



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU**
UTLÄGGNINGSSKRIFT 77938

C Pat. III 1989
(45) Patent No. 10 of 1989

(51) Kv.lk./Int.Cl.⁴ G 01 N 33/48, 1/30

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus - Patentansökning	843429
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	31.08.84
(23) Alkupäivä - Giltighetsdag	31.08.84
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	03.03.85
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.01.89
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus - Begärd prioritet	02.09.83
Unkari-Ungern(HU) 3060/83 Toteennäytetty-Styrkt	

- (71) Reanal Finomvegyszergyar, 53, Telepes u., Budapest, Unkari-Ungern(HU)
- (72) Laszlo Muszbek, Debrecen, Roza Adany, Debrecen, Ilona Harsanyi, Budapest, Gabriella Zajka, Budapest, Unkari-Ungern(HU)
- (74) Seppo Laine Ky
- (54) Reagenssi trombosyytti- ja leukosyyttimäärän määrittämiseksi - Reagens för bestämning av antalet trombocyter och leukocyter

(57) Tiivistelmä

Keksinnön kohteena on reagenssi trombosyytti- ja leukosyyttiluvun määrittämiseksi samanaikaisesti normaalin valomikroskoopin avulla. Reagenssi sisältää keksinnön mukaan 0,1 - 5 paino-osaa acetonia, 0,05 - 2,0 paino-osaa formaldehydiä tai glutaarialdehydiä, 0,001 - 0,1 paino-osaa tiatsiiniväriainetta - edullisesti toluidiinisinistä, - 0,1 - 2,0 paino-osaa mineraalisuolaa, edullisesti natriumkloridia ja 100 paino-osaan asti vettä.

(57) Sammandrag

Uppfinningen avser en reagens för bestämning samtidigt av trombocyt- och leukocyttalen med hjälp av ett vanligt ljusmikroskop. Reagensen innehåller enligt uppfinningen 0,1 - 5 viktdelar aceton, 0,05 - 2,0 viktdelar formaldehyd eller glutaraldehyd, 0,001 - 0,1 viktdelar tiazinfärgämne - företrädesvis toluidinblått, - 0,1 - 2,0 viktdelar mineralsalt, företrädesvis natriumklorid och resten (till 100 viktdelar) vatten.

Reagenssi trombosyytti- ja leukosyyttimäärän määrittämiseksi

Keksinnön kohteena on reagenssi trombosyytti- ja leukosyyttimäärän määrittämiseksi ja menetelmä sen valmistamiseksi.

Keksinnön kohteena on trombosyytti- ja leukosyyttimäärän samanaikaista määrittystä varten täysverestä normaalin valomikroskoopin avulla sopiva, asetonia ja formaldehydiä tai glutaarialdehydiä, mineraalisuoloja ja väriaineita sisältävä reagenssi.

On tunnettua, että trombosyytti- ja leukosyyttimäärä kuuluu kliinisten laboratorioiden standardimenetelmien piiriin. Trombosyyttilaskenta voidaan suorittaa erilaisten menetelmien mukaisesti:

- 1) Elektroninen hiukkaslaskenta trombosyyttilaskentaa varten kehitetyillä automaateilla. Vaikka tämä menetelmä on nopea ja yksinkertainen, on hankittava hyvin kalliita instrumentteja. Tämä menetelmä ei sovi mikroskooppisen määrittelyn korvikkeeksi. Tämän menetelmän toistettavuus on myös huonompi kuin mikroskooppisen laskimen.
- 2) Trombosyyttilaskenta faasikontrastimikroskoopin avulla käyttämällä kokaiini- tai novokaiinipitoista liuosta tai jotain muuta trombosyyttilaskentaliuosta. Tämän menetelmä suorittamiseksi on faasikontrastimikroskooppi välttämätön. Eräs toinen olennainen haitta on se, että tämä menetelmä on kokeita suorittavalle henkilökunnalle väsyttävä, rasittava ja silmiä kuluttava, etenkin kun koemäärä on suuri.
- 3) Trombosyyttimäärän määrittely värjäysmenetelmällä. Tämä menetelmä on yksinkertainen ja se voidaan suorittaa mikroskoopin avulla. Tällä hetkellä käytettyjen menetelmien mukaisesti käytetään väriaineena kristallivio-

lettia (genzianvioletti; kemiallinen nimi heksametyyli-p-rosaliniliini-hydrokloridi). Näiden menetelmien suhteen esitetään se oikeutettu väite, että nämä vääristävät verrattuna faasikontrastimääritykseen, koska kaikki trombosyytit eivät värjäydy hyvin näkyvällä tavalla.

