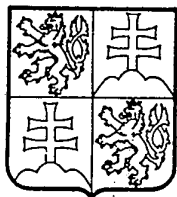


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

274 409

(11)

(13) B2

(51) Int. Cl.⁵
G 01 N 31/22

(21) PV 6581-84.M

(22) Přihlášeno 31 08 84

(30) Právo přednosti od 02 09 83 HU (3060/83)

(40) Zveřejněno 12 09 90

(45) Vydáno 30 10 92

(72) Autor vynálezu

MUSZBEK LÁSZLÓ dr., ÁDÁNY RÓZA dr., DEBRECEN,
HARSÁNYI ILONA, ZAJKA GABRIELLA dr., BUDAPEST
(HU)

(73) Majitel patentu

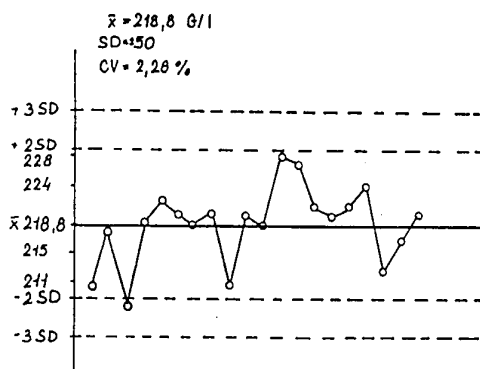
REANAL FINOMVEGYSZERGYÁR,
BUDAPEST (HU)

(54)

Činidlo k současnému stanovení počtu
trombocytů a leukocytů

(57)

Řešení se týká činidla k současnému stanovení počtu trombocytů a leukocytů normální mikroskopickou cestou za použití světelného mikroskopu, které se vyznačuje tím, že obsahuje 0,1 až 5 dílů hmot. acetonu, 0,05 až 2,0 dílu hmot. formaldehydu a/nebo glutaraldehydu, 0,001 až 0,1 dílu hmot. thiazinového barviva, například toluidinové modři, 0,1 až 2,0 dílu hmot. minerální soli, např. chloridu sodného, a do 100 dílů hmot. vody.



Obr. 1.

Vynález se týká činidla k současnému stanovení počtu trombocytů a leukocytů.

Předmětem vynálezu je činidlo obsahující aceton a formaldehyd nebo glutaraldehyd, minerální soli a barviva, které je vhodné k současnému stanovení počtu trombocytů a leukocytů z plné krve normální mikroskopickou cestou.

Je známo, že stanovování počtu trombocytů a počtu leukocytů spadá do rozsahu standardních metod klinických laboratoří. Počítání trombocytů se může provádět různými metodami:

1. Elektronické počítání částic pomocí automatů vyvinutých pro počítání trombocytů. I když je metoda rychlá a jednoduchá, je nutno opatřit velmi drahé přístroje. Tato metoda není vždy vhodná k náhradě mikroskopického stanovování. Reprodukovatelnost tohoto postupu je rovněž horší než reprodukovatelnost mikroskopického počítání.
2. Počítání trombocytů pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem za použití roztoku obsahujícího kokain nebo novokain nebo některého jiného roztoku pro počítání trombocytů. K provádění tohoto postupu je nepostradatelným mikroskop s fázovým kontrastem. Další podstatná nevýhoda spočívá v tom, že metoda je pro personál provádějící pokusy únavná, namáhavá a škodlivá pro oči, zejména při vysokém počtu pokusů.
3. Stanovením počtu trombocytů metodou barvení. Tento postup je nejjednodušší a může se provádět pomocí mikroskopu. Podle dnes používaných metod se jako barvivo používá krystalová violeť (genciánová violeť; chemický název: hexamethyl-p-rosanilin-hydrochlorid). Vůči těmto metodám se oprávněně namítá, že ve srovnání se stanovením pomocí fázového kontrastu zkresluje výsledky, protože ne všechny trombocyty se vybarví dobře viditelným způsobem.

