

## Physiologische Laborpraktika

### HÄMATOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

#### Allgemeine Sicherheitsanmerkungen

Das menschliche Blut ist eine potentielle Ansteckungsquelle, deshalb sollten Studenten die Hygiene- und Sicherheitsregeln einhalten. Das Ergebnis der Untersuchungen hängt von der sorgfältigen Vorbereitung und der sauberen Arbeit ab. Die mit Blut in Berührung gekommenen Materialien (Glas, Papier, Kunststoffabfall) sollen gleich nach der Verwendung in den Eimer für gefährliche Abfälle entsorgt werden. Die Kanülen müssen in einem getrennten Behälter entsorgt werden. Direkter Kontakt mit dem Blut sollte vermieden werden! Die Haut soll im Fall einer Blutkontamination mit Wasser gründlich abgewaschen und danach mit Desinfektionsmittel dekontaminiert werden. Nach der Verwendung bitte alle Instrumente, Pipetten, Mikroskope etc. reinigen und die Reagenzgläser anschließend verschließen.

#### 1. Blutentnahme Techniken

a) aus der Fingerkuppe (Kapillarblut):

Es ist sinnvoll die Punktion auf dem Ringfinger der linken Hand auszuführen (in bestimmten Fällen wird es aus dem Ohrläppchen oder bei den Neugeborenen aus der Ferse entnommen). Nach gründlicher Hautdesinfektion sticht man die laterale Seite des Ringfingers mit einer sterilen Kanüle an.

Der erste Tropfen sollte abgewischt werden und die nachfolgenden, ohne Druck gewonnenen Tropfen, werden zur Bestimmung benutzt. Wenn man starken Druck ausübt, wird nicht nur Blut, sondern auch Gewebsflüssigkeit ausgepresst. Diese Gewebsflüssigkeit verdünnt das Blut und führt so zu Messfehlern. Blut aus der Fingerkuppe ist für die Bestimmung von Hämatokritwert, Blutgruppe, Blutzellenzahl, Differentialblutbild und Hämoglobinkonzentration geeignet.

b) aus den cubitalen Venen (Venenblut):

Eine größere Blutmenge entnehmen wir aus der Vena cubiti bei Erwachsenen. Man sollte die zur Blutentnahme nötigen Mittel bereit halten: Unterlage, Stauschlauch, Alkohol, Wattetupfer und die Kanüle mitsamt Teströhrchen.

Zur Blutentnahme ziehen wir immer Einmalhandschuhe an beiden Händen an, um die Übertragung eventueller Infektionen zu vermeiden. Nach der Blutentnahme werden diese Handschuhe in einen Eimer mit schließbarem Deckel entsorgt.

Während der Blutentnahme sitzt der Patient, oder liegt auf dem Rücken. Wir legen die Unterlage unter den Ellbogen und komprimieren den Oberarm mit dem Stauschlauch. Der Patient soll seine Hand zur Faust ballen. (Es wäre sinnvoller die Venenpunktion ohne Kompression auszuführen, weil die dadurch entstehende Hypoxie die Membran der Erythrozyten beschädigt und Hämolyse verursacht. Diese kann das Ergebnis bestimmter Untersuchungen verfälschen, wie z.B. die Konzentration von Proteinen, Hormonen, Lipiden etc.) Der Vorteil der Kompression ist die einfachere technische Durchführung der Venenpunktion.

Eine geeignete Vene wird ausgewählt und die Haut desinfiziert. Mit einer Hand greifen wir um den Arm und fixieren die zu punktierende Vene ca. 3 cm unter der vorgesehenen Einstichstelle mit dem Daumen. Anschließend wird eine sterile Kanüle im 35 Grad Winkel mit der Öffnung nach Oben in das Lumen eingeführt. Wenn die Kanüle im Lumen ist, empfiehlt es sich diese ein wenig (1 cm) vorzuschieben.

Sobald das Blut fließt kann man die Fixierung der Vene lösen und die gewünschte Blutmenge in das Röhrchen ziehen. Abschließend legen wir den Wattetupfer auf die Einstichstelle, ziehen die Kanüle raus, und bitten den Patienten die Stelle zu komprimieren bis die Blutung gestillt ist.

In der ärztlichen Praxis werden Sie ein geschlossenes Blutentnahmesystem benutzen, um die Wahrscheinlichkeit des Blutkontakts wesentlich zu verringern. Die Teströhrchen enthalten stets gerinnungshemmende Substanzen, und sind mit Vakuum verschlossen. Diese Vakuum-Blutentnahmesysteme saugen automatisch die nötige Blutmenge ab.

## **Die Farbkodierung der Teströhrchen**

**Lila (Na-EDTA):** für morphologische Untersuchungen, Blutgruppenbestimmung und Hämoglobinbestimmung

**Blau (Na-Citrat 1:9):** zur Untersuchung des Blutgerinnungssystems.

**Schwarz (Na-Citrat 1:4):** zur Bestimmung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG).

**Gelb (Rot):** Serumröhrchen – zur chemischen Analyse des Blutsersums (Serum ≠ Plasma!)

## **2. Die für hämatologische Untersuchungen genutzten Antikoagulantien**

In der Laborpraxis wird hauptsächlich Ethylendiamintetraacetat (EDTA) verwendet, aber in bestimmten Fällen werden Heparin und Zitratre als Antikoagulantien genutzt. Die Verwendung von Oxalaten wurde aus der Praxis verdrängt.

a) EDTA: bildet aus freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sogenannte Chelatkomplexe und hemmt so die Blutgerinnung.

b) Zitratre: auch ein Kalziumkomplexbildner. In diesem Fall entstehen Kalziumzitratkomplexe. In der Praxis nutzen wir Natriumzitratre um die BSG zu bestimmen und die Untersuchung des Gerinnungssystems auszuführen.

c) Heparin: Heparin hemmt die Wirkung von Thrombin. Es verändert nicht die Größe von Erythrozyten, weshalb es sich für die Bestimmung von Hämatokrit, osmotischer Resistenz und Hämoglobinkonzentration eignet. Es verursacht nur eine geringfügige Hämolyse.

### 3. Die Blutgruppenbestimmungen und die Untersuchungen vor der Bluttransfusion

Die serologischen Blutgruppenbestimmungen basieren auf der spezifischen Antigen-Antikörper Reaktion. Das Antigen befindet sich auf der Membran der Erythrozyten und die Antikörper sind im Serum gelöst.