Hematologisessa diagnostiikassa on leukosyyttilaskenta laajimmin käytetty menetelmä. Unkarilaisessa farmakopeassa (Ph.Hg.VI) esitetty turkinliuos on tähän tarkoitukseen yleisimmin sopiva ja se on osoittautunut hyväksi, mutta se ei sovellu kuitenkaan trombosyyttimäärän määrittämiseksi. Tämä on tärkeä haitta, koska molempien laajasti käytettyjen laboratoriokokeiden yhteinen suoritus olisi hyvin usein tarpeen. Trombosyytti- ja leukosyyttimäärän määrittämiseksi täysverestä normaalin valomikroskoopin avulla tarvitaan väriaineliuos, joka

- a) saa aikaan erytrosyyttisen täydellisen hemolyysin vähentämättä trombosyytti- ja leukosyyttimäärää;
- b) kiinnittää sekä trombosyytit että leukosyytit; ja
- c) sisältää sellaisen väriaineen, joka ei sitoudu yllä mainittuihin muotokappaleisiin suurella affiniteetillä ja kiinnittää nämä tällä tavalla normaalissa valossa.

Liuos, joka täyttää mainitut ensimmäiset kaksi vaatimusta, on tosin tunnettu [Scand. J. Clin. Invest. 33, 121 (1974)], mutta trombosyyttilaskenta voidaan suorittaa ainoastaan käyttämällä faasikontrastimikroskooppia.

Keksinnön tavoitteena on väriaineliuoksen valmistus, jolla voidaan suorittaa trombosyytti- ja leukosyyttilaskennan määrittäminen täysverestä käyttämällä normaalia valomikroskooppia ja eliminoimalla tunnettujen reagenssien yllä mainitut haitat.

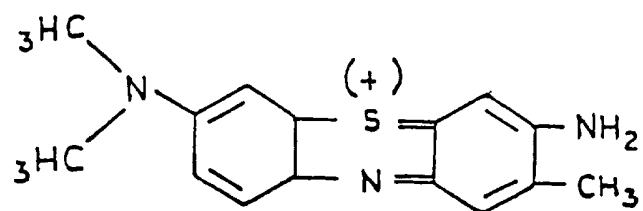
Keksintö perustuu siihen yllättävään havaintoon, että yhdistämällä hemolysoiva-kiinnittävä liuos suureen affiniteetin

omaavan emäksisen väriaineen kanssa saadaan trombosyytti- ja leukosyyttimäärän määrittämiseksi normaalia valomikroskooppia käyttäen sopiva reagenssiluos. Yllä olevat molemmat edellytykset voidaan täyttää siinä tapauksessa, mikäli hemolysoiva-kiinnittävä liuos ei ole yhteensopimaton väriaineen kanssa, so. ei muodosta sakkaa.

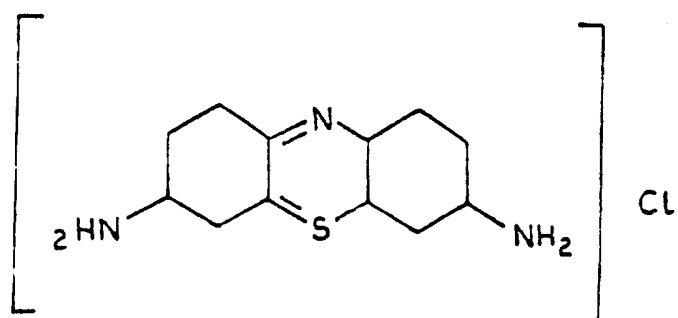
Mikroskooppisten sakkojen muodostus tulee välttää; tällaisilla sakoilla voi olla nimittäin trombosyyttien luonne ja ne vääristävät siten määrityksen tuloksen.

Tähän asti käytetyt kresyylliviolettityyppiset väriaineliuokset vastaavat vain osittain yllä olevia vaatimuksia; laskentaliuoksen kresyyllivioletti-väriainekomponenteilla on nimittäin heikosti emäksinen luonne; tästä syystä trombosyytit värjätään vain heikosti ja leukosyyttejä ei esitetä selvästi.

