



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **321924**

(13) **B1**

(51) Int Cl.

*G01N 33/50 (2006.01)*

*G01N 33/49 (2006.01)*

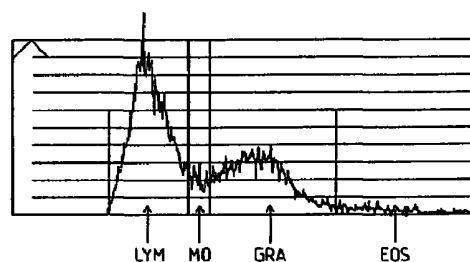
*G01N 33/72 (2006.01)*

### Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19993762	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	
(22)	Inng.dag	1999.08.03	(85)	Videreføringsdag	
(24)	Løpedag	1999.08.03	(30)	Prioritet	1998.08.04, FR, 9810010
(41)	Alm.tilgj	2000.02.07			
(45)	Meddelt	2006.07.24			
(73)	Innehaver	ABX , BP 7290, F-34184 Montpellier Cédex 4, FR			
(72)	Oppfinner	Henri Champseix, Montferrier-sur-Lez, FR Sylvie Veriac, Les Jardins de l'Alhambra 7, 511, rue Mr Teste, F-34000 Montpellier, FR			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS , Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO, NO			

(54)	Benevnelse	<b>Reagens for bestemmelse av hemoglobin og bestemmelse av leukocytter i en blodprøve</b>		
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A1-430750, EP-A1-660113		
(57)	Sammendrag			

Oppfinnelsen vedrører et reagens for bestemmelse av hemoglobin for bestemmelse av leukocytter i en blodprøve. Reagenset omfatter minst ett overflateaktivt middel av kationisk type, en forbindelse av glykosidtype, og mere spesielt et saponin; minst ett uorganisk salt og/eller et osmotisk og/eller leuko-beskyttende middel; samt en organisk og/eller uorganisk buffer som kan justere reagensets pH selektivt, enten til en i det vesentlige nøytral verdi (pH 5 - 8) eller til en basisk verdi (pH 8 -12). Reagenset er anvendbart for hematologiske analyser innen human- og veterinærmedisinen.



Oppfinnelsen vedrører et reagens for bestemmelse av hemoglobin og bestemmelse av leukocytter i en blodprøve som angitt i krav 1.

5 Bestemmelse av konsentrasjonen av hemoglobinet og bestemmelse av leukocytter, spesielt spesifikke leukocyt subpopulasjoner, er av spesiell viktighet ved diagnose av spesifikke patologiske tilstander, både innen human- og veterinærmedisinen.

10

Hemoglobin er et kromo-protein som inneholdes i de røde blodlegemer (eller erythrocytter) i blodet.

Bestemmelse av konsentrasjonen av hemoglobin krever således  
15 anvendelse av et cellulært lysereagens som kan utføre lyse av erythrocyttene eller de røde blodlegemer, i den hensikt å frigi hemoglobinet slik at sistnevnte kan bestemmes.

For dette formål er det kjent å anvende reagenser som inneholder cyanidioner, som kan utføre lysisen av erythrocyttene og transformere hemoglobinet til en stabil kromogen forbindelse, dette for å tillate bestemmelse av hemoglobin ved  
20 hjelp av kolorimetrisk måling. Et reagens av denne type er spesielt beskrevet i US patent nr. 3 874 852. Hovedlemmen ved dette reagens er at det benytter cyanid. I tillegg  
25 er det med dette reagens ikke mulig å identifisere og kvantifisere leukocyt subpopulasjoner som er inneholdt i blodprøven som skal analyseres.

30 Fra EP-A1-430 750 og EP-A2-660113 er det også kjent reagenser for å analysere leukocytter i en blodprøve, men disse har en annen sammensetning enn reagenset ifølge foreliggende oppfinnelse.

35 I realiteten er bestemmelsen av leukocyt subpopulasjoner, spesielt lymfocytter, monocytter, neutrofiler og eosinofiler, av største viktighet for identifikasjon av spesifikke patogene tilstander.

