



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 16 272 T2 2004.04.22

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 960 333 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 16 272.2

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US98/00515

(96) Europäisches Aktenzeichen: 98 902 489.8

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 98/032016

(86) PCT-Anmeldetag: 13.01.1998

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: 23.07.1998

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 01.12.1999

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: 09.07.2003

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 22.04.2004

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: G01N 33/50  
G01N 33/72

(30) Unionspriorität:

786505 21.01.1997 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
DE, FR, GB

(73) Patentinhaber:

Coulter International Corp., Miami, Fla., US

(72) Erfinder:

LI, Yi, Miami, US; YOUNG, Carole, Miami, US

(74) Vertreter:

Müller-Boré & Partner, Patentanwälte, European  
Patent Attorneys, 81671 München

(54) Bezeichnung: CYANIDFREIE LYTISCHE REAGENZZUSAMMENSETZUNG UND VERFAHREN ZUR HÄMOGLOBIN- UND ZELLANALYSE

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingereicht, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft lytische Reagenzzusammensetzungen, Verdünnungsmittel und Verfahren zur Verwendung für die entweder manuelle oder automatische Messung der Gesamthämoglobinkonzentration in einer Blutprobe und weiter zur Verwendung in Kombination mit einem gleichzeitigen Zählen der Leukozyten oder einem differentiellen Zählen von Leukozytensubpopulationen.

**DISKUSSION DES STANDES DER TECHNIK**

[0002] Die Bestimmung des Gesamthämoglobins zeigt das Sauerstoffaufnahmevermögen von Vollblut an. Mehr als 300 abnormale Hämoglobine wurden durch die Untersuchung von Patienten mit klinischen Symptomen und durch elektrophoretische Studien einer klinisch normalen Population entdeckt. Viele dieser Abnormalitäten führen zu klinischen Pathologien, die veränderte Hämoglobinengehalte aufweisen, oder zu Hämoglobin, das eine veränderte Sauerstoffbindungsfähigkeit aufweist. Zu diesen Krankheiten gehören die Sichelzellanämie, sowohl die α- als auch die β-Thalassämie und Hämoglobin M.

[0003] Die Fähigkeit zur Messung des Hämoglobins (Hgb) in Blutproben ist ein wesentlicher Teil der diagnostischen Analyse und ist ebenfalls wichtig zur Überwachung des Ansprechens auf Therapien, die auf Krankheiten, die das Hämoglobin beeinflussen, gerichtet sind und auf Therapien, die auf andere Krankheiten gerichtet sind, die jedoch nachteilige Nebenwirkungen auf den Hämoglobinengehalt haben können.

[0004] Leukozyten in dem peripheralen Blut normaler Personen setzen sich aus fünf Arten zusammen, das heißt aus Lymphozyten, Monozyten, Neutrophilen, Eosinophilen und Basophilen. Die letztgenannten drei Arten von Leukozyten werden gemeinsam als Granulozyten bezeichnet. Unterschiedliche Arten von Leukozyten weisen unterschiedliche biologische Funktionalitäten auf. Das Zählen und Differenzieren der unterschiedlichen Arten von Leukozyten in einer Blutprobe liefert wertvolle Information für die klinische Diagnose. Zum Beispiel tritt eine erhöhte Monozytenzahl entweder während der Genesungsdauer von Patienten auf, die an infektiösen Krankheiten leiden, oder bei solchen Krankheiten, wie monozytische Leukämie, auf.

[0005] Die Klassifikation und das Zählen von Leukozyten wurde am häufigsten durch das differentielle Zählverfahren durchgeführt, das ebenfalls als manuelles Verfahren bezeichnet wird. Automatische Blutanalysatoren, die ein hämolytisches Reagenz zur Lyse von Erythrozyten verwenden und eine nur Leukozyten enthaltende Probe herstellen, werden ebenfalls gewöhnlich zum Zählen von Leukozyten verwendet. Die Probenmischnung wird dann über ein Impedanzverfahren analysiert. Es wurde eine kompliziertere Vorrichtung entwickelt, die verschiedene Arten von Leukozyten (differentielles Zählen), einschließlich Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten, zählt. Idealerweise würde man gerne in der Lage sein, mehrfache diagnostische Analysen in einem einzigen automatisierten Schritt auszuführen, wie zum Beispiel die Hämoglobinmessung und das Zählen der Leukozytenzahlen oder das differentielle Zählen der Leukozytensubpopulationen.