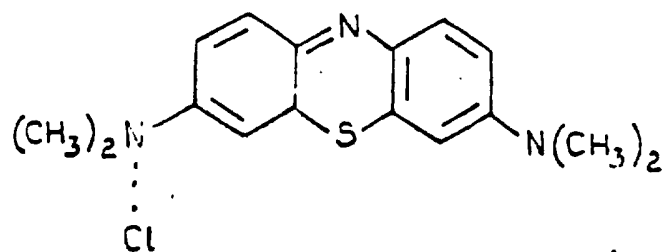
Keksinnön mukaisesti havaittiin, että nk. tiatsiiniväriaineet soveltuvat erinomaisesti tähän tarkoitukseen. Tiatsiinityypisille väriaineille on tunnusomaista kahden kromoforiryhmän läsnäolo. Tiatsiinityypisiä yhdisteitä on käytetty lääketieteellisessä käytännössä jo eri aloilla (esim. bakteerien värjäys histokemiassa), ammatti- ja patenttikirjallisuus ei kuitenkaan sisällä mitään viitettä keksinnön mukaiseen havaintoon. Tämän yhdisteryhmän tärkeimpiä edustajia on toluidiinisininen (kaava I), tioniini (kaava II) ja metyleenisininen (kaava III).



(I)



(II)



(III)

Keksinnön kohteena on reagenssi trombosyytti- ja leukosyyttimäärän määrittämiseksi samanaikaisesti normaalin valomikroskoopin avulla, tunnettu siitä, että se sisältää 0,1 - 5 paino-osaa asetonia, 0,05 - 2,0 paino-osaa formaldehydiä ja/tai glutaarialdehydiä, 0,001 - 0,1 paino-osaa tiatsiini-väriainetta - edullisesti toluidiinisinistä - 0,1 - 2,0 paino-osaa mineraalisuolaa, edullisesti natriumkloridia ja 100 paino-osaan asti vettä.

Erään keksinnön edullisen suoritusmuodon mukaisesti reagenssi koostuu 0,1 - 5,0 paino-osasta asetonia, 0,05 - 2,0 paino-osasta formaldehydiä, 0,001 - 0,1 paino-osasta toluidiinisinistä ja 0,1 - 2 paino-osasta natriumkloridia.

Keksinnön mukaisesti käytettyjen väriaineiden erityisenä etuna on, että niillä on myös trombosyyttien ja leukosyyttien happamien makromolekyylien suhteen hyvin suuri affiniteetti ja siten ne saavat aikaan erittäin intensiivisen ja huomattavan visualisoinnin.

Keksinnön mukaisten reagenssien tärkeimpänä etuna on, että ne ylittävät olennaisesti tunnettujen reagenssien herkkyyden. Tämä tosiasia voidaan osoittaa seuraavilla kokeilla:

Tuntemattoman trombosyytti- ja leukosyyttimäärän omaavista näytteistä saadut tulokset saadaan kahdenkymmenen peräkkäisen trombosyytti- ja leukosyyttimäärän määrittämisessä kuluessa. Solujen laskumenetelmän tarkkuus on silloin tyydyttävä, kun vakio poikkeama on alle 10%. Trombosyyttimäärän ollessa 218,8 G/l on SD = $\pm 5,0$ ja käytettäessä näitä arvoja on variaatiokerroin (vakiona poikkeamana %:ssa ilmaistuna) 2,28 (kuvio 1). Mainittakoon vielä, että G/l merkitsee SI-järjestelmässä esitettyä trombosyytti- ja leukosyyttimäärää [$\text{G/l} = \text{giga [solumäärä]}/1 = \text{solumäärä} \times 10^9$] (kuvio 1).

Leukosyyttilaskennan optimaalinen virhe on keskimäärin 5,08 G/l, SD = $\pm 0,042$, mikä vastaa 0,8%:n variaatiokerrointa (kuvio 3).

Vertailua varten keksinnön mukaista reagenssiliuosta verrataan trombosyyttilaskennassa nimellä THROMBOFIX^R markkinoilla olevaan trombosyyttilaskentavalmisteeseen, jota valmistaa firma Gödecke, ja leukosyyttilaskennassa turkinliuoksen (Türklösung) kanssa. Vertailukokeet suoritetaan 41 potilaan verellä rinnakkaisissa trombosyytti- ja leukosyyttimäärän määrityksissä.

Tulokset on esitetty Descartesin koordinaattijärjestelmässä (kuvat 1 ja 2). Molempien kahden menetelmän välinen korrelaatio ja korrelaatiota kuvaavan funktion $y = ax + b$ vakiot parametrit (a , b) määritetään Hewlett-Packard HP-90-laskukoneella.