Bei einer positiven Reaktion sind die Erythrozyten zusammengeklappt oder agglutiniert. Dieses Phänomen nennt man Hämagglutination.

#### **AB0 Blutgruppenbestimmung:**

Im AB0 Blutgruppensystem kann man 4 verschiedene Gruppen auf Grund der Antigene (=Agglutinogene) der Erythrozyten und Antikörper (= Agglutinine) im Serum unterscheiden.

<b>Blutgruppe</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Antigen</b>	<b>Antikörper</b>
<b>A</b>	<b>AA/A0</b>	<b>A</b>	<b>anti-B</b>
<b>B</b>	<b>BB/B0</b>	<b>B</b>	<b>anti-A</b>
<b>AB</b>	<b>AB</b>	<b>A, B</b>	
<b>0</b>	<b>00</b>		<b>anti-A, anti-B</b>

Nach der Landsteiner-Regel, findet man nie den Antikörper im Serum der sich mit den Antigenen auf den Erythrozyten verbinden kann! Dies bildet den Grundsatz der Blutgruppenbestimmung.

Am Krankenbett kann man die sogenannte einseitige AB0-Blutgruppenbestimmung ausführen. Bei dieser Bestimmung untersuchen wir nur die AB0 Eigenschaften der Erythrozyten.

Die zweiseitige Methode ist jedoch wesentlich zuverlässiger. Bei dieser werden nicht nur die A, B Antigene von Erythrozyten untersucht, sondern auch die anti-A und anti-B Agglutinine des

Serums. Wenn man nur die einseitige Methode nutzt, kann es vorkommen, dass die Erythrozyten mit nur sehr schwachen Antigeneigenschaften nicht nachgewiesen werden.

### **a) Einseitige AB0 Blutgruppenbestimmung**

Zur Bestimmung nimmt man die 10%-ige Erythrozytensuspension der Blutprobe, die mit isotonischer NaCl-Lösung zubereitet wurde.

Die Herstellung der 10%-igen Suspension:

Man braucht vollkommen geronnenes, venöses Blut. (Wenn das Blut noch nicht vollkommen geronnen ist, befinden sich noch Fibrinabscheidungen durch den Gerinnungsprozess. Das dann bei der Bestimmung entstehende Fibrinnetz kann Erythrozyten bergen und so eine Agglutination nachahmen und zu einem Irrtum führen.) Die geronnene Blutprobe wird zentrifugiert und wir gießen das Serum in eine markierte Röhre, welche für die Kontroll- und Kompatibilitätsuntersuchungen verwendet wird. Mit dem Gerinnsel verbleibt ein kleiner Rest vom Serum. Dieses Gerinnsel wird im Restserum mit einem Glasstab vorsichtig verrührt ohne es zu zermahlen. Daraus macht man dann die 10%-ige Suspension mit physiologischer NaCl-Lösung.

Die zur Blutgruppenbestimmung genutzten Testsera mit bekanntem Agglutinin-Inhalt und dementsprechend großem Titer werden in kleinen Gläsern vertrieben.

Die Untersuchung:

Die Untersuchung wird bei Zimmertemperatur durchgeführt. Auf eine weiße Fliese schreiben wir die Reihe der Sera mit „0“, „A“, „B“, und „K“ auf („K“ bedeutet „Kontrolle“, also das eigene Serum). Man tropft unter die Buchstaben jeweils 1 Tropfen vom Testserum welche den Buchstaben entsprechen. Unter „Kontrolle“ kommt das eigene Serum. Zu jedem Tropfen gibt man einen Tropfen der 10%-igen Suspension. Die Serum- und Suspensionstropfen werden mit einem Glasstab oder einer Objekttrögerecke zu einem ovalen Tropfen

zusammengemischt. Für jede Mischung nutzt man saubere Instrumente, um Kreuzreaktionen und Fehler zu vermeiden. Dann muss man die Fliese ein bisschen schwenken und das Ergebnis nach 5 Minuten ablesen. Die Auswertung erfolgt mit freiem Auge. Im Fall einer Agglutination kann man Verklumpungen in dem vorher homogenen Tropfen beobachten. Die Blutgruppenbestimmung ist ungültig, wenn im „K“-Tropfen Agglutination auftritt. Das Ergebnis der Blutgruppenbestimmung kann eine der folgenden Möglichkeiten sein:

	<u>Antikörper im Testserum</u>			
	anti A und B	anti A	anti B	nichts (eigenes Serum)
<u>Blutgruppe</u>				
A	<b>Agglutination</b>	<b>Agglutination</b>	keine Reaktion	keine Reaktion
B	<b>Agglutination</b>	keine Reaktion	<b>Agglutination</b>	keine Reaktion
AB	<b>Agglutination</b>	<b>Agglutination</b>	<b>Agglutination</b>	keine Reaktion
0	keine Reaktion	keine Reaktion	keine Reaktion	keine Reaktion

### **b) Bestimmung des Rh- (D-) Faktors**

Wir schreiben „anti-D“ auf die Fliese auf. Darunter tröpfelt man einen Tropfen vom Testserum, welches anti-D Antikörper enthält. Natürlich soll eine Kontrollprobe auch in diesen Fall verwendet werden. Auch hier ist der Versuch misslungen wenn im Kontrolltropfen eine Agglutination erfolgt. Vor der Auswertung die Fliese ein wenig schwenken und 5 Minuten abwarten.

Auswertung:

Anti-D Serum verursacht eine Agglutination – Rh-positive Blutgruppe

Anti-D Serum verursacht keine Agglutination – Rh-negative Blutgruppe

### **c) Kreuzagglutination**

Sie wird in der medizinischen Praxis vor der Transfusion vorgenommen. Sie ist eigentlich ein eigenständiger Eignungstest, in dem man untersucht, ob das Blut des Empfängers identische ABO- und Rh-Eigenschaften wie das Spenderblut besitzt. Hierzu mischen

wir zum Einen das Serum des Empfängers mit der Suspension der Spender-Erythrozyten (Major-Test), und zum Anderen das Plasma des Spenders mit der Erythrozytensuspension des Empfängers ( Minor-Test). Der Arzt kann die vollständige Eignung des Spenderblutes auf Grund dieser zwei gegenseitigen Tests beurteilen.