[0006] Unter den vielen zur Hämoglobinbestimmung gut bekannten Verfahren wurde das Cyanidhämoglobinverfahren vom International Committee for Standardization in Hematology als Standardverfahren empfohlen. Die Modifikation dieses Verfahrens durch Matsubara und Okuzono hat zu dessen breiten Verwendung in klinischen Laboratorien geführt. In diesem Verfahren wird das Eisenion der Hämgruppe in allen Hämoglobinformen der roten Zellen durch Kaliumferricyanid zu Methämoglobin oxidiert. Dann wird das Methämoglobin mit einem Cyanidanion, das eine sehr hohe Affinität zu dem Eisenion der Hämgruppe aufweist, unter Bildung eines Cyanmethämoglobinchromogens komplexiert. Dieses extrem stabile Chromogen weist eine maximale Absorption bei 540 nm auf, die durch UV Spektroskopie manuell gemessen wird.

[0007] Trotz des stabilen Chromogens, das durch das Standard-Cyanidhämoglobinverfahren und dessen modifizierten automatischen Verfahren gebildet wird, hat jedoch der Reagenzienabfall aufgrund des verwendeten Kaliumcyanids eine große Umweltproblematik hervorgerufen. In den letzten zehn Jahren wurde eine gewaltige Anstrengung unternommen, um automatisierte Hämoglobinanalyseverfahren ohne die Verwendung von Cyanid zu entwickeln.

[0008] Oshiro et al, Clin. Biochem. 1583 (1982), lehren die Verwendung eines Reagenz zur Hämoglobinanalyse, das Natriumlaurylsulfat (SLS) und Triton® X-100 (ein nichtionisches grenzflächenaktives Mittel) in einem neutralen pH-Wert (7,2) umfaßt. Das SLS wird zur Lyse der Erythrozyten verwendet und es wird angenommen, dass es ferner einen SLS-Hämoglobinkomplex erzeugt, der eine maximale Absorption bei 539 nm und eine Schulter bei 572 nm aufweist. Die Reaktion verläuft innerhalb von 5–10 Minuten vollständig und die Gesamt-hämoglobinmessung ist quantitativ. Wie jedoch später in dem US Patent Nr. 5,242,832 (für Sakata) erklärt wird, ist es nicht möglich mit Oshiros Verfahren mit der Hämoglobinmessung gleichzeitig die Leukozyten zu analysieren.

[0009] Das US Patent Nr. 5,242,832 (für Sakata) offenbart ein cyanidfreies Lysereagenz zum Zählen der Leukozyten und zum Messen der Hämoglobinkonzentration in Blutproben. Das Lysereagenz umfaßt mindestens ein erstes grenzflächenaktives Mittel, das ein quartäres Ammoniumsalz ist, mindestens ein zweites grenzflächenaktives Mittel, das kationische und amphotere grenzflächenaktive Mittel umfaßt, und mindestens einen Hämoglobinstabilisator, der aus der Gruppe ausgewählt ist, die Tiron, 8-Hydroxychinolin, Bipyridin, 1-10-Phenanthrolin, phenolische Verbindungen, Bisphenol, Pyrazol und Derivate, sec-Phenyl 5-pyrazolon und Derivate, Phenyl-3-pyrazolon, und Imidazol und dessen Derivate umfaßt. Sakata lehrt, dass die Fraktionierung der Leukozyten in zwei oder drei Gruppen, einschließlich einem Aggregat von Monozyten, Esosinophilen und Basophilien und einem Aggregat von Neutrophilen, nur unter Verwendung von mindestens zwei grenzflächenaktiven Mitteln und durch strenge Kontrolle der Konzentration des grenzflächenaktiven Mittels ausgeführt werden kann. Sakata lehrt ebenfalls, dass der bevorzugte pH-Wert des Lysereagenz im Bereich von 5,0 bis 8,0 liegt. Beträgt der pH-Wert 3,0 oder weniger so nimmt die Beschädigung der Leukozyten zu, wodurch die Messung der Leukozyten schwierig wird, und beträgt der pH-Wert 9,0 oder mehr, so verschlechtert sich die Stabilität des Hämoglobins mit der Zeit.