Trombosyyttilaskennassa on korrelaatio (r) = 0,927; molempien menetelmien välinen lineaarinen funktionaalinen yhteys voidaan esittää yhtälöllä $y = 1,05 - 0,94x$; y = keksinnön mukaisella trombosyyttilaskentaliuoksella saatu tulos; x = THROMBOFIX^R:llä saatu tulos (kuva 2).

Voidaan todeta, että keksinnön mukaista reagenssiliuosta käyttämällä saatu trombosyyttimäärä on noin 5% suurempi kuin samasta kokeesta THROMBOFIX^R:ä käyttämällä saatu trombosyyttimäärä.

Ottaen huomioon määrityksen luonteen ylimittaus ei tule kysymykseen. Saatu ero voidaan laskea vain sen tosiasian ansioksi, että keksinnön mukaisen reagenssiliuoksen väriainekomponentilla on olennaisesti suurempi affiniteetti trombosyyttien makromolekyylien happamien ryhmien suhteen, kuvassa on tästä syystä vahvemmat kontrastit ja se voidaan havaita paremmin. Käyttämällä keksinnön mukaista reagenssiliuosta voidaan siis eliminoida tunnetuilla väriaineliuoksilla saatu systemaattinen alimittaus.

Mainittakoon, että THROMBOFIX^R:llä oli myös sama alimittaus käytettäessä faasikontrastimikroskooppia.

Leukosyyttilaskennassa oli keksinnön mukaisella menetelmällä turkinliuoksen (Türklösung) kanssa korrelaatio $r = 0,959$;

yhteys voidaan esittää lineaarisella funktiolla $y = 0,97 x + 0,23$. Tämä viittaa siihen, että molempien menetelmien välillä ei ole merkittävää eroa.

Keksinnön mukaisen reagenssiliuoksen muita valmistuksen ja käytön yksityiskohtia on esitetty seuraavissa esimerkeissä rajoittamatta kuitenkaan suojan piiriä näihin esimerkkeihin.

Esimerkki 1

Laskentaliuos

200 ml tislatus veden kanssa muodostettua 0,9%:sta natriumkloridiliuosta, 5 ml 35%:sta formaldehydiä ja 770 ml ioni-vaihdettua tislattua vettä sekoitetaan keskenään. Voimakkaan sekoittamisen jälkeen liuotetaan liuokseen 100 mg toluidiinisinistä. Saatua liuos suodatetaan G-4 lasisuodattimen läpi. Sen jälkeen, kun on lisätty 25 ml asetonia, on liuoksen oltava kirkas ja hiukkasista vapaa.

Esimerkki 2

Antikoaguloitumisaineella käsitellyn laskimoveren trombosyytti- ja leukosyyttimäärän määrittäminen

Veri käsitellään tarkoituksenmukaisesti käyttämällä antikoaguloitumisaineena etyleenidiamiinitetraetikkahappoa, koska etyleenidiamiinitetraetikkahapon läsnäollessa ei tapahdu edes minimaalista trombosyyttien saostumista. Kun veri on otettu etyleenidiamiinitetraetikkahappoon säädetään etyleenidiamiinitetraetikkahappokonsentraatio kuivattamalla ensin vesipitoinen dinatriumetyleenidiamiinitetraetikkahappo-kantaliuos muoviputkessa 2 mg/ml:aan. Veren koaguloituminen voidaan estää myös käyttämällä tislatus veden kanssa muodostettua 3,3%:sta trinatriumsitraattiliuosta; otettaessa verta muovikanyyliin on suhteena 9 osaa verta sitraatin 1 osaa kohden.

Menetelmän suorittaminen

25 µl:aan koaguloitumisesta estettyä laskimoverta lisätään muovinäyteputkessa 475 µl laskentaliuosta ja seoksen annetaan seistä sekoittamatta huoneenlämpötilassa 15 minuuttia. Trombosyyttien ja leukosyyttien laskeminen on suoritettava 6 tunnin kuluessa. Ennen laskemista liuosta sekoitetaan jälleen, lisätään tipoittain Bürker-kammioon ja annetaan laskeutua kosteassa kammiossa 10 minuutin ajan.

a) Trombosyyttilaskenta

Bürker-kammion 10 suorakulmassa lasketun trombosyyttimäärän summa kerrotaan kahdella (koaguloituminen estetty etyleenidiamiinitetraetikkahapolla) tai vastaavasti luvulla 2,2 (koaguloituminen estetty sitraatilla). Trombosyyttimäärä saadaan G/l:na.