Forskjellige reagenser som ikke inneholder cyanid, er allerede foreslått innen teknikkens stand for bestemmelse av leukocytter i en blodprøve.

5

Eksempler på reagenser av denne type er eksempelvis beskrevet i EP 0 325 710.

Selv om disse reagenser har den fordel at de ikke anvender cyanid, så har de den ulempe at de ikke kan tillate nøyaktig identifikasjon og kvantifisering av leukocyt sub-populasjoner i blodet.

Således gjør reagentet i henhold til EP 0 325 710 det mulig eksempelvis å bestemme eosinofiler som er tilstede i en blodprøve, imidlertid uten å gjøre det mulig å identifisere nøyaktig hver av de andre leukocyt sub-populasjoner.

I tillegg beskriver EP 0 424 871 reagenser som tillater differensiering av leukocyt sub-populasjoner. Imdlertid oppstår det enkelte ganger visse vanskeligheter med disse reagenser med hensyn til å overkomme membranresistensen som er tilstede i humanpatologi og i veterinærbiologi.

Hensikten med foreliggende oppfinnelse er spesielt å eliminere de ovenfor nevnte ulemper.

Mer spesielt er hensikten med oppfinnelsen å tilveiebringe et hematologisk analysereagens for bestemmelse av hemoglobin og bestemmelse av leukocytter i en blodprøve, og som spesielt tillater lyse av erytrocyttene eller de røde blodlegemer, så vel som å bestemme hemoglobin uten anvendelse av cyanidforbindelser.

Hensikten med oppfinnelsen er også å tilveiebringe et reagens av denne type som gjør det mulig å kvantifisere de totale leukocytter eller hvite blodlegemer, for å identifisere

re i det minste én leukocyt sub-populasjon, samt å kvantifisere minst én leukocyt sub-populasjon.

5 Hensikten med oppfinnelsen er også å tilveiebringe et reagens av denne type som kan anvendes innen human- og veterinærmedisinen.

10 I tillegg er hensikten med oppfinnelsen å tilveiebringe et reagens av denne type som kan eliminere analyseproblemene som er assosiert med membranresistensen som oppstår ved humanpatologi og i veterinærbiologi.

15 For dette formål, og i henhold til oppfinnelsen er det foreslått et reagens av den ovenfor beskrevne type, som omfatter:

- minst ett overflateaktivt middel av kationisk type,
- en forbindelse av glykosidtype og spesielt et saponin;
- minst ett uorganisk salt og/eller et osmotisk og/eller leukobeskyttende middel; og
- 20 - en organisk og/eller uorganisk buffer som kan justere reagensens pH selektivt enten til en i det vesentlige nøytral verdi (pH mellom 5 og 8) eller til en basisk verdi (pH 8 - 12).

25 Således omfatter det hematologiske reagens i henhold til oppfinnelsen minst fire hovedkomponenter som gjør det mulig å oppnå de ovenfor beskrevne hensikter.

30 Det overflateaktive middel av kationtypen har til hensikt å utføre lyse av røde blodlegemer eller erythrocytter, hvilket gjør det mulig å frilegge hemoglobinet som deretter kan bestemmes ved adsorpsjonsmåling.

35 De (anioniske og kationiske) ioniske overflateaktive midler anvendes hovedsakelig for å dissosiere de proteinaktige komplekser og for å løse opp proteinene i membranene. De er såkalte denatureringsmidler.

I tillegg så har de rask og ikke-spesifikk virkning på cellepopulasjonene i blodet (erytrocytter og leukocytter).

5 Forbindelsen av glykosidtype, og spesielt et saponin, bidrar til lyse av de røde blodlegemer. I tillegg bevirker det stabilisering av hemoglobinet, hvilket gjør det mulig å analyse sistnevnte ved en spesifikk bølgelengde; og spesielt vil en slik forbindelse bidra til å ødelegge de motstandsdyktige membraner i de røde blodlegemer.

10

Saponinene, som også er kjent som saponosider, er glykosider som har evnen til spesielt å lyse erytrocytter, men denne lyse er mindre rask enn den som oppnås i nærvær av ioniske overflateaktive midler. Når saponiner anvendes i samband med andre overflateaktive midler, er det mulig å oppnå raskere, mer spesifikk lyse av erytrocytter, hvilket begrenser nedbrytningen av leukocytene.