Die Antikörper im Spenderblut, die in den Empfänger durch Transfusion geraten, werden verdünnt und filtriert und so verlieren so ihre Wirkung (abgesehen von wenigen Ausnahmefällen). Deshalb führt man den Major-Test neben dem Krankenbett auf folgendem Wege aus:

Die Untersuchung wird auf einer Warmwasserflasche mit einer Temperatur von 38-42°C vollbracht. Man nimmt das Serum des Empfängerblutes, welches zentrifugiert und nicht mit Antikoagulantien behandelt ist, und tropft mit einem gewissen Abstand 2 Tropfen auf die Flasche. Zu einem Tropfen geben wir einen gleich großen Tropfen aus dem Transfusionsbeutel, welcher bei der Entlüftung des Schlauches gewonnen wird.

Zu dem anderen Tropfen wird ein Tropfen einer etwa 50%-igen Zellensuspension mit eigenem Serum gegeben, welche aus dem geronnenen Empfängerblut gewonnen wird. Dieser letzte Schritt bildet die eigene Kontrolle, die wir zur Auswertung brauchen. Wir mischen nun die Serumtropfen und die Zellensuspensionen mit einem Glasstab oder einer Objektträgerecke zusammen, bis wir daraus einen ovalen Tropfen bilden. Für jeden Mischvorgang nutzen wir ein sauberes Instrument. Man soll die Flasche langsam im 30 Grad Winkel schwenken und das Ergebnis anschließend nach 5 Minuten mit freiem Auge ablesen.

Wenn in einem der zwei Tropfen eine Verklumpung auftritt, darf die Transfusion nicht ausgeführt werden. Auch eine Hämolyse in einer der Tropfen bedingt den sofortigen Abbruch der geplanten Transfusion (in diesem Fall wird die Tropfenmischung durchsichtig).

Wenn Sie auch den Minor-Test machen wollen, müssen Sie die Zellensuspension des Empfängers mit einem Serumtropfen des Spenders unter gleichen Umständen reagieren lassen. Auch in diesem Fall schließt eine eventuelle Agglutination die Transfusion aus.

<u>Major-Test</u>	<u>Minor-Test</u>	<u>Kontrolle</u>
Erythrozyten des Spenders	Erythrozyten des Empfängers	Erythrozyten des Empfängers
+	+	+
Serum des Empfängers	Plasma des Spenders	Serum des Empfängers

#### **d) Biologische Probe**

Die biologische Probe ist die letzte Möglichkeit um eine etwaige Inkompatibilität des Blutes vor der Transfusion zu bemerken. Bei dieser Probe transfundieren wir ungefähr 25 ml Blut mit großer Geschwindigkeit in den wachen Patienten. Danach stellen wir die Geschwindigkeit der Transfusion auf niedrig und beobachten den Patienten 3-5 Minuten lang (Allgemeinzustand, Atmung, Kreislauf). Im Falle einer Beschwerde- und Symptomfreiheit kann man die vorherige Prozedur noch zweimal wiederholen. Wenn der Arzt dann immer noch keinerlei Pathologika (Schüttelfrost, Schmerzen in der Taille, allgemeines Unwohlsein) beobachtet, wird dieser Test als negativ deklariert und die Transfusion kann in gewünschter Geschwindigkeit fortgeführt werden.

#### **4. Bestimmung der Blutungszeit**

##### **Duke-Methode:**

Man desinfiziert die Fingerkuppe des Patienten mittels Tupfer und Alkohol, dann machen wir einen 3-4mm tiefen Einstich mit einer sterilen Kanüle. Anschließend wischt man halb-minütlich mit einem Filterpapier die raus quellenden Bluttröpfchen.

Wenn das Blut aufhört aus der Einstichstelle zu sickern, können wir die in Minuten ausgedrückte Dauer als Blutungszeit angeben.

Normalwert: 1-3 Minuten

##### **Ivy- Methode:**

Man baut einen 40 mmHg großen Druck auf den Oberarm mittels



Blutdruckmessgerät auf.

Auf der Innenseite des Unterarmes machen wir, nach Hautdesinfektion, einen etwa 10 mm langen und 1 mm tiefen Kratzer mit einem sterilen Skalpell. Hierbei muss man die größeren Venen umgehen.

Man wischt die ausquellenden Tropfen halb-minütlich mit einem Filterpapier ab.

Normalwert: 3-5 Minuten

Eine verlängerte Blutungszeit kann man im Fall einer reduzierten Thrombozytenzahl, gestörter Thrombozytenfunktion und Pathologie der Blutgefäßwand messen.

Bei beiden Methoden kann die nicht vorschriftsgemäße Tiefe des Einstichs/Einschnittes eine Fehlerquelle darstellen.

## **5. Bestimmung der Gerinnungszeit**

**Lee-White Methode:** Man nimmt 5-6ml frisches venöses Blut. Gleich nach der Blutentnahme wird das Blut in drei, in 37°C warmem Wasserbad vorgewärmte, Reagenzgläser verteilt. Beginn der Zeitmessung ist der Zeitpunkt in dem das Blut anfängt aus der Kanüle zu fließen. Wir prüfen den Beginn der Koagulation durch halb-minütliches schwenken der Reagenzgläser. Die Zeit wird gestoppt wenn das Blut nicht rausfließt, wenn man das Reagenzglas um 180 ° auf den Kopf dreht. Der Durchschnittswert der drei Reagenzgläser stellt die Gerinnungszeit dar.

Normalwert: 5-8 Minuten

Die Gerinnungszeit gilt als pathologisch, wenn sie mehr als 10 Minuten beträgt.

Die Sensitivität der Untersuchung ist gering. Allenfalls gibt sie orientierende Informationen über den endogenen Weg der Koagulationskaskade!

## **6. Bestimmung der Prothrombinzeit (Quick Test)**

Zum Plasma, dessen Kalziumgehalt mit Na-Citrat gebunden ist, werden im Überschuss Gewebsthromboplastin (Phospholipid-Protein Komplex, es aktiviert mittels Faktor VII das extrinsische Gerinnungssystem) und Kalziumchlorid gegeben. Die Methode ist sensitiv für eine etwaige Aktivitätsminderung der folgenden Faktoren: Fibrinogen, Prothrombin, V., VII., X .

In eine sterile Spritze saugen wir 0,5 ml 3,8%-iges Na-Citrat und 4,5 ml venöses Blut auf.

Das zusammengemischte, zittrathaltige Blut wird 10 Minuten bei 1000 g zentrifugiert.

Dann pipettieren wir 0,1 ml Plasma auf ein auf 37°C vorgewärmtes (im Wasserbad) Uhrglas.