b) Leukosyyttilaskenta

Neljässä, kolmella viivalla rajoitetussa neliössä löydettyjen leukosyyttien määrä jaetaan luvulla 18 (tai kerrotaan luvulla 0,055) kun koaguloituminen on estetty sitraatilla tai vastaavasti jaetaan luvulla 20 (tai kerrotaan luvulla 0,05), mikäli koaguloituminen on estetty etyleenidiamiinitetraetikkahapolla. Leukosyyttimäärä saadaan G/l:na.

Esimerkki 3

Trombosyytti- ja leukosyyttimäärän määrittäminen hiussuoniverestä

Desinfioituun sormenpäähän tai kantapäähän pistetään, ensimmäinen veripisara pyyhittää pois ja 25 µl verta imetään muoviruiskun pipettiin (tyyppi: esim. Finnpiipette, Gilson tai Eppendorf jne.) Tämä verimäärä punnitaan muoviputkeen, joka sisältää 25 µl 2 mg/ml:n etyleenidiamiinitetraetikkahappoliuosta, ja sekoitetaan hyvin antikoaguloitumisaineen kanssa. Sen jälkeen kun on lisätty 450 µl laskentaliuosta ja ravisteltu perusteellisesti, liuos jätetään seisomaan huoneenläm-

pötilassa vähintään 15 minuutiksi, sekoitetaan uudelleen ja laitetaan tipoitain Bürker-kammioon ja annetaan laskeutua kosteassa kammiossa 10 minuutin ajan.

Trombosyyttimäärä ja leukosyyttimäärä määritetään samalla tavoin kuin antikoaguloitumisaineella käsitellyn veren yhteydessä; trombosyyttilaskennassa on kerrontatekijänä 2; leukosyyttilaskennassa on jaettava luvulla 20.

Esimerkki 4

Menetellään esimerkissä 1 esitetyllä tavalla sillä erotuksella, että formaldehydin sijasta käytetään 80 g 25%:sta glutaarialdehydiä.

Patenttivaatimukset:

1. Reagenssi trombosyytti- ja leukosyyttimäärän määrittämiseksi samanaikaisesti valomikroskoopin avulla, t u n n e t t u siitä, että se sisältää 0,1 - 5 paino-osaa asetonia, 0,05 - 2,0 paino-osaa formaldehydiä ja/tai glutaarialdehydiä, 0,001 - 0,1 paino-osaa tiatsiiniväriainetta - edullisesti toluidiinisinistä - 0,1 - 2,0 paino-osaa mineraalisuolaa, edullisesti natriumkloridia ja 100 paino-osaan asti vettä.

2. Menetelmä trombosyytti- ja leukosyyttimäärän määrittämiseksi samanaikaisesti normaalin valomikroskoopin avulla soveltuvan reagenssin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että sekoitetaan 0,1 - 5 paino-osaa asetonia, 0,05 - 2,0 paino-osaa formaldehydiä tai glutaarialdehydiä, 0,001 - 0,1 paino-osaa tiatsiiniväriainetta - edullisesti toluidiinisinistä - ja 0,1 - 2,0 paino-osaa mineraalisuolaa 100 paino-osaa kohden tarvittavan vesimäärän kanssa.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sekoitetaan keskenään 200 ml 0,9%:sta natriumkloridiliuosta, 25 ml asetonia, 5 ml 35%:sta formaldehydiä, 770 ml ionivaihdettua tislattua vettä ja 100 mg toluidiinisinistä.

Patentkrav:

1. Reagens för samtidig bestämning av antalet trombocyter och leukocyter medelst normalt ljusmikroskop, k ä n n e t e c k n a d av att den innehåller 0,1 - 5 viktdelar aceton, 0,05 - 2,0 viktdelar formaldehyd och/eller glutaraldehyd, 0,001 - 0,1 viktdelar av ett tiazinfärgämne, företrädesvis toluidinblått, 0,1 - 2,0 viktdelar av ett mineralsalt, företrädesvis natriumklorid, och upptill 100 viktdelar vatten.

