter Aufsicht eines Ausbilders durchgeführt
- Empfehlungen der TVT beachten

## 6 Material

Erythrocytenmischpipette, Micro-Pipettierhilfe, Zellstofftupfer, Zähluhr, Zählkammer nach Thoma, Gefäße mit HCl  $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/L}$ , E- $\text{H}_2\text{O}$ , Aceton, Mikroskop, Impfanzette, Glas- oder Porzellantiegel, isotonische NaCl  $\beta(\text{NaCl})=9\text{g/L}$ , Eppendorfpipette 10-100 $\mu\text{L}$ , Pipettenspitzen (gelb).

## 7 Durchführung

### Vorbereitung der Zählkammer

- Links und rechts von der Zählfläche, von dieser durch 2 Rinnen getrennt, befinden sich die Auflegebalken für das Deckglas. Die Rinnen dienen dazu, bei unsachgemäßer Kammerbeschildung den Überschuss an Flüssigkeit aufzunehmen. Hat man keine Zählkammer mit speziellen Federklemmen, muss das Deckglas von Hand angedrückt werden. Ein optisch plangeschliffenes Deckglas (Hämacytometer-Deckglas) wird von der Seite unter beidseitigem gleichmäßigem Druck auf die Schliefflächen der beiden Auflegebalken der Zählkammer nach Thoma aufgeschoben und sitzt fest, wenn die Newtonschen Ringe erscheinen. Dadurch ist gewährleistet, dass sich das Deckglas im reproduzierbaren Abstand vom Boden der Kammer befindet. Erst dadurch entsteht der eigentliche Hohlraum mit einer genau definierten Tiefe von 0,1 mm, in dem die Auszählung der Blutkörperchen erfolgt.

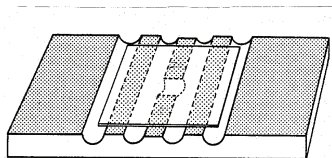
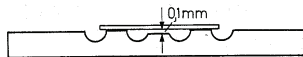


Abb.1. Zählkammer von der Seite und von oben

### Verfahren

Blut in einer Erythrocytenmischpipette bis zur Marke 0,5 luftblasenfrei aufziehen. Pipettenspitze gut abwischen, so dass keine Blutreste mehr anhaften und anschließend bis zum Teilstrich 101 isotonische NaCl nachsaugen. Es entsteht eine Verdünnung von 1:200. Dazu eine kleine Menge isotonische NaCl in einen Glas- oder Porzellantiegel ausgießen, um Verunreinigungen der Lösung in der Vorratsflasche zu vermeiden. Das Ansaugen von isotonischer NaCl muss ebenfalls luftblasenfrei geschehen. Andernfalls muss der Inhalt der Pipette verworfen und in einer frischen Pipette eine neue Blutprobe verdünnt werden.

Pipettenenden mit Daumen und Zeige- oder Mittelfinger verschließen und eine Minute gut mischen oder ein Schüttelgerät verwenden.

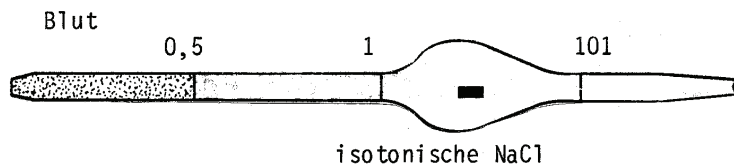


Abb.2. Erythrocytenmischpipette

Wird die Kammer nicht unmittelbar nach dem Mischen beschickt und bleibt die Pipette einige Zeit liegen, muss vor dem Befüllen der Kammer erneut gemischt werden.

Bei Erkrankungen, die mit einer deutlichen Verminderung der Erythrocytenzahl einhergehen, z.B. Anämien, zieht man Blut in der Erythrocytenmischpipette bis Marke 1,0 auf und saugt dann isotonische NaCl bis zur Marke 101 nach. Es entsteht eine Verdünnung von 1:100.