[0010] Die PCT/US95/02897 (Kim) offenbart ein cyanidfreies Verfahren und ein Reagenz zur Hämoglobinbestimmung in einer Vollblutprobe. Das Reagenz umfaßt einen Liganden, der aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Imidazol und Derivaten, N-Hydroxyacetamid, H-Hydroxylamin, Pyridin, Oxazol, Thiazol, Pyrazol, Pyrimidin, Purin, Chinolin und Isochinolin, und ein grenzflächenaktives Mittel mit einer großen erythrolytischen Fähigkeit, das aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Lauryldimethylaminoxid und Octylphenoxypolyethoxyethanol. Das Analyseverfahren ist schnell und dauert weniger als 10 Sekunden. Das Reagenz ist jedoch nur unter extrem alkalischer Bedingung bei einem pH-Wert von 11 bis 14 wirksam. Zusätzlich wird von Kim keine Fähigkeit zum Zählen der Leukozyten oder zum Differenzieren der Leukozytensubpopulationen gelehrt.

[0011] Keines der vorstehenden cyanidfreien Verfahren zur Hämoglobinemessung ist in der Lage gleichzeitig mit der Hämoglobinemessung die Monozyten- und Gesamtgranulozytenzahlen zu liefern, beide Parameter sind jedoch wertvolle Hilfsmittel für die klinische Diagnose verschiedener Krankheiten. Es entsteht ein Bedarf für ein vielseitigeres Verfahren zur cyanidfreien Hämoglobinemessung und für ein multifunktionelles Reagenz, das in der Lage ist, in einem einzigen automatisierten Schritt mehrfache diagnostische Analysen durchzuführen.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0012] Im Hinblick auf die vorstehenden Diskussionen besteht ein Ziel dieser Erfindung darin, eine cyanidfreie lytische Reagenzzusammensetzung zur Messung der Gesamthämoglobinkonzentration, die in einer Blutprobe vorhanden ist, zur Verfügung zu stellen.

[0013] Die cyanidfreie lytische Reagenzzusammensetzung umfaßt eine wässrige Lösung von mindestens einem grenzflächenaktiven Mittel in einer ausreichenden Menge, die befähigt, die Erythrozyten zu hämolysieren und Hämoglobin freizusetzen, das aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus quartären Ammoniumsalzen, Pyridiniumsalzen, Alkylsulfonsäure oder Alkalimetallsalzen von Alkylsulfonaten, und organischen Phosphatestern oder Alkalimetallsalzen organischer Phosphatester; und einem organischen Liganden in einer ausreichenden Menge, um ein stabiles Chromogen mit Hämoglobin zu bilden, der ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Triazol und dessen Derivaten und Tetrazol und dessen Derivaten. Die lytische Reagenzzusammensetzung weist einen pH-Wert im Bereich von 1 bis 13 auf.

[0014] In einem bevorzugten Verfahren wird eine Kombination eines quartären Ammoniumsalzes oder -salzen mit einem offensichtlichen organischen Liganden dazu verwendet, die Messung der Gesamthämoglobinkonzentration und das gleichzeitige Zählen der Leukozytenzahlen in einer Blutprobe durch ein DC-Impedanzmessungsverfahren zur Verfügung zu stellen.

[0015] In einem besonders bevorzugten Verfahren wird eine Kombination aus einem quartären Ammoniumsalz oder -salzen mit einem organischen Liganden, der mit der Leukozytendifferentialanalyse verträglich ist, dazu verwendet, die Messung der Gesamthämoglobinkonzentration, das Zählen der Leukozytenzahlen und das differentielle Zählen der Leukozytensubpopulationen einer Blutprobe gleichzeitig zur Verfügung zu stellen, wobei die Leukozyten in drei Subpopulationen differenziert werden, die Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten umfassen.