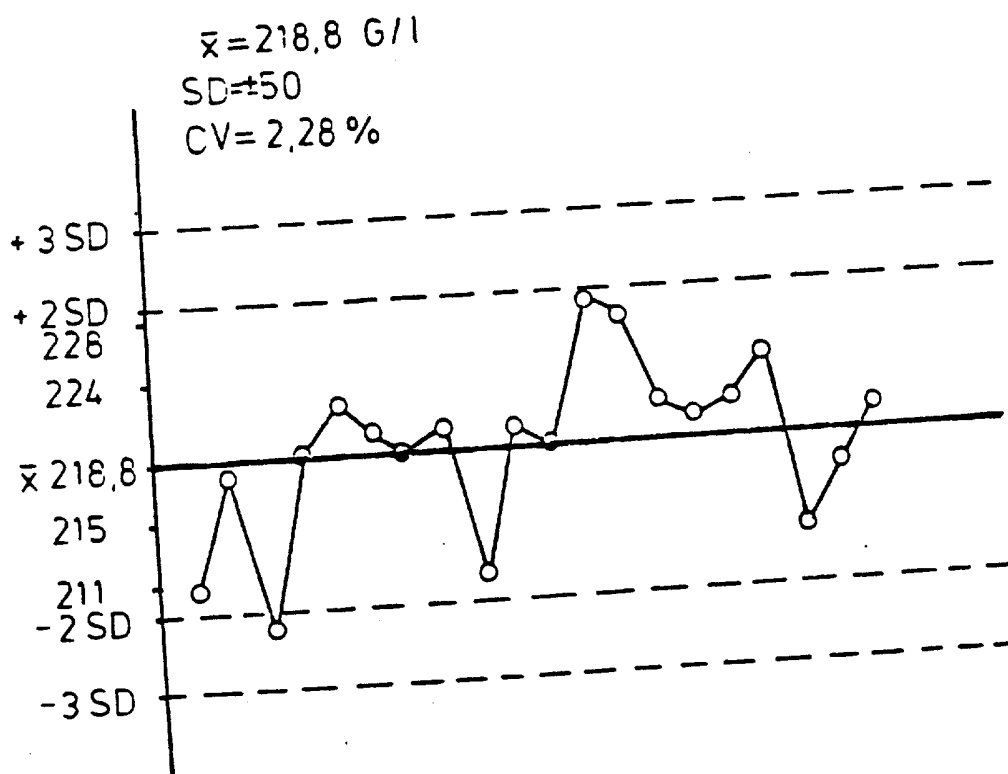
2. Förfarande för framställning av en reagens som lämpar sig för samtidig bestämning av antalet trombocyter och leukocyter medelst normalt ljusmikroskop, k ä n n e t e c k n a t av att man blandar 0,1 - 5 viktdelar aceton, 0,05 - 2,0 viktdelar formaldehyd eller glutaraldehyd, 0,001 - 0,1 viktdelar av ett tiazinfärgämne, företrädesvis toluidinblått, och 0,1 - 2,0 viktdelar av ett mineralsalt med den för 100 viktdelar behövliga mängden vatten.

3. Förfarande enligt patentkrav 2, k ä n n e t e c k n a t av att man blandar med varandra 200 ml 0,9 procentig natriumkloridlösning, 25 ml aceton, 5 ml 35 procentig formaldehyd, 770 ml jonbytt destillerat vatten och 100 mg toluidinblått.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