Das Kalzium und auch Thromboplastin enthaltende, kommerziell erhältliche Produkt wird in ein ebenfalls auf 37°C vorgewärmtes Reagenzglas gegeben.

Zu den 0,1 ml Plasma soll man 0,2 ml vorgewärmtes Thrombokinase-Reagenz geben.

Dann starten wir die Stoppuhr und verrühren die Tropfen mit einer Kanüle. Dabei ziehen wir jede Sekunde die Kanüle durch die Lösung. Das Erscheinen der ersten Fibrinfilamente zeigt den Eintritt der Gerinnung an und wird als Prothrombinzeit bezeichnet.

Normalwert: 18-20 Sekunden

Routinemäßig wird nicht diese Zeit, sondern der prozentuale Prothrombininhalt des Plasmas mit der unten erläuterten Methode bestimmt, welche das Verhalten bei normaler Prothrombin-Konzentration widerspiegelt.

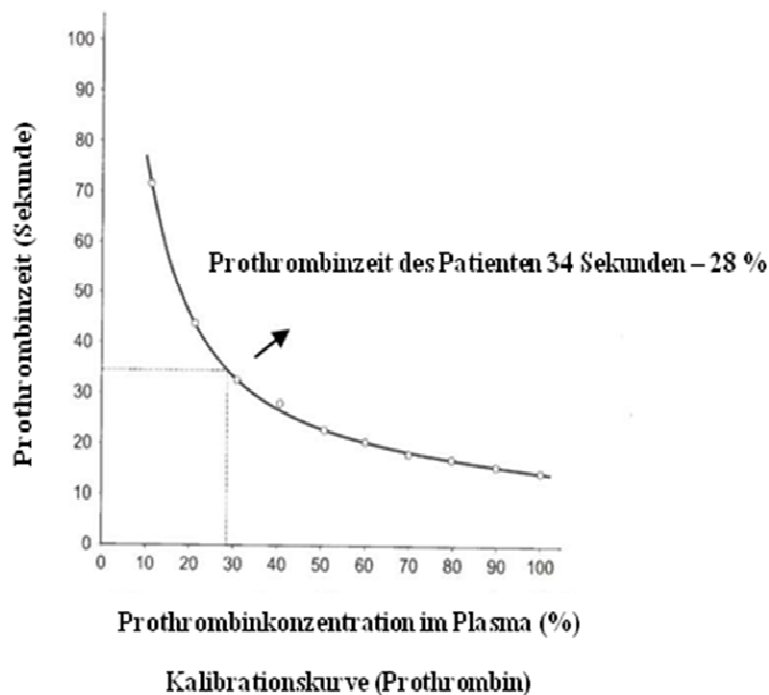
### **Das Aufnehmen der Prothrombin-Kalibrationskurve**

Man entnimmt Blut von 10 gesunden Erwachsenen und hemmt die Koagulation mit Zitraten. Dann wird die Quick-Zeit von jedem Plasma bestimmt, so kann man die Plasmen mit reduzierter Aktivität ausschließen.

Dann gießt man die Reste der Plasmen mit normaler Quick-Zeit zusammen und bereitet daraus 10, 20, 30, 40, 60, 80 %-ige

Verdünnungen mit 0,9%-igem NaCl. Dann misst man die Prothrombinzeit der verdünnten Plasmen auf oben genannte Art und Weise. Aus den Ergebnissen bildet man eine Kurve auf einem Millimeterpapier. Auf der Abszisse wird der Prozentsatz der Verdünnung angegeben und auf der Ordinate kann man die gemessene Gerinnungszeit in Sekunden ablesen. Die Aktivität der unverdünnten Ausgangsplasmen wird als 100% betrachtet. Nach dem Aufnehmen der Kalibrationskurve bestimmt man die Prothrombinzeit des untersuchten Patienten, und liest anschließend den korrespondierenden Prozentwert ab.

Normalwert: 70-130 %



### International Normalized Ratio (INR)

In der ärztlichen Praxis wurde INR eingeführt, damit man die mit verschiedenen kommerziell erhältlichen Produkten gemessenen Prothrombinzeiten vergleichen kann. Jeder Hersteller bestimmt den ISI-Wert ( International Sensitivity Index) von dem eigenem Reagenz. Der Wert liegt in einem Bereich von 1-1,4 und er gibt an, wie sich das

jeweilige Produkt, verglichen mit einem international standardisierten Wert, verhält. Mit Hilfe diesen Wertes können Sie den INR-Wert kalkulieren:

$$\text{INR} = (\text{PT}_t / \text{PT}_n)^{\text{ISI}}$$

PTt (test): die Prothrombinzeit des untersuchten Patienten

PTn (normal): die Prothrombinzeit der gesunden Kontrollpersonen

### **7. Partielle Thromboplastinzeit ( theoretisch)**

Hierzu misst man die Aktivität der Gerinnungsfaktoren des Plasmas in Anwesenheit von Kalzium und Faktor 3 in einem Thrombozyten stellvertretenden Phospholipid-Reagenz. Man gewinnt Serum aus der Probe mittels Zentrifugation, welche Zitrat und Blut im Verhältnis 1: 9 enthält. Hinzu gibt man dann Kalzium und das Phospholipid-Reagenz und man misst anschließend die Zeit (bei 37 °C), bis der erste Fibrinfaden erscheint. Diese Methode ist repräsentativ für alle Gerinnungsfaktoren, ausgenommen VII und XIII. Es wird zur Kontrolle der Heparintherapie verwendet.

Ihr Normalwert hängt stark von dem verwendeten Reagenz ab: er kann zwischen 40-90 Sekunden liegen.

Im Fall einer verlängerten Thromboplastinzeit, kann man mit Beigabe einer besonderen Plasma-Lösung in der ein Faktor fehlt, feststellen an welchem Faktor es mangelt. Wenn also zum Beispiel die pathologisch verlängerte partielle Thromboplastinzeit mit der Zugabe einer Faktor VIII freien Lösung nicht korrigiert werden kann, jedoch eine Faktor IX freie Lösung eine Besserung herbeiführt, dann war das untersuchte Plasma Faktor VIII los.