20 I tillegg til den kjemiske struktur av denne forbindelsestype som er særpreget ved flerrings karbonnettverk så muliggjøres fysikalsk og kjemisk stabilisering av oksydasjonsderivatene av hemoglobin.

25 Det uorganiske salt innvirker på aktiviteten for det overflateaktive middel. I tillegg er det nødvendig for å være i stand til å utføre motstandsevne måling.

30 Det osmotiske middel spiller en vesentlig rolle som leukobeskyttende middel når reagenset anvendes med en nøytral pH, for å lette differensiering mellom leukocyt subpopulasjonene.

35 Endelig er bufferen en nøkkelbestanddel, fordi reagensets pH er en viktig egenskap. I realiteten vil, i henhold til pH-verdien, reagenset muliggjøre identifikasjon av én eller flere leukocyt subpopulasjoner.

Når reagensets pH justeres til i det vesentlige nøytral verdi (pH 5 - 8) er det mulig å kvantifisere og identifisere de følgende tre leukocyt sub-populasjoner: lymfocytter, monocytter og neutrofiler.

5

Når pH for reagenset justeres til en basisk verdi (pH 8 - 12) er det ytterligere mulig å identifisere de polynukleære eosinofiler.

10 Således, for anvendelser som krever identifisering av polynukleære eosinofiler, så er det nødvendig å justere reagensets pH til en basisk verdi.

15 På den annen side, hvis identifikasjon av eosinofilene ikke er nødvendig kan reagensets pH justeres til en i det vesentlige nøytral verdi.

I reagenset i henhold til oppfinnelsen er det overflateaktive middel valgt fra de følgende komponenter:

20

- De primære aminer, acetater og hydroklorider av fettamener;
- Kvaternære ammoniumsalter og trimetylcetylammoniumbromid;
- 25 - Amidene av substituerte diaminer som gjøres kationiske med etylsulfat, dietanolaminopropylamin, dietylaminopropylamid; og
- Amidene av ringformet dietylentriamin.

30 Det overflateaktive middel er fortrinnsvis tilstede i en konsentrasjon i området 0 - 50 g/l, og mere spesielt ca. 18 g/l.

35 Spesielt foretrukne forbindelser av glykosidtypen er saponiner, som også er kjent som saponosider, og kan enten være triterpenisk eller steroidale.

I reagenset i henhold til oppfinnelsen er forbindelsen av glykosidtypen fordelaktig tilstede i en konsentrasjon i området 0,5 - 20 g/l, og mer spesielt ca. 2 g/l.

- 5 Det uorganiske salt er fordelaktig valgt fra blant de følgende forbindelser; klorid, sulfat eller fluorid av natrium eller kalium.

10 Dette uorganiske salt er fordelaktig tilstede i en konsentrasjon i området 1 - 15 g/l, og mer spesielt ca. 8 g/l.

Det osmotiske og/eller leukobeskyttende middel i reagenset i henhold til oppfinnelsen er fordelaktig valgt fra mannitol, D-glukose og lignende forbindelser.

15

Dette osmotiske og/eller leukobeskyttende middel er fordelaktig tilstede i en konsentrasjon i området 0 - 30 g/l og mer spesielt ca. 2,5 g/l.

- 20 Den organiske og/eller uorganiske buffer er fordelaktig valgt blant de følgende forbindelser:

- trietanol;
- hydrogenerte fosfater av natrium og/eller kalium;
- N-[2-acetamido]-2-iminodieddiksyre;
- 25 - N-[karbamoylmetyl]iminodieddiksyre;
- 2 amino-2-metyl 1,3 propandiol;
- glycin
- natriumkarbonat
- sitronsyre; og
- 30 - tris(hydroksymetyl)aminometan.

Denne buffer er med fordel tilstede i en konsentrasjon i området 0 - 2 vekt %.

- 35 I henhold til en første utførelsesform av oppfinnelsen vil bufferen justere pH for reagenset til en verdi i området 5 - 8.

