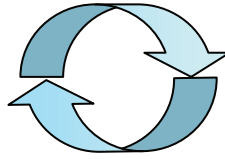


Betrieb[Ausbildungsrahmenplan
Nr. 11.1](#)**Berufsschule**[Rahmenlehrplan
Lernfeld 8](#)

Standardarbeitsanweisung (SOP) Bestimmung der Leucocytenzahl	„Firmenlogo“
Seite: 1 von 6 Verfasser/in: „ Name “, Ausbilder/in	Dok.-Nr.: TBG/06/0007.1/03 Gültig ab: 01.12.2003

1 Change Control

Grund der Erstellung dieser Fassung:

- Überarbeitung des Layouts

Ersetzt SOP TB/05/0007/01

2 Gegenstand, Zweck, Ziel

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

Wie bei der Erythrocytenzählung gilt auch hier, dass neben der teil- bzw. vollautomatischen elektronischen Zählung grundsätzlich nur noch die in der Kammer in Frage kommt.

Nach Hämolyse der Erythrocyten mit Essigsäurelösung lassen sich die Kerne der ebenfalls zerstörten Leucocyten klar erkennen.

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

Leucocytenmischpipette, Micro-Pipettierhilfe, Zellstofftupfer,

Gefäße mit HCL $c(\text{HCL}) = 0,1 \text{ mol/L}$, E- H_2O , Aceton, Mikroskop, Zählkammer nach Bürker, Zähluhr, Impflanzette, Glas- oder Porzellantiegel, Essigsäure $w(\text{CH}_3\text{COOH}) = 2\%$, Eppendorfpipette 10-100 μL , Pipettenspitzen.

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 Kammerbeschickung 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 Schliff-Flächen der beiden Auflegebalken der Zählkammer nach Bürker 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.

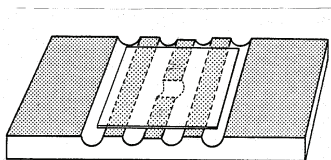
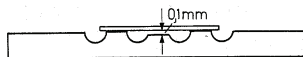


Abb.1. Zählkammer von der Seite und von oben

Verfahren

Blut in einer Leucocytenmischpipette bis zur Marke 1,0 luftblasenfrei aufziehen. Pipettenspitze außen gut abwischen, so dass keine Blutreste mehr anhaften und anschließend in der Leucocytenmischpipette bis zur Marke 11 Essigsäure $w(\text{CH}_3\text{COOH}) = 2\%$ nachsaugen. Es entsteht eine Verdünnung von 1:10. Dazu eine kleine Menge Essigsäure $w(\text{CH}_3\text{COOH}) = 2\%$ in einen Glas- oder Porzellantiegel gießen, um Verunreinigungen zu vermeiden. Das Nachsaugen der Essigsäure $w(\text{CH}_3\text{COOH}) = 2\%$ muss 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.

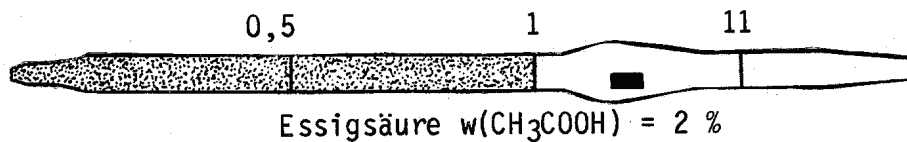


Abb.2. Leucocytenmischpipette

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

Bei Erkrankungen, die mit einer deutlichen Erhöhung der Leucocytenzahl (Leucocytose) einhergehen, zieht man Blut bis zur Marke 0,5 auf und saugt dann Essigsäure $w(\text{CH}_3\text{COOH}) = 2\%$ bis zur Marke 11 nach. Es entsteht eine Verdünnung von 1:20.

Füllen der Zählkammer nach Bürker

Vor Beschicken der Zählkammer nach Bürker 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 die Zählkammer mittels Kapillarität von selbst füllen (besser unter Verwendung einer Eppendorfpipette (10 μ L) die Kammer beschicken). 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 Leucocytenzahl/mm³ Blut

Man zählt 5 Großquadrate mit der Grundfläche von jeweils 1mm² aus. Die Abgrenzung ist jeweils die mittlere Linie der dreifachen Zwischenlinien.

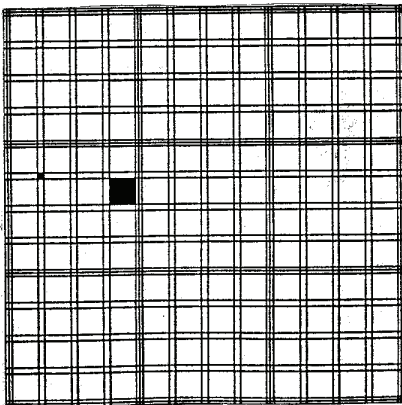


Abb.3. Zählnetz nach Bürker

Diese 5 Quadrate wählt man gleichmäßig über das gesamte Zählnetz verteilt. Es sind die 4 Eckquadrate und ein mittleres Quadrat.

Man zählt alle Leucocyten innerhalb der Quadrate und die auf dem rechten und unteren Rand liegenden Zellen.

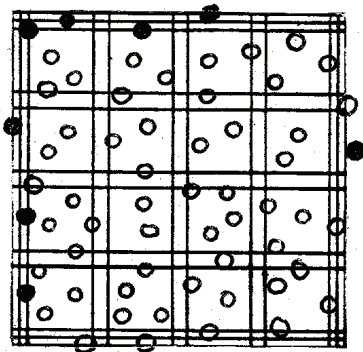


Abb.4. Schematische Darstellung der Leucocyten in einem Quadrat.
Gezählt werden die hellen Punkte

Als Flächeninhalt gilt das Quadrat von 1 mm^2 . Zählt man Leucocyten in 5 solcher Quadrate, so sind in einem Quadrat durchschnittlich

$$\mathbf{ZL_5 : 5 \text{ Leucocyten}}$$

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

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

$$\mathbf{ZL = ZL_5 \times 10 \times \text{Verdünnung} : 5}$$

ZL_5 =Zahl der Leucocyten in 5 Quadraten

ZL =Zahl der Leucocyten in 1 mm^3

Einheiten

Als konventionelle Einheit gilt die Angabe der Leucocyten in Tausend/mm³ Blut. Bei der SI - Einheit tritt an dieser Stelle die Angabe in Giga/L. Dabei bleibt der Zahlenwert derselbe, so dass der Umrechnungsfaktor konventionelle Einheit (10³/mm³ Blut) zur SI - Einheit (10⁹/L Blut) = 1 beträgt.

Reinigen der Leucocytenmischpipette

Durch folgendes Durchziehen von:

1. HCL c(HCL) = 0,1 mol/L
2. E-H₂O
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 Leucocytenmischpipette aufgezogen	Falsche Ergebnisse
Vor dem Nachziehen von der Verdünnungslösung Pipettenspitze außen nicht sauber von Blutresten gereinigt	Zu hohe Ergebnisse
Nasse oder beschädigte Leucocytenmischpipette (z.B. abgestoßene Spitze) verwendet	Falsche Ergebnisse
Vor Befüllen der Zählkammer Blutverdünnung in der Leucocytenmischpipette nicht gründlich genug durchgemischt	Zu tiefe Ergebnisse, da die in der Pipettenkugel sedimentierten Zelle nicht genügend resuspendiert worden sind
Verdünnungsflüssigkeit in der Kapillare der Leucocytenmischpipette 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 Leucocyten 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 Standortes 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)