[0016] Wie aus der nachfolgenden genauen Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen klarer wird, ist die Erfindung im Vergleich zum Stand der Technik besonders vorteilhaft darin, dass sie ein cyanidfreies lytisches Reagenz zur Hämoglobinemessung in einem breiten pH-Wertbereich zur Verfügung stellt.

[0017] Ein anderes Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Verwendung der lytischen Reagenzzusammensetzung mit einem geeigneten Blutverdünnungsmittel zur Messung der Hämoglobinkonzentration von Blut oder in Kombination mit dem gleichzeitigen Zählen der Leukozytenzahlen oder dem differentiellen Zählen der Leukozytensubpopulationen zur Verfügung zu stellen.

[0018] In einem Aspekt umfaßt das Verfahren das Verdünnen einer Blutprobe mit einem geeigneten Blutverdünnungsmittel, das Mischen einer ausreichenden Menge der lytischen Reagenzzusammensetzung mit der

verdünnten Probe, dann das photometrische Messen der Probe bezüglich der Hämoglobinkonzentration bei einer vorher festgelegten Wellenlänge und gleichzeitig das Zählen der Leukozytenzahlen oder das differentielle Zählen der Leukozytensubpopulationen auf einem Blutanalysator, der mit einer DC-Impedanzmessungsvorrichtung ausgestattet ist.

[0019] Die Erfindung und ihre verschiedenen Vorteile werden aus der nachfolgenden Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen, unter Bezugnahme auf die beigefügten Zeichnungen besser verständlich.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0020] Die **Fig.** 1a und 1b sind die Absorptionsspektren von Vollblutproben, die nach dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren, unter Verwendung der lytischen Reagenzzusammensetzungen aus dem Beispiel 1 der vorliegenden Erfindung, verarbeitet wurden (Vorschriften 1b und 1c).

[0021] **Fig.** 2 zeigt eine Reihe von Absorptionsspektren einer Vollblutprobe, die nach dem Verfahren von Beispiel 1, unter Verwendung der lytischen Reagenzzusammensetzung der Vorschrift 1a, verarbeitet wurde. Es wurden insgesamt 12 Spektren in zwölf Stunden mit einem zeitlichen Abstand von einer Stunde erfasst.

[0022] Die **Fig.** 3a und 3b zeigen die Spektren einer Vollblutprobe, die nach dem in Beispiel 2 beschriebenen Verfahren, unter Verwendung der lytischen Reagenzzusammensetzung von Beispiel 2 und einer Phosphat-gepufferten Standardsalzlösung und einem handelsüblichen Blutverdünnungsmittel, mit COULTER® ISOTON® III als Verdünnungsmittel, behandelt wurden.

[0023] Die **Fig.** 4a, 4b, 4c und 4d zeigen die Histogramme der Leukozytensubpopulationsverteilung von vier Vollblutproben, die unter Verwendung der lytischen Reagenzzusammensetzungen von Beispiel 4 der vorliegenden Erfindung auf einem handelsüblichen Blutanalysator, COULTER COUNTER® Model S-Plus N, erhalten wurden.

[0024] Die **Fig.** 5a und 5b zeigen die Korrelationen zwischen der Hämoglobinkonzentration und den Leukozytenzahlen, die auf einem automatisierten handelsüblichen Blutanalysator, COULTER® STKS, unter Verwendung eines herkömmlichen lytischen Reagens, COULTER® LYSE S® III diff, erhalten wurden und die Ergebnisse, die unter Verwendung einer lytischen Reagenzzusammensetzung von Beispiel 3 (Vorschrift 3a) der vorliegenden Erfindung auf demselben Gerät erhalten wurden.

[0025] Die **Fig.** 6a und 6b zeigen die Korrelationen zwischen der Hämoglobinkonzentration und den Leukozytenzahlen, die auf einem automatisierten handelsüblichen Blutanalysator, COULTER® STKS unter Verwendung des COULTER® LYSE S® III diff lytischen Reagens erhalten wurden, und die Ergebnisse, die unter Verwendung einer lytischen Reagenzzusammensetzung von Beispiel 3 (Vorschrift 3b) der vorliegenden Erfindung auf demselben Gerät erhalten wurden.