V hematologické diagnostice představuje počítání leukocytů nejrozšířeněji používanou metodu. Pro tento účel je obecně vhodný Türkův roztok, který se popisuje v maďarském lékařském (Ph. Hg. VI) a který se dobře uchovává, není však vhodný ke stanovení počtu trombocytů. To je značná nevýhoda, protože velmi často je nutné společné provádění obou těchto rozšířených laboratorních pokusů. Ke stanovení počtu trombocytů a počtu leukocytů z plné krve pomocí normálního světelného mikroskopu je potřebný roztok barviva, který

- a) vyvolá úplnou hemolýzu erythrocytů bez snížení počtu trombocytů a počtu leukocytů;
- b) fixuje jak trombocyty, tak i leukocyty a
- c) obsahuje takové barvivo, které je na shora uvedené částice vázáno s vysokou afinitou a tímto způsobem je fixováno v normálním světle.

Roztok, který splňuje první dva ze shora uvedených požadavků, je sice znám (srov. Scand. J. Clin. Invest. 33, 121 (1974)), počítání trombocytů se však může provádět jen za použití mikroskopu s fázovým kontrastem.

Cílem vynálezu byla výroba roztoku barviva, jehož pomocí je možno provádět stanovení počtu trombocytů a počtu leukocytů z plné krve za použití normálního světelného mikroskopu a za odstranění shora uvedených nevýhod známých činidel.

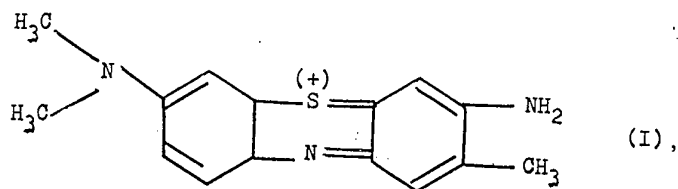
Vynález spočívá na překvapivém poznatku, že kombinací hemolyzujícího a fixujícího roztoku s bážickým barvivem vysoké afinity se získá roztok činidla, který je vhodný pro společné stanovování počtu trombocytů a počtu leukocytů za použití normálního světelného mikroskopu. Shora uvedené podmínky mohou být splněny v tom případě, když hemolyzující a fixující roztok není s barvivem inkompatibilní, tzn. že nevytváří žádnou sraženinu.

Vzniku mikroskopických sraženin se má zamezit; takové sraženiny mohou mít totiž charakter trombocytů a tím mohou zkreslovat výsledek stanovení.

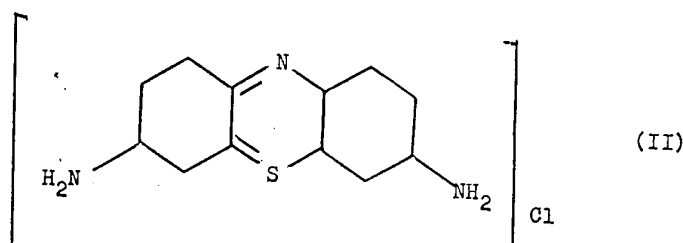
Dosud používané roztoky barviva typu kresolové violeti odpovídají shora uvedeným požadavkům jen částečně. Složky barviva kresolové violeti v roztoku, který je určen pro počítání, mají totiž slabě bážický charakter. Tím se trombocyty zbarvují jen velmi málo a leukocyty se nejeví jednoznačně.

Nyní bylo podle vynálezu zjištěno, že pro tento účel se výtečně hodí tzv. thiazinová

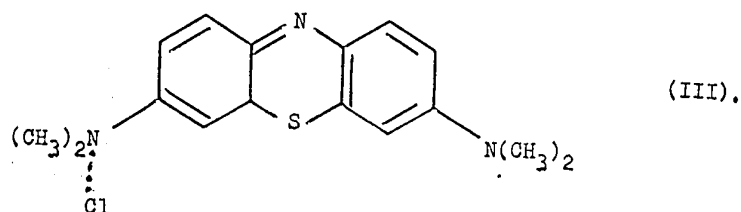
barviva. Barviva thiazinového typu se vyznačují přítomností dvou chromoforových skupin. Sloučeniny thiazinového typu již byly v lékařské praxi používány v různých oborech (například k barvení bakterií, v histochemii), avšak v odborné a patentové literatuře neexistuje žádný údaj o poznatku podle vynálezu. Nejdůležitějšími zástupci této skupiny sloučenin je toluidinová modř vzorce I