### **8. Thrombinzeit ( theoretisch)**

Wir bestimmen die Gerinnungszeit des Plasmas mittels Zugabe einer Thrombin-Lösung mit bekannter Aktivität bei 37 °C. Zuvor gibt man jedoch Zitrat zur Blutprobe im Verhältnis 1:9. Die Zeit die von der Zugabe der Thrombin-Lösung bis zur Entstehung des Fibringerinnsels

verstreicht, ist die Thrombinzeit. Ihr Wert ist abhängig von der Konzentration des Fibrinogens und der Antithrombinwirkung (z.B.: die Antithrombinwirkung von Heparin, oder der Abbauprodukte die durch Plasmin aus Fibrinogen entstehen und hemmende Wirkung auf die Thrombin-Fibrinogen-Reaktion besitzen). So ist die Bestimmung der Thrombinzeit auch geeignet um mittels Laborwerte die Heparintherapie zu kontrollieren.

Der Normalwert hängt von der Thrombinkonzentration des verwendeten Produktes ab. Im Allgemeinen beträgt er ca. 25 Sekunden.

## **9. Hämatokritbestimmung**

Der prozentuale Anteil der Blutzellen am Blutvolumen entspricht dem Hämatokritwert. Für die Bestimmung liegen mehrere Möglichkeiten vor.

### **a) Makromethode**

Wir saugen venöses Blut in eine in 100 gleiche Teile eingeteilte Hämatokrit-Röhre (Wintrobe-Röhre) bis zur Markierung 100 auf. Das Blut wird zuvor mit EDTA-K<sub>2</sub>, Heparin oder Na-Oxalat antikoaguliert. Die Hämatokrit-Röhre wird anschließend in eine Zentrifugalmöhre gelegt und mit einer Waage ausgeglichen, dann zentrifugieren wir sie mit einer zentripetaler Beschleunigung von 10.000-20.000 g (entspricht ca. 12000-14000 U/min). Nach dem Zentrifugieren kann man den Hämatokritwert direkt an der Wand der Röhre ablesen. Er entspricht der Grenze zwischen den Zellen und dem darüber liegenden Plasma. Diese Methode ist in der heutigen Laborpraxis überholt, weil die Mikromethoden schneller sind und weniger Blut benötigen.

### **b) Mikromethode**

Die mit Heparin benetzte Glaskapillare füllt man zu 2/3-3/4 mit aus der Fingerkuppe entnommenem Blut. Das untere Ende der Kapillare wird mit Knete abgedichtet und mit dem offenem Ende nach innen in die Hämatokritzentrifuge eingelegt. Das Blut wird anschließend 5

Minuten zentrifugiert. Dann wird die Kapillare auf das Ablese Brett gelegt. Die Grenze zwischen Plasma und Zellen stellt den Hämatokritwert dar.

Bestimmung des Hämatokritwertes auf elektronischem Weg: diese Methode basiert darauf, dass das Plasma elektrischer Leiter ist und die Zellen elektrischen Widerstand haben (Nichtleiter). Deshalb ist das durch die Blutkolumne durchlaufende elektrische Potenzial proportional zum Volumen der Erythrozyten. Diese Methode bedarf eines speziellen Messgerätes. In der Regel entsprechen die auf diesem Wege gemessenen Werte sehr gut den Werten aus der Zentrifugalmethode.

Normalwert bei Männern: 0,40-0,54

Normalwert bei Frauen : 0,37-0,47

## **10. Bestimmung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) nach Westergren**

Wir messen die Zeit der Senkungsgeschwindigkeit der Erythrozyten im antikoagulierten Blut. Die folgenden Faktoren können diesen Parameter beeinflussen: Volumen, Ladung, Oberflächenspannung der Erythrozyten und Inhalt des Plasmas. Erhöhte Werte von Fibrinogen und Globulin im Plasma (Entzündungsreaktion), und/oder das Erscheinen pathologischer Proteine (Tumorkrankheiten) führen zu einer Erhöhung der BSG. Jedoch können auch unter physiologischen Bedingungen erhöhte BSG-Werte gemessen werden, z.B. ab dem dritten Schwangerschaftsmonat.

Bestimmung: zu den 0,4 ml 3,8 %-iger Na-Citrat Lösung geben wir 1,6 ml venöses Blut, und mischen beide Lösungen vorsichtig in der Spritze.

Zur Bestimmung benutzt man die Westergrenröhre, die eine 300 mm lange und bis zur Höhe von 200 mm skalierte Röhre ist. Das Blut wird in die Westergrenröhre bis zur 0 Markierung ohne Luftblasen aufgesaugt und dann wird die Röhre in einem speziellen Ständer abgestellt. Dieser fixiert die Röhre in vertikaler Richtung. Nach einer Stunde lässt sich der Wert an der Grenze zwischen Blutzellen und

Plasma ablesen.

Normalwert bei Männer: 3-6 mm/Stunde

Normalwert bei Frauen: 8-10 mm/Stunde

In der heutigen Praxis wird die BSG mithilfe von Plastikröhren bestimmt, die Teil des Vakuum-Blutentnahmesystems sind.

## **11. Blutzellenzählungen**

Die Anzahl von Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten in einem bestimmten Blutvolumen lässt sich leicht feststellen. Hierzu füllt man eine entsprechend verdünnte Suspension in die Bürkersche Zählkammer. Unter dem Mikroskop (bei 120-200-facher Vergrößerung) bestimmt man die Zahl der unterschiedlichen Blutzellen in den spezifischen Teilen der Kammer (mit bekannten Volumina), und bildet einen Durchschnittswert. Dieser wird anschließend mit der Stärke der Verdünnung multipliziert und dann auf das angestrebte Volumen bezogen (im SI-System auf Liter).

Die Bürkersche Zählkammer ist ein spezieller Objektträger, auf dem ein standardisiertes Netzwerk (Zählnetz) in den mittleren Teil gefräst wurde. Die Oberfläche des mittleren Teiles, welcher mittels Queraushöhlung in zwei Teile getrennt ist, liegt um 0,1 mm tiefer als die seitlichen Anteile. Wenn man also die Kammer mit einem Deckglas bedeckt (und diese mithilfe der Klemmen befestigt), bildet sich ein Spalt von 0,1 mm zwischen Deckglas und der Zählkammer. Diesen gilt es mit Blut zu befüllen.