Ifølge en annen utførelsesform vil denne buffer justere pH for reagenset til en verdi mellom 8 - 12,

Oppfinnelsen skal beskrives under henvisning til de følgende eksempler.

#### **EKSEMPEL 1**

Et reagens ble fremstilt fra de følgende forbindelser og i de gitte konsentrasjoner:

<u>Forbindelser</u>	<u>Konsentrasjon</u>
Natriumklorid	9 g/l
"C15 H34 NCl" (kationisk overflate- 15 aktivt middel)	12 g/l
Triterpensaponin	2 g/l
Natriumkarbonat (buffer)	2 g/l
	(0,2 vekt %)

20 Forbindelsene ble blandet og pH justert til en basisk verdi i området 8 - 12, dvs. 10,5.

Ved hjelp av det således fremstilte reagens ble to hematologiske analyser utført under anvendelse av en automatisk  
25 hematologi-anordning solgt under varemerket "ABX-Micros" fremstilt av det franske firma ABX.

For dette formål ble et spesifikt volum av blodprøven som skal analyseres, på forhånd blandet med spesifikke volumer  
30 av et fortynningsmiddel og med det ovenfor nevnte reagens.

I dette eksempel ble bestemmelsene utført for dyreblod. Resultatene av målingene utført på to forskjellige blodprøver er vist i figur 1 og 2.

35

Disse figurer viser antall leukocytter i henhold til en relativ intensitet. Det er funnet at det eksisterer 4 leukocyt sub-populasjoner.

Tegningene vedrører en motstandsanalyse, slik at de følgende sub-populasjoner kan sees fra høyre til venstre, indikert med piler: lymfocytter (LYM), monocytter (MO), granulocytter (GRA) og polynukleære leukocyt eosinofiler (EOS).

Den automatiske anordning tilveiebrakte de følgende målingsresultater, som indikerte antall talte celler og den korresponderende prosentandel, for hver leukocyt sub-populasjon.

ANALYSE 1 (figur 1)

LYM:	3956 celler	53,23 %
MO:	420 celler	5,65 %
15 GRA:	2576 celler	34,65 %
EOS:	481 celler	6,47 %

ANALYSE 2 (figur 2)

LYM:	1071 celler	9,34 %
20 MO:	805 celler	7,00 %
GRA:	8906 celler	77,52 %
EOS:	706 celler	6,14 %

Således gjør reagenset i henhold til foreliggende eksempel det mulig å identifisere og kvantifisere hver av de ovenfor beskrevne sub-populasjoner.

**EKSEMPEL 2**

Det samme reagens som i eksempel 1 ble anvendt og tilsvarende analyser ble utført på to forskjellige prøver av menneskeblod. Bestemmelsene ble utført ved hjelp av en automatisk "ABX-Véga" hematologisk anordning fremstilt av firmaet ABX.

35

Resultatene er vist i figurene 3 og 4.

For prøven som korresponderer med figur 3, gjør analysen det mulig å identifisere og kvantifisere de følgende fire sub-populasjoner: lymfocytter (LYM); monocytter (MO), granulocytter (GRA) og polynukleære eosinofiler (EOS), hvor  
5 sistnevnte representerer 5 % av den totale populasjon.

For tilfellet av prøven som tilsvarer figur 4 gjør analysen det mulig å identifisere og kvantifisere de tre følgende sub-populasjoner; lymfocytter (LYM), monocytter (MO) og  
10 granulocytter (GRA). I tillegg viser analysen at prøven ikke inneholder noen polynukleære eosinofiler (0 % nivå).

#### **EKSEMPEL 3**

15 Et reagens som var tilsvarende de i henhold til eksempel 1 og 2 ble anvendt, men justert til en nøytral pH, dvs. 7,6. Tilsvarende analyser ble utført på en prøve av menneskeblod. Målingene ble utført ved hjelp av en automatisk "ABX-Véga" hematologianordning, fremstilt av firmaet ABX.