[0026] Die **Fig.** 7a, 7b, 7c, 7d und 7e zeigen die Korrelationen zwischen den Leukozytenzahlen, der differentiellen Leukozytenzählung und der Hämoglobinkonzentration, die auf einem COULTER COUNTER® Modell S-Plus IV erhalten wurden, und die Ergebnisse, die unter Verwendung einer lytischen Reagenzzusammensetzung (Vorschrift 4a und das Verdünnungsmittel) von Beispiel 4 der vorliegenden Erfindung auf demselben handelsüblichen Gerät erhalten wurden.

#### GENAUE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0027] Im allgemeinen ist es für die photometrische Messung der Gesamthämoglobinkonzentration in einer Blutprobe notwendig, die Erythrozyten zu lysieren und das Hämoglobin unter Verwendung eines hämolytischen Reagens freizusetzen, dann das Hämoglobin in ein stabiles Chromogen umzuwandeln, das nachgewiesen werden kann und durch UV-Spektroskopie bei einer vorher festgelegten Wellenlänge gemessen werden kann. Damit die Messung quantitativ und genau ist, muß das gebildete Chromogen stabil sein, zumindest in dem Zeitrahmen der Messung. Die Lyse der Erythrozyten kann durch saures Lysieren, osmotisches Lysieren und durch die Verwendung verschiedener natürlicher und synthetischer grenzflächenaktiver Mittel erreicht werden. Das freigesetzte Hämoglobin umfaßt verschiedene Formen, wie zum Beispiel Oxyhämoglobin, Desoxyhämoglobin, Methämoglobin, Carboxyhämoglobin und so weiter.

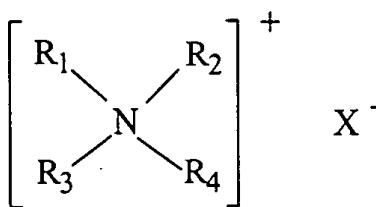
[0028] Das wirkungsvollste Verfahren zur Umwandlung von Hämoglobin in ein stabiles Chromogen besteht darin, einen Liganden zur Verfügung zu stellen, der eine hohe Affinität zu dem Hämeisen aufweist, um einen stabilen Hämoglobinkomplex zu bilden. Dies wurde erfolgreich durch das Cyanmethämoglobinverfahren gezeigt, bei dem das Cyanidion eine extrem hohe Affinität zu dem Hämeisen aufweist. Die Ausdrücke Hämoglobinkomplex und Hämoglobinchromogen werden in diesem Zusammenhang untereinander austauschbar verwendet. Normalerweise ist das gebildete Hämoglobinchromogen in Abwesenheit eines Liganden mit hoher Affinität nicht sehr stabil. Seine Absorption variiert und zerfällt in den meisten Fällen mit der Zeit. Unter dieser Bedingung ist das Analyseverfahren unzuverlässig, sogar wenn die Kinetik der Zersetzungreaktion gut überwacht und korrigiert wird, weil das Chromogen auf die Umgebung, wie zum Beispiel die Temperatur und die Probenpräparationsbedingungen usw., sehr empfindlich sein könnte. Wird ein geeigneter Hämoglobinligand

zur Verfügung gestellt, so kann die Hämoglobinumsetzung quantitativ sein und die Zuverlässigkeit des Analyseverfahrens wird durch die Stabilität des gebildeten Hämoglobinkomplexes sichergestellt.

[0029] Die Auswahl eines Liganden hängt von der auszuführenden Analyse ab, wie zum Beispiel nur die Hämoglobinmessung oder eine mehrfache diagnostische Analyse, wie zum Beispiel das Zählen der Leukozytenzahlen oder das differentielle Zählen der Leukozytensubpopulationen in Kombination mit der Hämoglobinmessung. Ein Ligand, der für die Hämoglobinmessung perfekt ist, könnte, wenn der Ligand mit den anderen Analysen nicht verträglich ist, für spätere Anwendungen nicht geeignet sein. Die Lehre eines Beispiels von Sakata (in der US 5,242,832) besteht darin, dass das zum Lysieren von Erythrozyten und zur Bildung des Hgb-SLS Chromogens verwendete SLS nicht zur Leukozytenmessung verwendet werden kann.