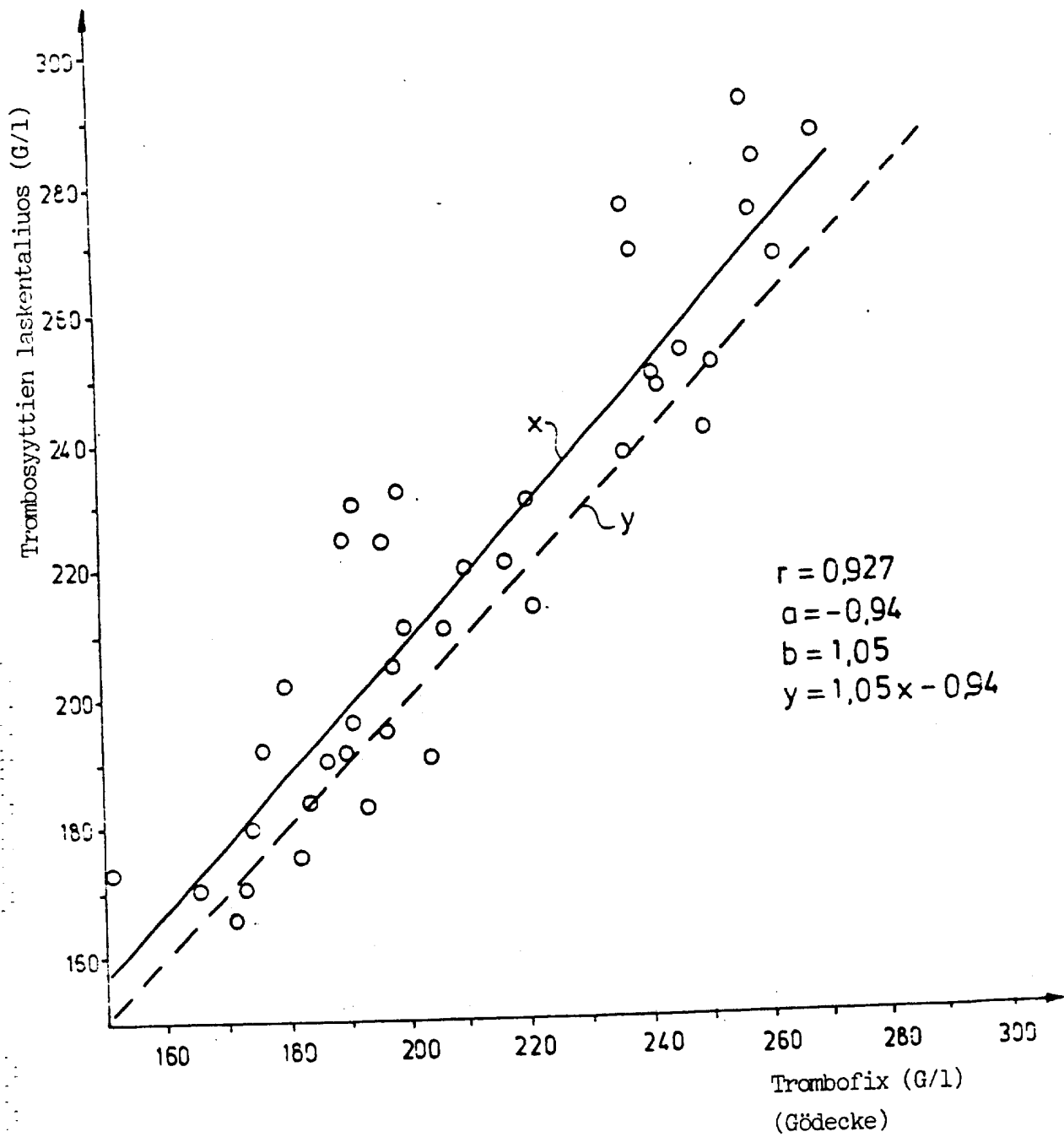
-

77938



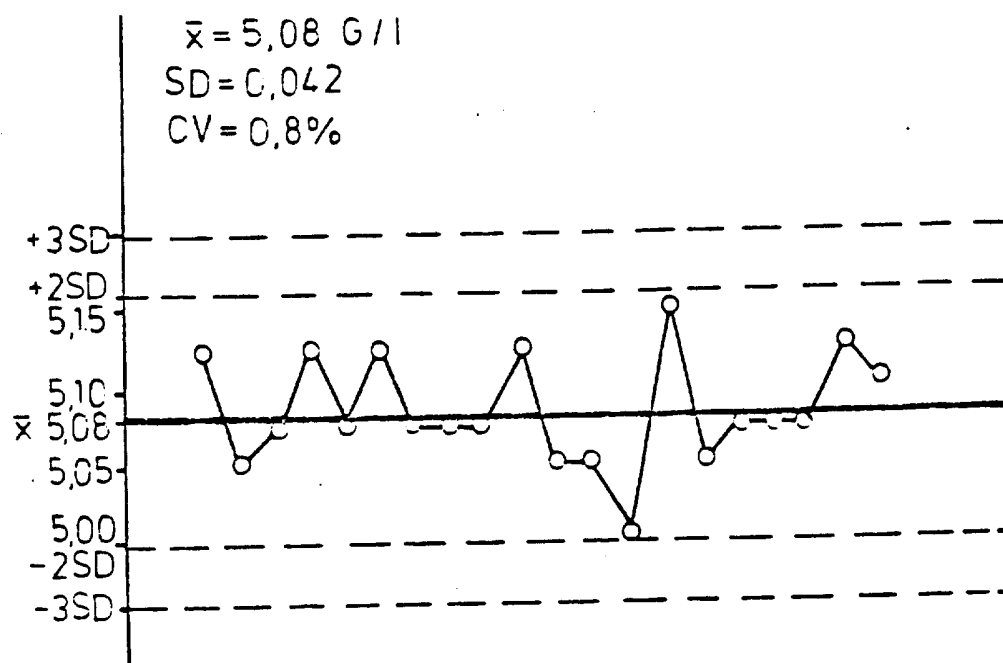