20 Resultatene av bestemmelsene er vist i figur 5. Kun de tre følgende hovedleukocyt sub-populasjoner er påvist: Lymfocytter (LYM), monocytter (MO) og granulocytter (GRA).

#### **25 EKSEMPEL 4**

Et reagens tilsvarende det som anvendes i eksempel 3 ble benyttet, og for dette formål justert til nøytral pH. Tilsvarende analyser ble utført på en prøve av menneskeblod.  
30 Bestemmelsene ble utført ved hjelp av en automatisk hematologianordning av "ABX-Micros" type, fremstilt av firmaet ABX.

Resultatene av målingene er vist i figur 6. På samme måte  
35 som i eksempel 3 ble kun de følgende tre hovedleukocyt sub-populasjoner påvist: lymfocytter (LYM), monocytter (MO) og granulocytter (GRA).

**P a t e n t k r a v**

1. Reagens for bestemmelse av hemoglobin, og bestemmelse  
5 av leukocytter i en blodprøve,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter:
  - minst ett overflateaktivt middel av kationisk type,
  - en forbindelse av glykosidtypen, og spesielt et saponin;
  - 10 - minst ett uorganisk salt og/eller et osmotisk og/eller leuko-beskyttende middel; og
  - en organisk og/eller uorganisk buffer, som selektivt kan justere reagensets pH, enten til en i det vesentlige nøytral verdi (pH 5 - 8), eller til en basisk  
15 verdi (pH 8 - 12).
  
2. Reagens i henhold til krav 1,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at det overflateaktive middel er valgt fra de følgende komponenter:
  - 20 - primære aminer, acetater og hydroklorider av fettaminer;
  - kvaternære ammoniumsalter og trimetylcetylammoniumbromid;
  - amidene av substituerte diaminer som er gjort kationiske med etylsulfat, dietanolamino-propylamin, dietylaminopropylamid; og  
25 amidene av ringformede dietylentriamin.
  
3. Reagens ifølge ett av kravene 1 og 2,  
30 k a r a k t e r i s e r t v e d at det overflateaktive middel er tilstede i en konsentrasjon i området 0 - 50 g/l.
  
4. Reagens ifølge et hvilket som helst av kravene 1 - 3,  
35 k a r a k t e r i s e r t v e d at forbindelsen av glykosidtype er valgt fra saponiner (eller saponosider).
  
5. Reagens ifølge hvilke som helst av kravene 1 - 4,

k a r a k t e r i s e r t v e d at forbindelsen av glykosidtype er tilstede i en konsentrasjon i området 0,5 - 20 g/l.

5 6. Reagens ifølge hvilke som helst av kravene 1 - 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at det uorganiske salt er valgt blant de følgende forbindelser: klorid, sulfat eller fluorid av natrium eller kalium, og at saltet er tilstede i en konsentrasjon i området 1 - 15 g/l.

10

7. Reagens ifølge hvilke som helst av kravene 1 - 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at det osmotiske og/eller leuko-beskyttende middel er valgt fra mannitol, D-glukose og lignende, og er tilstede i en mengde i området 0 15 - 30 g/l.

15

8. Reagens ifølge hvilke som helst av kravene 1 - 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at den organiske og/eller uorganiske buffer er valgt fra de følgende forbindelser:

20

- trietanolamin;
- hydrogenerte fosfater av natrium og kalium;
- N-[2-acetamido]-2 iminodieddiksyre;
- N-[karbamoylmetyl] iminodieddiksyre;
- 25 - 2 amino-2-metyl 1,3 propandiol;
- glycin;
- natriumkarbonat;
- sitronsyre, og
- tris (hydroksymetyl) aminometan,

30

og er tilstede i en konsentrasjon i området 0 - 2 vekt%.

9. Reagens ifølge hvilke som helst av kravene 1 - 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at bufferen justerer reagensets pH til en verdi i området 5 - 8.

35

10. Reagens ifølge hvilke som helst av kravene 1 - 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at bufferen justerer reagensets pH til en verdi i området 8 - 12.