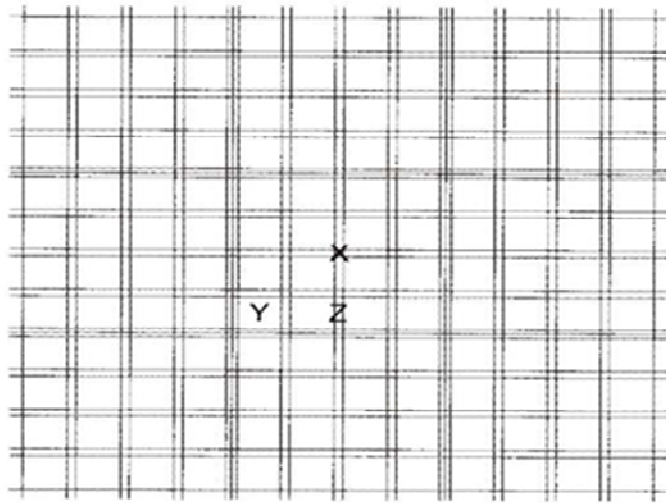
Die Dimensionen des Zählnetzes:

Kürzerer Abstand zwischen den Parallellinien: 50  $\mu\text{m}$  (1/20 mm)

Längerer Abstand zwischen den Parallellinien: 200  $\mu\text{m}$  (1/5 mm)

Oberfläche des kleinen Quadrates 1/400  $\text{mm}^2$

Oberfläche des großen Quadrates 1/25  $\text{mm}^2$



### **Bürkersche Kammer**

$$X \quad A = 1/400 \text{ mm}^2$$

$$Y \quad A = 1/25 \text{ mm}^2$$

$$Z \quad A = 1/100 \text{ mm}^2$$

#### **a) Zählung der Erythrozyten**

Man desinfiziert die Fingerkuppe des Probanden mit Alkohol und Wattetupfer und entnimmt Kapillarblut (stets den ersten Tropfen abwischen und den zweiten dann verwenden!). Das Blut wird mit der roten Mischpipette („mélangeur“) bis zur Marke 1 aufgesaugt, und diese anschließend abgewischt. Nun saugt man die „Hayem-Lösung“ bis zur Marke 101 auf. Dadurch entsteht eine 100-fache Verdünnung. Das Blut darf dabei keine Luftblasen enthalten. Die Hayem-Lösung enthält: 2,5%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0,5 %  $\text{NaCl}$ , 0,025%  $\text{HgCl}_2$ . Sie ist eine hypertone Salzlösung, welche die Erythrozyten verschrumpelt und so eine Aggregation (Geldrollenbildung) verhindert.

Man hält beide Enden der Pipette zu und vermischt die Lösung durch Drehbewegungen für 1-2 Minuten. Den ersten Tropfen aus der Pipette gibt man auf ein Filterpapier, dann gibt man einen Tropfen an den Rand der Bürkerschen Zählkammer, die durch das Deckglas bereits



bedeckt ist. Durch Kapillarkräfte wird sich das Blut gleichmäßig verteilt.

Man zählt die Erythrozyten im kleinen Quadrat ( $1/400\text{mm}^2$ ). Beim Mikroskop wird hierzu die Blende verengt und der Kondensator gesenkt. Nachdem man die Erythrozyten in 40 kleinen Quadraten gezählt hat, bildet man den Durchschnittswert und multipliziert ihn mit 400000. So erhält man die Erythrozytenzahl in  $1\text{ mm}^3$  (in  $1\text{ }\mu\text{l}$ ) und kann daraus die Anzahl in einem Liter extrapolieren.

Fehlerquelle können auf den Grenzlinien liegende Erythrozyten sein. Man kann diesen Fehler vermeiden wenn man nur die auf dem oberen und linken Rand befindlichen Erythrozyten zählt.

Normalwert bei Männer:  $4,8-5,2 \times 10^{12} / \text{l}$

Normalwert bei Frauen:  $4,3-4,7 \times 10^{12} / \text{l}$

### **b) Zählung der Leukozyten**

Die Blutentnahme wird auf demselben Wege ausgeführt wie oben aufgeführt. Aber in diesem Fall nimmt man die kleinere Pipette (mit weißer Mischperle). Bis zur Marke 1 Blut und bis zur Marke 11 Türk-Lösung auffüllen.

Die Türk-Lösung enthält: 0,5% Essigsäure, 1% Methylenblau - oder Genvianviolett-Lösung. Diese saure Lösung hämolysiert die Erythrozyten und färbt den Kern der Leukozyten.

Die Zähltechnik ist die Gleiche wie bei den Erythrozyten, aber hier zählt man im großen Quadrat. Die Leukozyten werden in 20 großen Quadraten gezählt und der daraus gebildete Durchschnittswert wird mit 2500 multipliziert. So erhält man die Leukozytenzahl in  $1\text{ mm}^3$  Blut. Daraus lässt sich auf die Zahl pro Liter schließen.

Normalwert:  $6-8 \times 10^9 / \text{l}$

### **c) Zählung der Thrombozyten nach Fischer-Germer**

Mit der zur Zählung der Erythrozyten genutzten Pipette saugt man Blut bis zur Marke 1 und die Fischer-Germer-Lösung bis zur Marke 101 auf.

Die Fischer-Germer-Lösung enthält: 3,5 g Procainum Hydrochloricum

(Novocain) und 0,25 g NaCl in 100 ml destilliertem Wasser.

Man zählt die Thrombozyten in der Bürkerschen Kammer mit dem Phasenkontrastmikroskop. Da bei uns kein Phasenkontrastmikroskop zur Verfügung steht, nimmt man stattdessen den Grünfilter des Mikroskopes.

Es ist sehr wichtig, dass man die Bürkersche Kammer nach dem Befüllen für etwa 15 Minuten in die feuchte Kammer legt. So ermöglicht man es allen Thrombozyten sich auf das gleiche Niveau abzusetzen.

Wenn man den Durchschnitt der in 10 großen Quadraten gefundenen Thrombozyten mit 2500 multipliziert, erhält man die Thrombozytenzahl in  $1 \text{ mm}^3$  Blut. Daraus können wir auf den Wert für ein Liter schließen.

Normalwert:  $150-300 \times 10^9/l$

#### d) Zellenzählung mit dem hämatologischen Automat

1) Fotoelektrische Methode: die Blutsuspension fließt durch eine Küvette, die an einen Dunkelfeld-Kondensor verbunden ist. Jede Partikel blitzt auf, bevor sie an der Lücke des Kondensors vorbeikommt. Die Lichtimpulse werden von einem speziellen Gerät in elektrische Impulse umgewandelt, gezählt und abschließend gespeichert.