Kuvio 1

77938



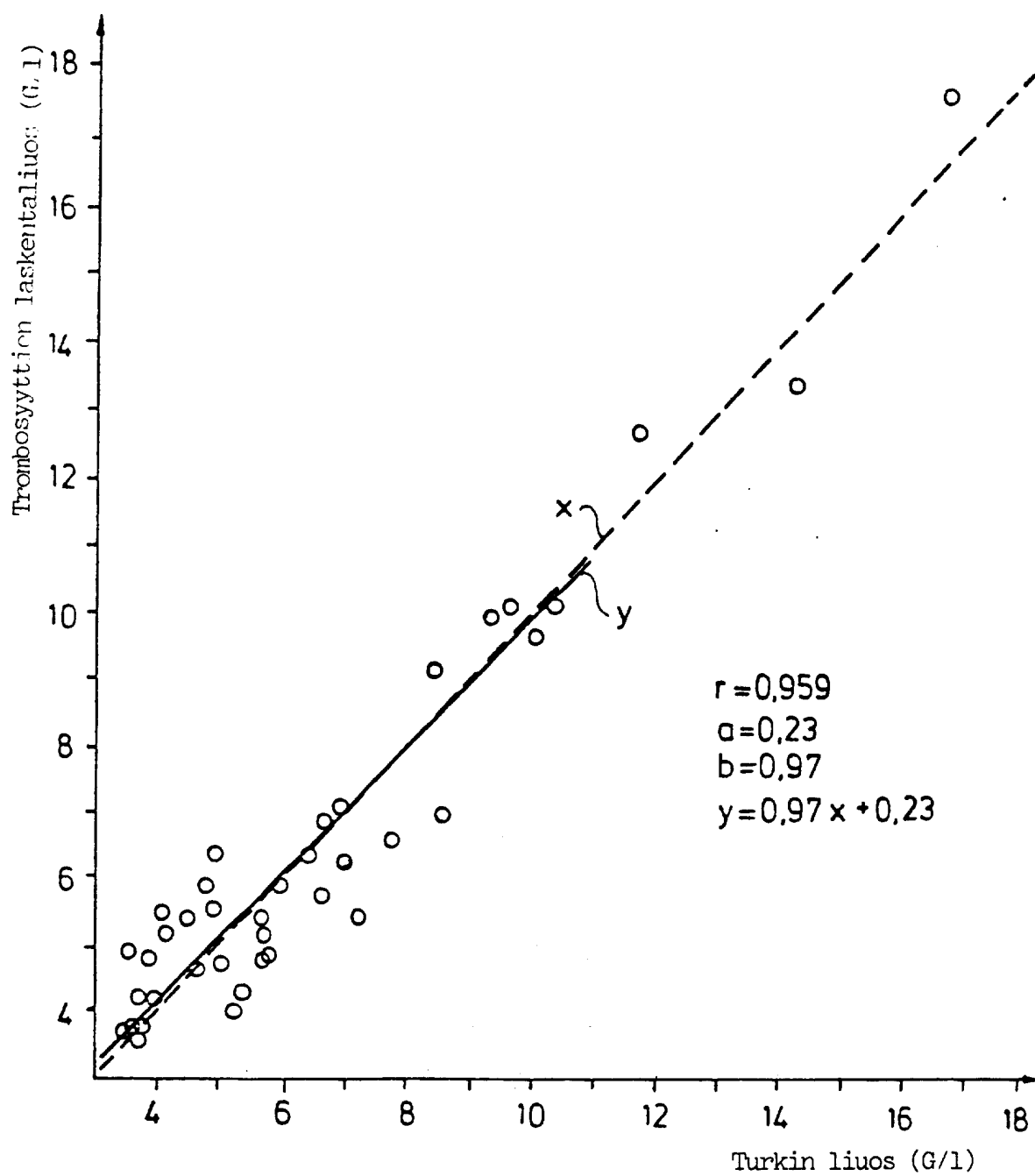
Kuvio 2

77938



Kuvio 3

77938



Kuvio 4