### Füllen der Zählkammer nach Thoma

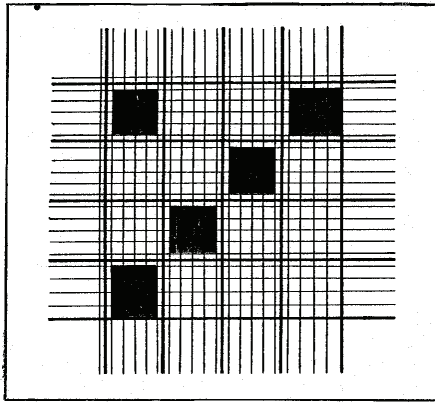
Vor Beschicken der Zählkammer nach Thoma muss der Pipetteninhalt gut durchgemischt werden. Zur Auszählung darf nur der Inhalt der Pipettenkugel verwendet werden. Die in der Kapillare vorhandene Verdünnungsflüssigkeit wird vorweg verworfen (3 Tropfen). Nach Durchmischen verschließt man das obere Pipettenende mit dem Zeigefinger. Die Pipettenspitze setzt man im spitzen Winkel auf die Zählkammer am Rand des Hämacytometerdeckglas auf und lässt sich die Zählkammer nach Thoma mittels Kapillarität von selbst füllen (besser geht es, wenn man eine Eppendorfpipette (10µL) zum Füllen der Kammer verwendet). Dabei darauf achten, dass einerseits genügend Flüssigkeit einläuft, um die ganze Kammer in einem Zug zu füllen, andererseits nicht zu viel Flüssigkeit aus der Pipette austritt und in die seitlichen Rillen der Zählkammer abläuft.

Nach einer kurzen Sedimentationszeit von 1-2 Minuten kann mit der Auszählung begonnen werden. Es werden Doppelbestimmungen gemacht. (Auszählung beider Zählnetze!)

Beide Zählnetze nicht gleichzeitig beschicken!

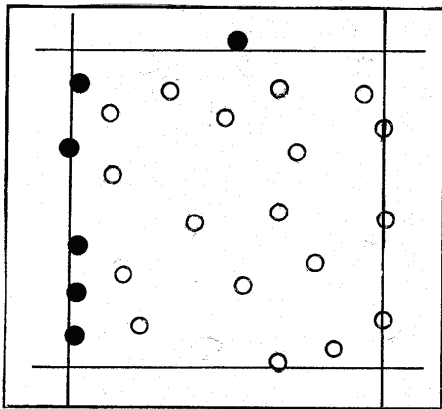
### Zählung und Berechnung der Erythrocytenzahl/mm<sup>3</sup> Blut

Man zählt 5 Großquadrate zu je 16 mittleren Quadraten = insgesamt 80 mittlere Quadrate aus: Diese 5 Großquadrate wählt man gleichmäßig über das gesamte Zählnetz verteilt. Dies sind 4 Quadrate in einer Diagonalen und ein zusätzliches Eckquadrat bei einer Zählkammer nach Thoma.

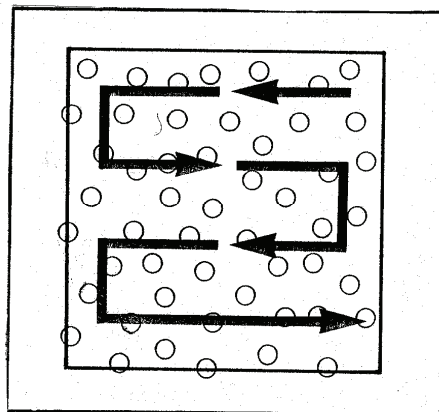


**Abb.3.** Zählnetz nach Thoma

Man arbeitet mit mittlerer Mikroskopvergrößerung (Okular 10 x Objektiv 40 : 1) und zählt alle Erythrocyten innerhalb der mittleren Quadrate und die auf deren rechten und unteren Rand liegenden Zellen (siehe Abb. 4). Dabei beginnt man in der rechten oberen Ecke eines mittleren Quadrates und zählt mäanderförmig das Quadrat durch (siehe Abb. 5).



**Abb. 4.** Schematische Darstellung der Erythrocytenzählung in einem mittleren Quadrat. Gezählt werden die hellen Punkte.