2) Auf dem elektrischen Widerstand basierte Methode: Blutzellen sind schlechte elektrische Leiter. Bestimmte verdünnte Lösungen leiten den Strom besser. In die verdünnte Blutzellensuspension taucht man also eine Elektrode ein, deren Stromkreis mit einem „inneren“ Elektrodenraum verbunden ist. Dieser Elektrodenraum wiederum, ist mithilfe eines Kapillarspalt mit der Blutzellensuspension verbunden. Wenn die Blutzellensuspension durch den Kapillarspalt strömt, verursacht jeder Partikel eine Widerstandsveränderung. Die Widerstandsveränderung ist proportional zur Größe der Partikel. Die Auswertung wird von einem elektrischen Zählgerät gemacht.

## **12. Untersuchung der osmotischen Resistenz der Erythrozyten**

Man kann den Grad der Hämolyse mit der Hilfe von Lösungen mit unterschiedlicher osmotischer Konzentrationen bestimmen. In einer isotonischen Lösung (die osmotische Konzentration ist gleich der osmotischen Konzentration des Blutes) verändert sich nicht die Form der Erythrozyten. In einer hypotonischen jedoch schwellen sie an, bis sie platzen und das Hämoglobin austritt (= Hämolyse).

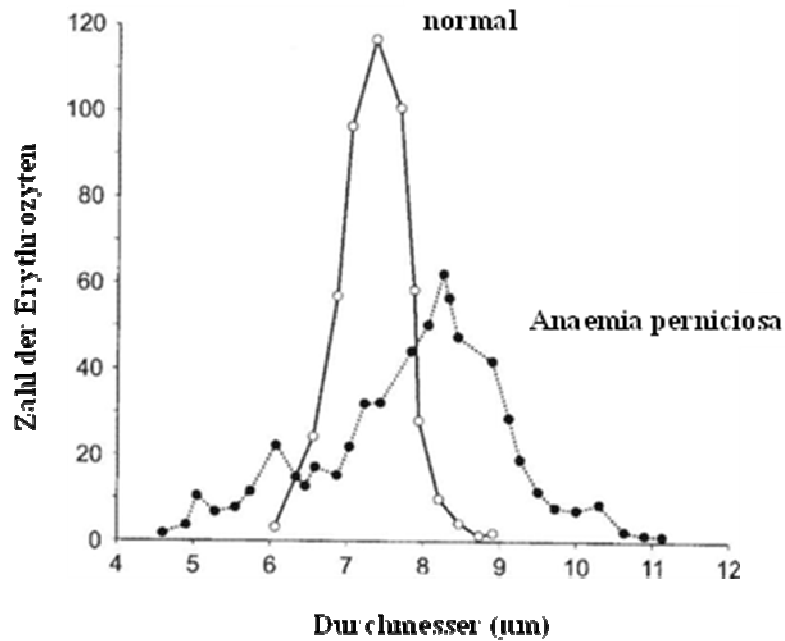
Zur Bestimmung bereitet man eine Verdünnungsreihe vor: in acht Zentrifugenröhrchen gibt man 3-3 ml NaCl- Lösung, deren Konzentrationen 0,3; 0,35; 0,4; 0,45; 0,5; 0,55; 0,6; und 0,65 % beträgt. In jedes Röhrchen tropft man einen Tropfen natives oder mit Heparin versehenes Blut. Anschließend schüttelt man den Inhalt und lässt die Röhrchen 10 Minute stehen, dann zentrifugieren.

In den Röhrchen ohne Hämolyse, setzen sich die Erythrozyten ab und die Flüssigkeit ist klar. In den Röhrchen mit Hämolyse, ist die Flüssigkeit rot. Die Konzentrationen der zwei Lösungen, in denen zum Einen erste Anzeichen einer Hämolyse auftraten und zum Anderen die Hämolyse komplett war, geben den Wert der osmotischen Resistenz.

Bei einem gesunden Menschen ist die osmotische Resistenz: 0,45-0,5% .

## **12. Die Bestimmung des Durchmessers von Erythrozyten ( Price-Jones Kurve)**

Man tauscht das Okular des Mikroskopes gegen ein Okularmikrometer mit einer Skalierung aus. Die Skala des Okularmikrometers wird bei Immersionsvergrößerung mit der Seite des kleinen Quadrates der Bürkerschen Kammer ( $1/20\text{mm}=50\mu\text{m}$ ) kalibriert. So kann man feststellen, wie viele Mikrometer der Skalaenteilung entsprechen



### Price-Jones Kurve

Aus der Fingerkuppe entnommenes Blut wird mit Kochsalzlösung verdünnt.

Einen Tropfen gibt man auf den Objektträger und wird er von einem Deckglas bedeckt. Unter Immersionsvergrößerung bestimmt man den Durchmesser von 100 Erythrozyten und bildet den Durchschnitt.

Zur genaueren Bestimmung sollte man 200-300 Zellen messen und die Werte in einem Koordinatensystem darstellen. Auf der Abszisse wird der Durchmesser der Erythrozyten angegeben und auf der Ordinate die Zahl der jeweiligen Größe. Die Häufigkeiten der Durchmesser weisen eine klassische Gauß-Verteilung zwischen 6-9µm auf. Die Erythrozyten mit einem Durchmesser von etwa 7µm haben die größte Prävalenz. Die Linksverschiebung der Kurve, also in Richtung der kleineren Durchmesser, weist auf eine Mikrozytose, und die Rechtsverschiebung auf eine Makrozytose. Wenn es einen großen Unterschied zwischen den Durchmessern der Zellen gibt, so spricht man von einer Anisozytose.

### **13. Die Bestimmung des Färbungsindex ( theoretisch)**

Der Färbungsindex charakterisiert den Hämoglobingehalt der Erythrozyten.

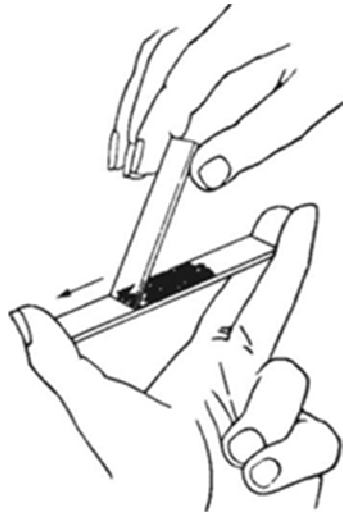
Zur Berechnung des Färbungsindex dividiert man den relativen Hämoglobinprozent-Wert mit der relativen Erythrozytenzahl. Der relative Hämoglobinprozent-Wert bedeutet gemessener Hämoglobinwert im Verhältnis zum normalen Wert.