thionin vzorce II



a methylenová modř vzorce III



Předmětem předloženého vynálezu je činidlo k současnému stanovení počtu trombocytů a počtu leukocytů obvyklou mikroskopickou cestou, které se vyznačuje tím, že obsahuje 0,1 až 5 dílů hmotnostních acetonu, 0,05 až 2,0 dílu hmotnostního formaldehydu nebo/a glutaraldehydu, 0,001 až 0,1 dílu hmotnostního thiazinového barviva, výhodně toluidinové modři, 0,1 až 2,0 dílu hmotnostního minerální soli, výhodně chloridu sodného a do 100 dílů hmotnostních vody.

Podle výhodného provedení vynálezu se činidlo skládá z 0,1 až 5,0 dílu hmotnostního acetonu, 0,05 až 2,0 dílu hmotnostního formaldehydu, 0,001 až 0,1 dílu hmotnostního toluidinové modři a 0,1 až 2 dílů hmotnostních chloridu sodného.

Zvláštní výhoda barviv používaných podle vynálezu spočívá v tom, že tato barviva mají velmi vysokou afinitu také vůči kyselým makromolekulám trombocytů a leukocytů, což má odpovídajícím způsobem za následek velmi intenzivní a markantní viditelnost.

Nejdůležitější výhoda činidel podle vynálezu spočívá v tom, že citlivost činidel je podstatně vyšší ve srovnání se známými činidly. Tuto skutečnost lze prokázat následujícími

pokusy.

Výsledky dosažené ze vzorků s neznámým počtem trombocytů a leukocytů se získají během dvaceti po sobě probíhajících stanovení počtu trombocytů a počtu leukocytů. Přesnost metody počítání buněk je uspokojující tehdy, jestliže standardní odchylka je menší než 10 %. Při počtu trombocytů 218,8 G/l činí standardní odchylka (SD) $\pm 5,0$ a za použití těchto hodnot činí variační koeficient (jako standardní odchylka, vyjádřená v %) 2,28 (srov. obr. 1). Nutno ještě uvést, že hodnota G/l znamená počet trombocytů a počet leukocytů udávaný v systému SI [$G/l = \text{giga}(\text{počet buněk})/\text{litr} = \text{počet buněk} \times 10^9$], viz srovnání s obr. 1.

Počítání trombocytů a leukocytů se provádí pomocí reagenčního roztoku podle příkladu 1 způsobem popsaným v příkladu 2. K měření se používá téhož roztoku žilní krve a jednotlivá měření se dvacetkrát opakuje. Hodnoty počtu buněk získané při jednotlivých měřeních vyjádřené v jednotkách G/l ($G/l = \text{giga} / 10^9 / \text{počet buněk/litr}$) byly vyneseny na obr. 1. Jak lze z tohoto obr. odečíst, kolísají naměřené hodnoty mezi 210 G/l a 230 G/l; z těchto údajů vypočtená průměrná hodnota ($\bar{x}$) činí 218,8 G/l. Standardní odchylka (SD) měření činí $\pm 5,0$; variační koeficient (CV) vyjádřený v % standardní odchylky činí 2,28. Číselné údaje uvedené na ose pořadnic na obr. 1 znamenají hodnoty počtu buněk v G/l; na ose pořadnic jsou uvedeny odchylky, které odpovídají dvojnásobku hodnoty standardní odchylky (+2 SD, popř. -2 SD) a trojnásobku hodnoty standardní odchylky (+3 SD, popř. -3 SD).

Optimální chyba při počítání leukocytů činí při střední hodnotě 5,08 G/l, $SD = \pm 0,042$, což odpovídá variačnímu koeficientu 0,8 %, viz srovnání s obr. 3.

Hodnoty získané při 20 paralelních měřeních počtu leukocytů jsou znázorněny na obr. 3. Interpretace symbolů $\bar{x}$, SD, CV a číselných hodnot uvedených na ose pořadnic na obr. 3 je stejná jako v případě obr. 1.