**Abb. 5.** Mäanderförmige Auszählung eines Quadrates

Die Anzahl der Zellen pro Großquadrat (= 16 mittlere Quadrate) wird zusammengefasst und notiert. Die Anzahl Erythrocyten pro  $\text{mm}^3$  Blut wird wie folgt errechnet:

Als Flächeninhalt gilt das Großquadrat von  $1/25 \text{ mm}^2 = 0,04 \text{ mm}^2$ , also ein Rauminhalt von

$1/250 \text{ mm}^3 = 0,004 \text{ mm}^3$ . Erythrocyten zählt man in 5 solcher Großquadrate ( $\text{ZE}_5$ ), so entfallen nun auf die Grundfläche von  $1 \text{ mm}^2$ .

$$\text{ZE}_5 \times 5 \text{ Erythrocyten}$$

Da der Rauminhalt (Kantenlänge 1 mm, Höhe 0,1 mm) über diesem Quadrat  $0,1 \text{ mm}^3$  beträgt, so sind in  $1 \text{ mm}^3$  10-mal soviel Erythrocyten.

$$\text{ZE}_5 \times 5 \times 10$$

Um die Zahl der Erythrocyten im unverdünnten Blut zu erhalten, muss man das Verdünnungsverhältnis der Blutprobe noch berücksichtigen.

$$\text{ZE} = \text{ZE}_5 \times 5 \times 10 \times \text{Verdünnung}$$

$\text{ZE}_5$  = Zahl der in 5 Feldern ausgezählten Erythrocyten

$\text{ZE}$  = Zahl der Erythrocyten in  $1 \text{ mm}^3$  Blut.

### Einheiten

Die Ergebnisse werden in Millionen Erythrocyten/ $\text{mm}^3$  Blut (konventionelle Einheiten) mitgeteilt.

Als SI - Einheit gilt Tera/L Blut. Dabei bleibt der Zahlenwert derselbe, so dass der Umrechnungsfaktor konventionelle Einheit ( $10^6/\text{mm}^3$  Blut) zur SI - Einheit ( $10^{12}/\text{L}$  Blut) = 1 beträgt.

### Reinigen der Erythrocytenmischpipette

Durch nachfolgendes Durchziehen von

1. HCL c(HCL) = 0,1 mol/L
2. E- $\text{H}_2\text{O}$
3. Aceton

wird die Pipette sofort nach Gebrauch mittels Wasserstrahlpumpe gereinigt. Die Pipette bleibt so lange an der Wasserstrahlpumpe angeschlossen, bis das Aceton verdampft ist.

**Fehlererkennung**

Ursache:	Folge:
Blut und/oder Verdünnungslösung nicht luftblasenfrei in Erythrocytenmischpipette aufgezogen	Falsche Ergebnisse
Vor dem Nachziehen von Verdünnungslösung Pipettenspitze außen nicht sauber von Blutresten gereinigt	Zu hohe Ergebnisse
Nasse oder beschädigte Erythrocytenmischpipette (z.B. abgestoßene Spitze) verwendet	Falsche Ergebnisse
Vor Befüllen der Zählkammer Blutverdünnung in der Erythrocytenmischpipette nicht gründlich genug durchgemischt	Zu tiefe Ergebnisse, da die in der Pipettenkugel sedimentierten Zellen nicht genügend resuspendiert worden sind
Verdünnungsflüssigkeit in der Kapillare der Erythrocytenmischpipette nicht verworfen	Zu niedrige Ergebnisse: Für die Zählung in der Kammer nur Blutverdünnung aus der Pipettenkugel verwenden.
Deckglas sitzt nicht fest auf der Kammer auf	Falsche Kammerhöhe von mehr als 0,1 mm führt zu erhöhten Werten
Zählkammer nicht luftblasenfrei beschickt.	Falsche Ergebnisse
Auszählung zu früh begonnen, bevor alle Zellen in der Kammer sedimentiert sind	Falsche Ergebnisse
Ungleichmäßige Verteilung der Erythrocyten über das Zählnetz	Falsche Ergebnisse: Kammer erneut beschicken

**8 Verwaltung der vorliegenden SOP**

Diese SOP wird von „**Abteilung und Firma**“ aufbewahrt und aktualisiert. Sie ist Bestandteil des QS-Handbuches. Das Original wird an dem in der Kopfleiste erwähnten Standorte aufbewahrt. Kopien werden an die jeweiligen Laboratorien des Bereiches der „**Abteilung**“ ausgegeben. Nur Kopien mit blauem Aufdruck „Biologie“ sind auf Übereinstimmung mit dem Original überprüft.

Überprüft und genehmigt:

.....  
Datum

.....  
„**Name**“  
(Ausbilderin)

.....  
Datum

.....  
„**Name**“  
(Ausbilder)