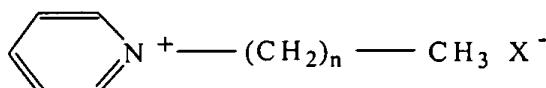
[0030] Die vorliegende Erfindung richtet sich auf eine cyanidfreie lytische Reagenzzusammensetzung zur Messung der in einer Blutprobe vorhandenen Gesamthämoglobinkonzentration, oder in Kombination mit einem gleichzeitigen Zählen der Leukozytenzahlen oder dem differentiellen Zählen der Leukozytensubpopulationen. Die cyanidfreie lytische Reagenzzusammensetzung umfasst eine wässrige Lösung von:

(i) mindestens einem grenzflächenaktiven Mittel in einer ausreichenden Menge, die in befähigt, Erythrozyten zu hämolysieren und Hämoglobin freizusetzen, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus quartären Ammoniumsalzen, dargestellt durch folgende Molekularstruktur:



worin  $R_1$  eine Alkyl-, Alkenyl oder Alkynylgruppe mit 10 bis 18 Kohlenstoffatomen ist;  $R_2$ ,  $R_3$  und  $R_4$  Alkylgruppen mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen sind und  $X^-$  Chlorid- und Bromidanionen ist;

Pyridiniumsalzen, dargestellt durch folgende Molekularstruktur:



worin  $n$  eine ganze Zahl von 7 bis 12 ist und  $X^-$  eine anionische Gruppe ist;

Alkylsulfonsäure oder Alkalimetallsalzen von Alkylsulfonaten;

organischen Phosphatestern oder Alkalimetallsalzen von organischen Phosphatestern;

(II) einem organischen Liganden in einer ausreichenden Menge, um ein stabiles Chromogen mit Hämoglobin zu bilden, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus

(a) Triazol, wie zum Beispiel 1,2,3-Triazol und 1,2,4-Triazol und Triazolderivaten, wie zum Beispiel 1,2,4-Triazol-3-thiol, 1,2,4-Triazolnatriumderivat, Triazoldicarbonsäure und heterocyclische Derivate von Triazol; und

(b) Tetrazol und dessen Derivate, wie zum Beispiel 5-Aminotetrazol

[0031] Der pH-Wert der lytischen Reagenzzusammensetzung liegt im Bereich von 1 bis 13.

[0032] Unter den hämolytischen grenzflächenaktiven Mitteln werden quartäre Ammoniumsalze besonders bevorzugt. Die Konzentration des grenzflächenaktiven Mittels in der lytischen Reagenzzusammensetzung muß in einer Menge vorhanden sein, die ausreicht, um die Erythrozyten zu lysieren und das Hämoglobin freizusetzen, während die Leukozytenkernvolumina erhalten bleiben. Zum Zählen der Leukozyten braucht man die Leukozytenmembran nicht intakt zu lassen. Im allgemeinen sind unter Verwendung der in der lytischen Reagenzzusammensetzung der vorliegenden Erfindung vorstehend beschriebenen hämolytischen grenzflächenaktiven Mittel die Leukozytenmembranen teilweise lysiert, wenn die Erythrozyten vollständig lysiert und zerstört sind. Es sind die übrig bleibenden Kerne der Leukozyten, die das Zählen der Leukozytenzahlen und die Differenzierung der Leukozytensubpopulationen in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten unter Verwendung des DC-Impedanzverfahrens ermöglichen. Die Konzentration der grenzflächenaktiven Mittel in der lytischen Reagenzzusammensetzung liegen im Bereich von 2 g/l bis 250 g/l, vorzugsweise von 4 g/l bis 80 g/l.