Pro srovnání se v případě počítání trombocytů roztok činidla podle vynálezu porovnává s přípravkem známým na trhu pod obchodním názvem THROMBOFIX^R určeným pro počítání trombocytů a v případě počítání leukocytů se porovnává s Türkeho roztokem. THROMBOFIX^R je výrobkem firmy Gödecke, NSR a jeho chemické složení není známo. Pod tímto označením se však běžně vyskytuje na trhu. Srovnávací pokusy se provádějí za použití krve 41 pacientů, přičemž se paralelně stanovuje počet trombocytů a počet leukocytů.

Výsledky se uvádějí v Descartesově souřadnicovém systému, viz srovnání s obr. 2 a 4. Korelace mezi oběma metodami a standardní parametry (a,b) funkce $y = ax + b$, popisující korelace, se určují pomocí počítače (Hewlett-Packard HP-90).

Při počítání trombocytů je korelace (r) = 0,927; lineární funkční závislost mezi oběma metodami se může vyjádřit rovnicí $y = 1,05 x - 0,94$; y = výsledek získaný s roztokem určeným pro počítání trombocytů podle vynálezu; x = výsledek získaný za použití přípravku THROMBOFIX^R, viz obr. 2.

Je možno zjistit, že počet trombocytů získaný s roztokem činidla podle vynálezu, je asi o 5 % vyšší než počet trombocytů, který byl zjištěn ze stejného vzorku za použití přípravku THROMBOFIX^R.

Vzhledem k charakteru stanovení nepřichází naměření vyšších hodnot v úvahu. Získaný rozdíl je možno připsat na vrub skutečnosti, že složka barviva roztoku činidla podle vynálezu má ke kyselým skupinám makromolekul trombocytů podstatně vyšší afinitu a tím má obraz výraznější kontrasty a může se lépe postřehnout. Za použití roztoku činidla podle vynálezu je možno rovněž eliminovat nižší hodnoty, systematicky dosahované při používání známých roztoků barviv.

Nutno uvést, že při použití přípravku THROMBOFIX^R se i při práci s mikroskopem s fázovým kontrastem dosahuje podobně nižších výsledků oproti výsledkům skutečným.

Při počítání leukocytů vykazuje metoda podle vynálezu s Türkeho roztokem korelaci $r = 0,959$. Vztah lze vyjádřit lineární funkcí $y = 0,97 x + 0,23$. To ukazuje na skutečnost,

že mezi oběma postupy neexistuje statisticky významnější rozdíl.

Další podrobnosti výroby a použití roztoku činidla podle vynálezu jsou obsaženy v následujících příkladech. Uvedené příklady však rozsah vynálezu v žádném směru neomezu-
jí.

Účinnost činidla podle vynálezu je znázorněna pomocí výkresů, kde na obr. 1 číselné údaje uvedené na ose pořadnic znamenají údaje počtu buněk v G/l; na ose pořadnic se uvádě-
jí odchylky, které odpovídají dvojnásobku hodnoty standardní odchylky (+2 SD, popř. -2 SD)
a trojnásobku hodnoty standardní odchylky (+3 SD, popř. -3 SD), na obr. 2 na ose pořadnic
se udává počet trombocytů (G/l) zjištěný pomocí roztoku k počítání podle vynálezu; na ose
úseček se udává počet trombocytů (G/l) zjištěný pomocí známého srovnávacího přípravku
THROMBOFIX^R, obr. 3 znázorňuje hodnoty získané z 20 paralelních měření při počítání leuko-
cytů, přičemž číselné údaje uvedené na ose pořadnic označují počet buněk v G/l; CV znamená
variační koeficient, SD standardní odchylku a $\bar{x}$ označuje průměrnou hodnotu, na obr. 4 na
ose pořadnic se udává počet leukocytů (G/l) zjištěný pomocí roztoku k počítání podle vyná-
lezu; na ose úseček se udává počet leukocytů (G/l) zjištěný pomocí Türkeho roztoku.

Příklad 1

Roztok pro počítání

200 ml 0,9% roztoku chloridu sodného připraveného za použití destilované vody se smí-
sí s 5 ml 35% formaldehydu a se 770 ml deionizované destilované vody. Po intenzivním pro-
míchání se v roztoku rozpustí 100 mg toluidinové modři jako barviva. Získaný roztok se
filtruje přes skleněný filtr G-4. Po přidání 25 ml acetonu musí zůstat roztok čirý a pros-
tý částic.