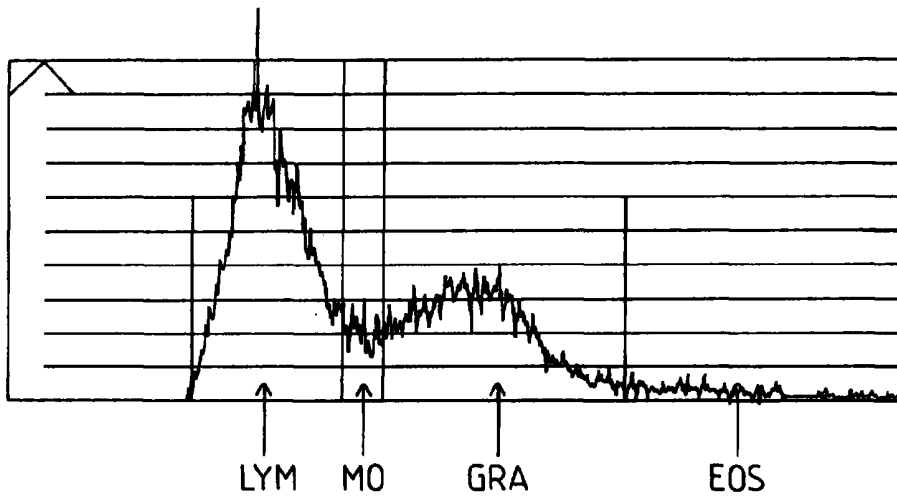


FIG.1

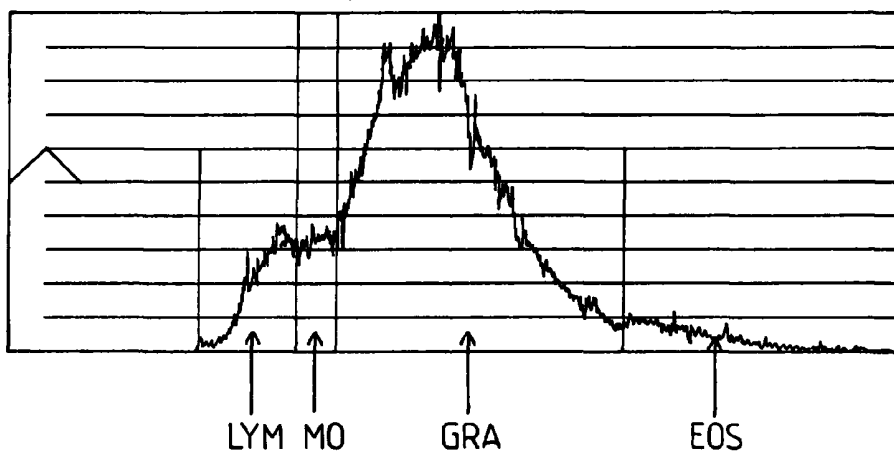


FIG.2

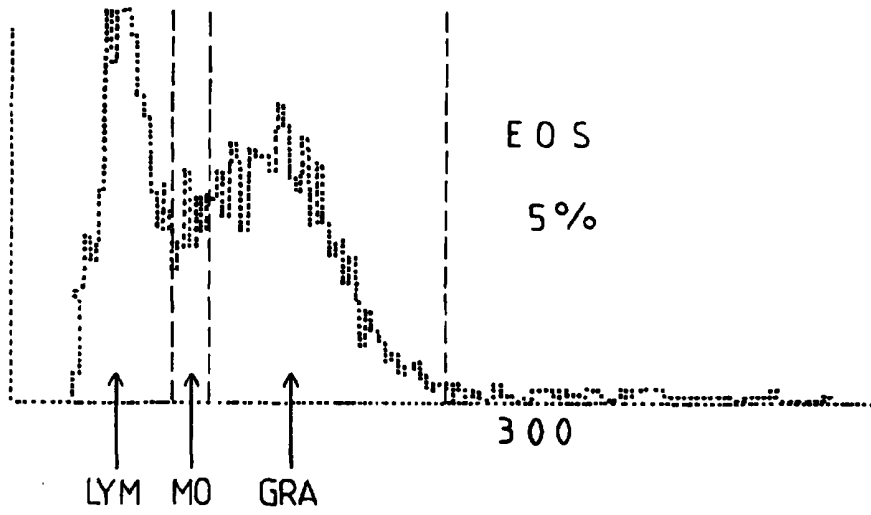


FIG.3