Nehmen wir 5 Millionen ( $/\mu\text{l}$ ) als normale Erythrozytenzahl, also als 100 %. Wenn der prozentuale Hämoglobingehalt 100 % und die Erythrozytenzahl 5 Millionen sind, ist der Färbungsindex 1,0. Im Fall von Anämie, wenn der ausgerechnete Index niedriger als 1 ist, spricht man von einer hypochromen Anämie. Das bedeutet also, dass die Verminderung des Hämoglobins im Blut stärker ist als die Verminderung der Erythrozytenzahl. Wenn unser Index jedoch höher als 1 ist, spricht man von einer hyperchromen Anämie. In diesem Fall ist die Verminderung der Erythrozytenzahl stärker ausgeprägt als die Verminderung des Hämoglobingehaltes. Natürlich kann der Färbungsindex auch bei einer Anämie 1 (oder nahe 1) sein. Dann spricht man von einer normochromen Anämie.

### **15. Die Färbung und Untersuchung des peripheren Blutausstriches (Differentialblutbild)**

Dieser Untersuchung hat eine große diagnostische Bedeutung, da wir den prozentualen Anteil, Morphologie der verschiedenen Leukozyten und eventuell auch die Anwesenheit pathologischer Zellen im gefärbten Blutausstrich beobachten können. Zudem kann man darin auch Deviationen der Morphologie und Größe der Erythrozyten erkennen.

Mit dem aus der Fingerkuppe gewonnenen Blutropfen berührt man das kürzere Ende des Objektträgers. Dann legt man diesen auf das kürzere Ende eines mit Alkohol entfetteten Objektträgers im  $45^\circ$  Winkel und zieht ihn entlang. So entsteht ein gleichmäßiger und dünner Film auf dem Objektträger, ein Blutausstrich. Diesen lässt man an der Luft trocknen.



### **Herstellung des Blutausstriches**

Nach dem Trocknen wird der Ausstrich fixiert und dann mit saurer und basischer Färbung nach Pappenheim gefärbt ( die Kombination der May-Grünwald und Giemsa-Färbung). Dies ermöglicht die Identifizierung der verschiedenen Zellen anhand der Zellgröße, Größe und Form des Zellkernes, Kolorierung und Körnung des Plasmas etc. Weiterhin lässt sich der prozentuale Anteil der einzelnen Zellen bestimmen.

Wir brauchen zur Färbung:

- May-Grünwald-Lösung ( Methyleneblau-Eosinat in Methanol-Glycerin)
- destilliertes Wasser
- Giemsa-Lösung (sie enthält Azureosinat in Methanol-Glycerin)

Der an der Luft getrocknete Ausstrich wird auf einen Ständer abgelegt, und man gießt konzentrierte May-Grünwald-Lösung darauf. Der Methylalkohol in der Lösung fixiert den Ausstrich. Nach 3 Minuten gibt man destilliertes Wasser dazu, ohne die Farbe abzugießen. Nach 1 Minute die nun verdünnte Farbe abgießen und ohne zu trocknen die frisch verdünnte Giemsa-Lösung dazu geben.

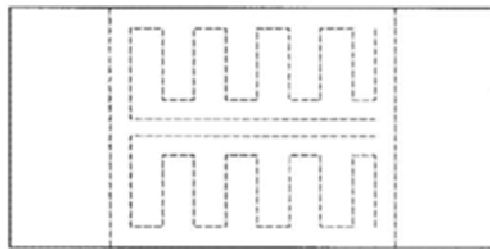
Diese lässt man 15 Minuten einziehen.

Die Verdünnung der Giemsa-Lösung geschieht mit 1ml konzentrierter Färbungslösung und 20ml destilliertem Wasser. Nach 15 Minuten wird die Farbe gründlich abgespült, der Objektträger mit Filterpapier abgelöscht, und an frischer Luft getrocknet. Der Ausstrich wird mittels Immersionsvergrößerung untersucht.

Da die Verteilung der Zellen im Ausstrich nicht gleichmäßig ist, führen wir die Zählung entlang der sogenannten „Mäander“-Linien aus. Diese sind virtuelle Linien (aus der griechischen Baukunst bekannt), an denen wir das Blickfeld ausrichten.

Den Ausstrich stets um ein ganzes Blickfeld verschieben! So wird vermieden, dass eine Zelle mehrmals oder gar nicht erfasst wird. Mindestens 200 Leukozyten muss man untersuchen, um den prozentualen Anteil dieser Zellen untereinander bestimmen zu können.

(Das Differentialblutbild kann auch von speziellen hämatologischen Automaten bestimmt werden.)



**Mäander-Linien**

### **Granulozyten:**

**Neutrophile Granulozyten:** der Zellkern ist veilchenblau und die Form ist vielfältig ( hufeisenförmig, stäbchenförmig, segmentiert). Das Plasma ist rosarot und darin kann man feines lila-rote Granulat beobachten.

**Eosinophile Granulozyten:** Der Zellkern ist veilchenblau und hat

zwei Segmente. Das Plasma ist rosarot und enthält grobe, gleichmäßige, rot-gelbe Granulation.

**Basophile Granulozyten:** Die Form des Kernes kann vielfältig sein. Im rosaroten Plasma sind blaue Körnchen.

**Monozyten:** Es kommt häufig vor, dass man diese Zellen mit vielfältiger Form sieht. Der Zellkern ist manchmal gelappt, lila und darin kann man ein Chromatinnetz beobachten. Das Plasma ist blassblaugrau und ohne Granulat.

**Lymphozyten:** Der Zellkern ist groß, lila und enthält viel Chromatin. Sie haben einen schmalen, hellblauen Plasmarand.

**Plasmazellen:** Der lila Zellkern liegt exzentrisch. Sie besitzen blaues Plasma. Der grobe Chromatininhalt liegt wie Radspeichen vor.

Normalerweise besitzen Leukozyten folgende prozentuale Unterteilung im peripheren Blutaussstrich:

Neutrophile Granulozyten	
Juvenile Form ( Metamyelozyten, Jugendform)	0-1%
Stabkernige Granulozyten	0-3 %
Segmentkernige Granulozyten	60-80 %
Eosinophile Granulozyten	1-5 %
Basophile Granulozyten	0-1%
Lymphozyten	20-30 %
Monozyten	2-6 %

.