Příklad 2

Stanovení počtu trombocytů a počtu leukocytů v žilní krvi upravené antikoagulačním prostřed-
kem

Krev se účelně upraví ethylendiamintetraoctovou kyselinou jako antikoagulačním prostřed-
kem, neboť v přítomnosti ethylendiamintetraoctové kyseliny nedochází ani k minimálnímu vy-
lučování trombocytů. Po odběru krve se pomocí ethylendiamintetraoctové kyseliny upraví kon-
centrace ethylendiamintetraoctové kyseliny předchozím přikapáním vodného základního rozto-
ku dinatriumethylendiamintetraoctové kyseliny ve zkumavkách z plastické hmoty na 2 mg/ml.
Srážení krve lze rovněž zamezit použitím 3,3% roztoku trinatriumcitrátu v destilované vodě.
Při odběru krve v kanyle z plastické hmoty činí poměr 9 dílů krve ku 1 dílu citrátu.

Provádění postupu:

K 25 μ l venózní krve upravené prostředkem zabraňujícím srážení se ve zkumavce z plas-
tické hmoty přidá 475 μ l počítacího roztoku a směs se ponechá bez míchání v klidu 15 minut
při teplotě místnosti. Počítání trombocytů a leukocytů se musí provést během 6 hodin. Před
počítáním se roztok znovu promíchá, nakape se do Bürkerovy komůrky a ve vlhké komůrce se
nechá sedimentovat 10 minut.

a) Počítání trombocytů

Součet počtu trombocytů napočítaný v 10 obdélnících Bürkerovy komůrky se násobí 2
(při použití ethylendiamintetraoctové kyseliny k zabránění srážení), popřípadě 2,2 (při
použití citrátu k zabránění srážení). Počet trombocytů se získá v G/l.

b) Počítání leukocytů

Počet leukocytů, zjištěný ve čtyřech, třemi čarami vymezených čtvercích, se dělí 18
(nebo se násobí 0,055) v případě použití citrátu k zabránění srážení, popřípadě se dělí 20
(nebo násobí 0,05), v případě použití ethylendiamintetraoctové kyseliny jako prostředku

k zamezení srážení. Počet leukocytů se získá v G/l.

Příklad 3

Stanovení počtu trombocytů a počtu leukocytů z kapilární krve

Dezinfikovaná špička prstu nebo pata se napíchne, první kapka krve se otře a potom se do pipety nasaje 25 μ l krve pomocí stříčky z plastické hmoty (typ: například Finnpiquette, Gilson nebo Eppendorf atd.). Toto množství krve se odměří do zkumavky z plastické hmoty, která obsahuje 25 μ l roztoku ethylendiamintetraoctové kyseliny o koncentraci 2 mg/ml. Poté se dobře promísí s antikoagulačním prostředkem. Po přidání 450 μ l počítacího roztoku a po důkladném protřepání se roztok ponechá v klidu při teplotě místnosti alespoň 15 minut a po opětovném promíchání se nakape do Bürkerovy komůrky a ve vlhké komůrce se ponechá 10 minut sedimentovat.