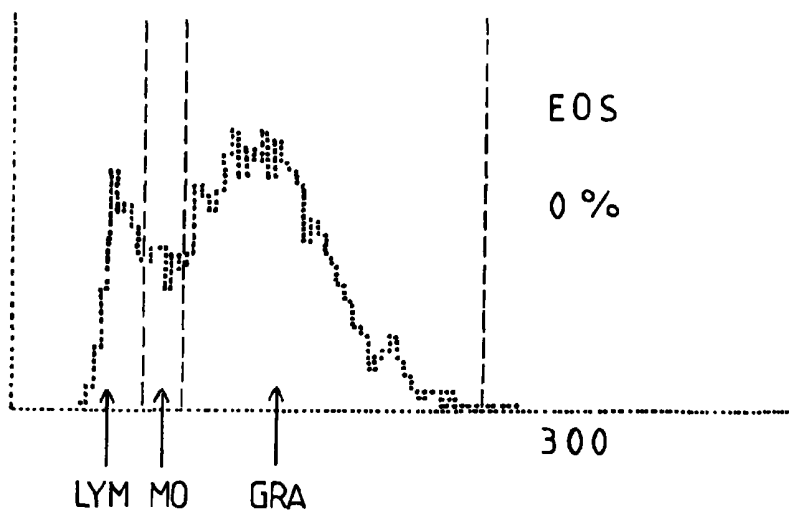


FIG.4

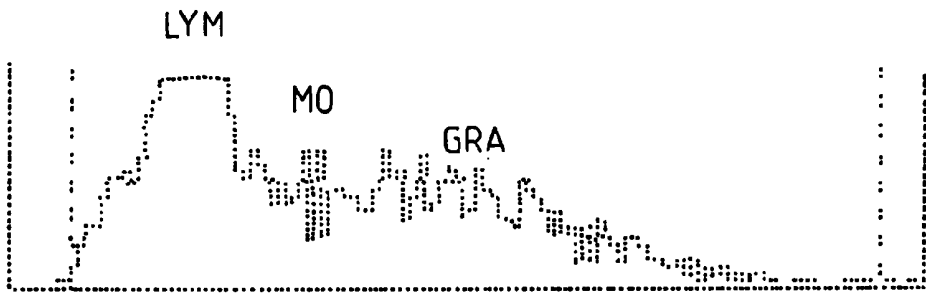


FIG.5

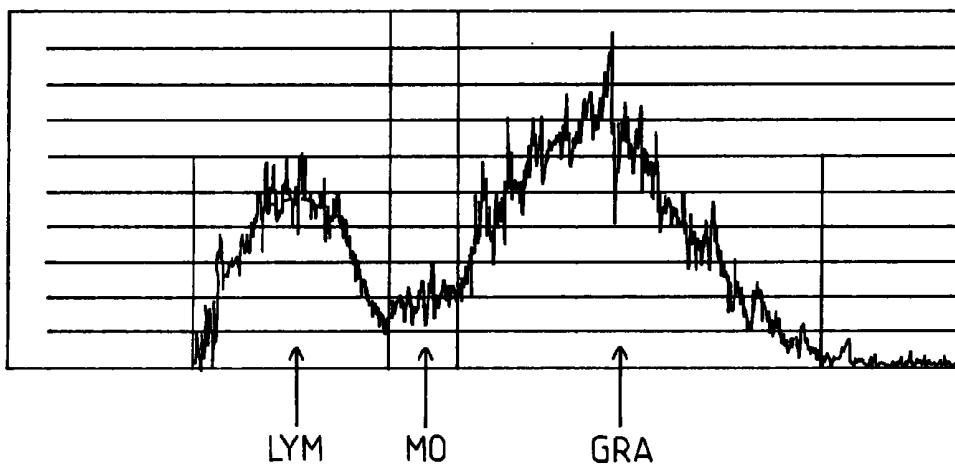


FIG.6