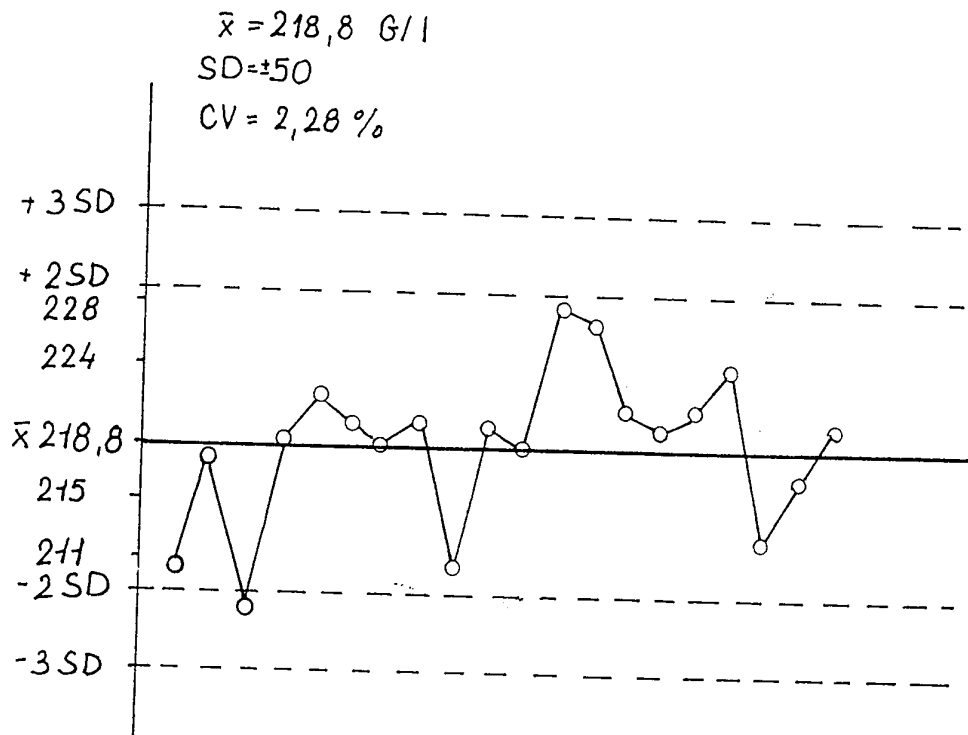
Počet trombocytů a počet leukocytů se určuje podobným způsobem jako v případě krve upravené prostředkem proti srážení. Při stanovení počtu trombocytů činí faktor, kterým se násobí, 2. Při počítání leukocytů se musí získaná hodnota dělit 20.

Příklad 4

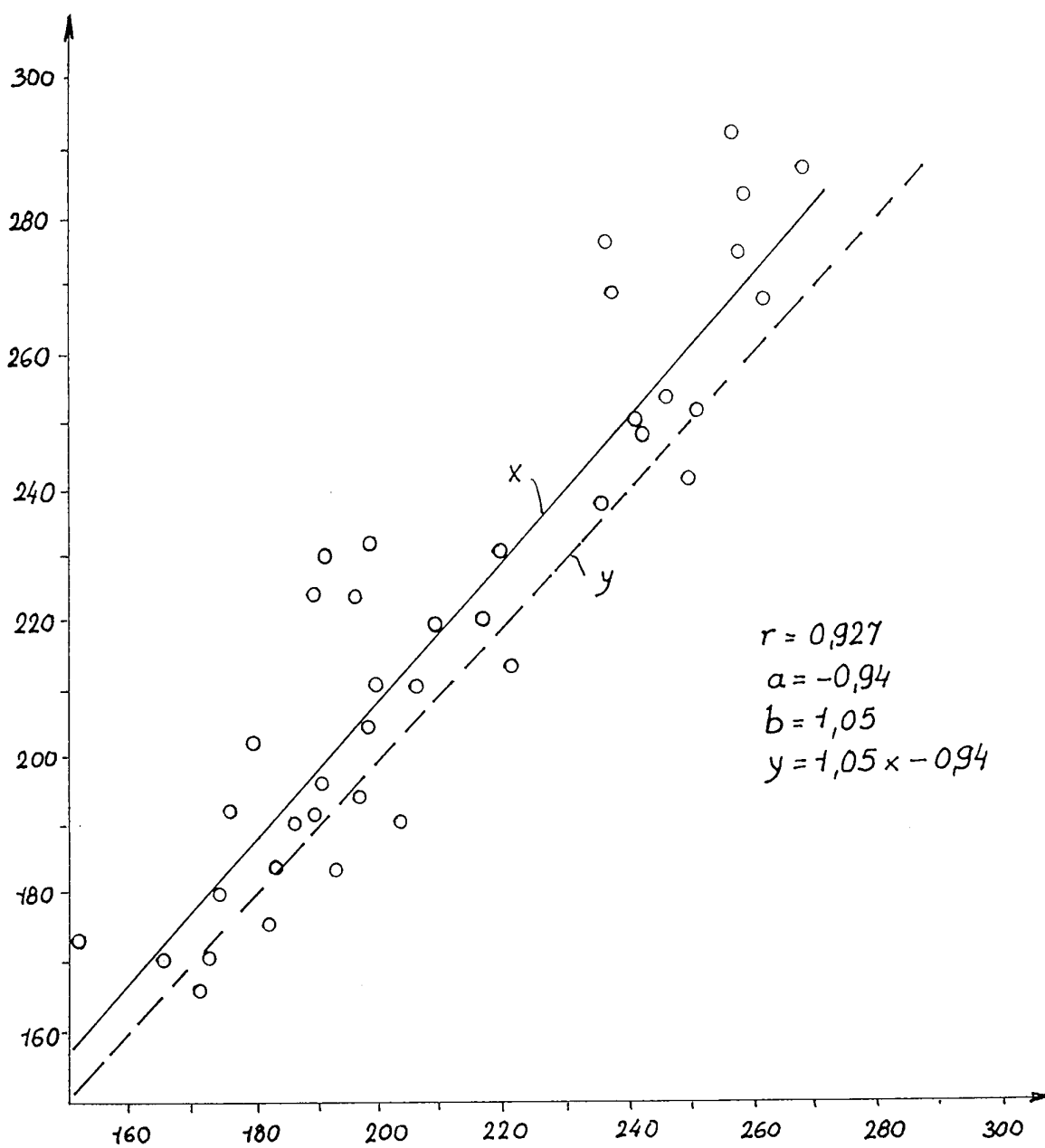
Postupuje se jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že se místo formaldehydu použije 80 g 25% glutaraldehydu.

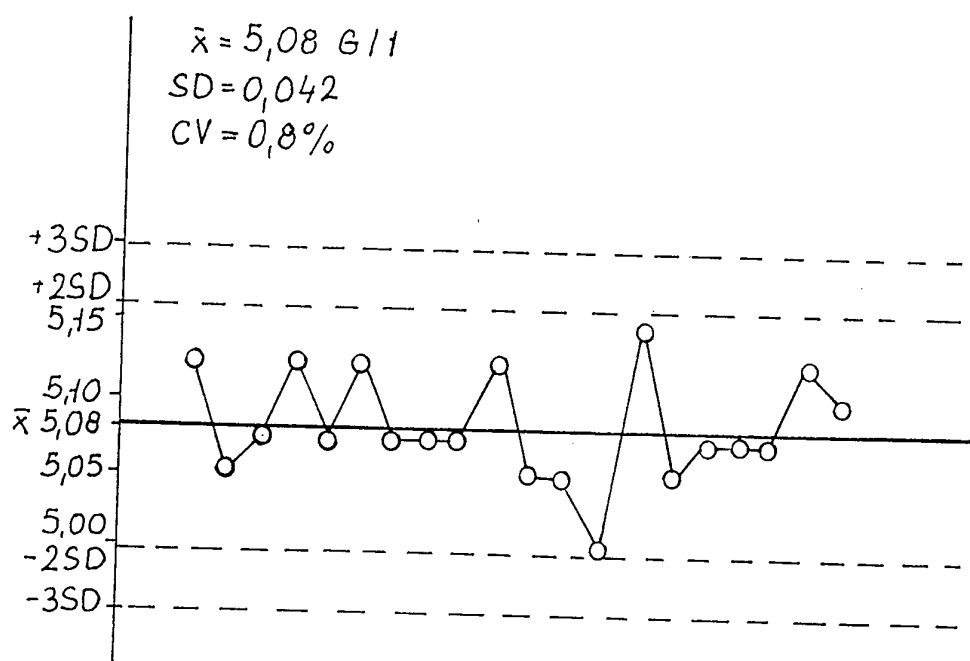
P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Činidlo k současnému stanovení počtu trombocytů a leukocytů normální mikroskopickou cestou za použití světelného mikroskopu, vyznačující se tím, že obsahuje 0,1 až 5 dílů hmot. acetonu, 0,05 až 2,0 dílu hmot. formaldehydu a/nebo glutaraldehydu, 0,001 až 0,1 dílu hmot. thiazinového barviva, například toluidinové modři, 0,1 až 2,0 dílu hmot. minerální soli, například chloridu sodného a do 100 dílů hmot. vody.

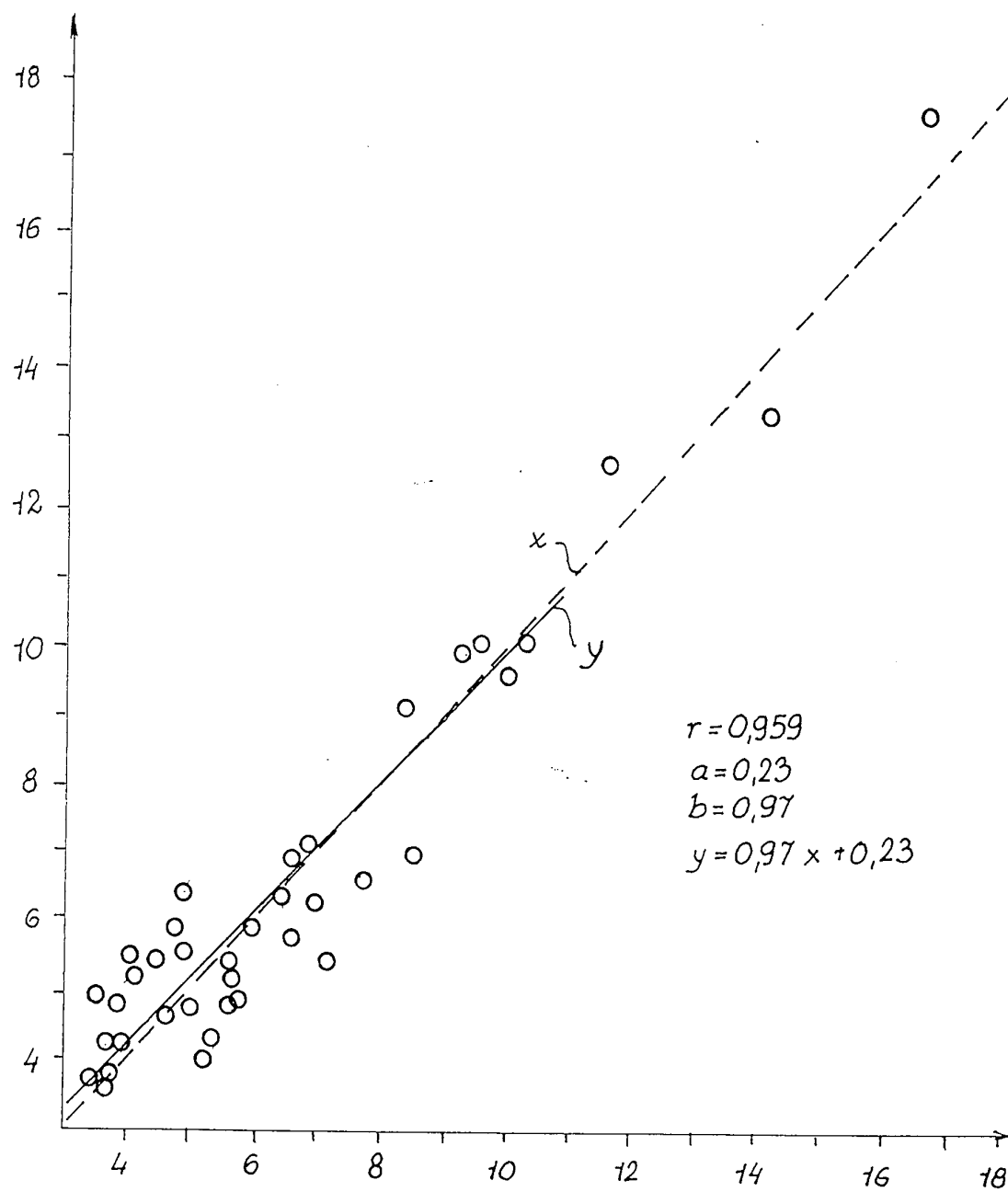


Obr. 1

Obt. 2



Obr. 3



Obr. 4