[0033] Die Konzentration des organischen Liganden in der lytischen Reagenzzusammensetzung muß ausreichend sein, um ein stabiles Hämoglobinchromogen zu bilden. Die Konzentration variiert mit der Art des Liganden, in Abhängigkeit von der Affinität des Liganden zu Hämoglobin. Im allgemeinen könnte das gebildete Hämoglobinchromogen instabil sein, wenn die Menge an Ligand in der lytischen Reagenzzusammensetzung nicht ausreicht. Es wurde festgestellt, dass die Konzentration des organischen Liganden in der lytischen Reagenzzusammensetzung der vorliegenden Erfindung in einem breiten Bereich von 1 g/l bis 30 g/l, vorzugsweise von 3 g/l bis 15 g/l wirksam ist.

[0034] Die Konzentrationen der chemischen Bestandteile in der lytischen Reagenzzusammensetzung sind die Konzentrationen unter den Bedingungen, bei denen die Hämoglobin- und Leukozytenmessungen unter Verwendung eines geeigneten Blutverdünnungsmittels für die Bequemlichkeit der Verwendung herkömmlicher Blutanalysatoren, ausgeführt werden. Die Konzentrationen der chemischen Bestandteile kann jedoch, abhängig von dem Volumenverhältnis zwischen der lytischen Reagenzzusammensetzung und dem Verdünnungsmittel, verändert werden.

[0035] Überdies kann man, falls ein Gerät eine einzige lytische Reagenzzusammensetzung ohne vorherige Verdünnung durch ein Blutverdünnungsmittel anwendet, die Konzentrationen der chemischen Bestandteile der lytischen Reagenzzusammensetzung verringern und die Leitfähigkeit der lytischen Reagenzzusammensetzung anpassen, wodurch deren Verwendung für Impedanzmesungen ermöglicht wird. Die Leitfähigkeit kann durch Zugabe geeigneter Mengen an Alkalimetallsalzen angepasst werden. Bei dieser Art des Verfahrens mit einem einzelnen Reagenz sollten die Konzentrationen der chemischen Bestandteile der lytischen Reagenzzusammensetzung dieselben sein, wie die Konzentrationen, die in der Probenendmischung der vorliegenden Erfindung enthalten sind, die sowohl ein Verdünnungsmittel, als auch eine lytische Reagenzzusammensetzung enthält.

[0036] Ebenfalls können optionale Zusatzstoffe in der lytischen Reagenzzusammensetzung in Konzentrationen enthalten sein, so dass ihr Vorhandensein mit den primären funktionellen Komponenten der lytischen Reagenzzusammensetzung verträglich ist. Unter diesen Zusatzstoffen sind Konservierungsmittel, die der Oxidation entgegenwirkende Eigenschaften aufweisen, um die Lagerbeständigkeit der Zusammensetzung zu erhöhen, und die antimikrobielle Eigenschaften aufweisen.

[0037] Die vorliegende Erfindung ist ebenfalls auf ein Verfahren zur Verwendung der vorstehend beschriebenen cyanidfreien lytischen Reagenzzusammensetzung für die Messung der in einer Blutprobe vorhandenen Gesamthämoglobinkonzentration oder in Kombination mit einem gleichzeitigen Zählen der Leukozytenzahlen oder dem differentiellen Zählen der Leukozytensubpopulationen gerichtet.

[0038] Eine antikoagulierte Blutprobe wird durch ein geeignetes Blutverdünnungsmittel verdünnt, dann wird eine ausreichende Menge der vorstehend beschriebenen lytischen Reagenzzusammensetzung mit der verdünnten Probe durch manuelles oder mechanisches Mischen gemischt. Das Verdünnungsverhältnis des Bluts geht von ungefähr 125 : 1 bis ungefähr 500 : 1, in Bezug auf das gesamte Reagenzvolumens gegen Blut. Die Probenmischung wird 8 bis 60 Sekunden nach der Zugabe der lytischen Reagenzzusammensetzung entweder auf einem UV Spektrometer oder auf einem automatisierten Blutanalysator, der mit einem UV Detektor ausgestattet ist, bei einer vorher festgelegten Absorptionswellenlänge für die Gesamthämoglobinkonzentration gemessen. Die Probenmischung kann ebenfalls in einen Blutanalysator eingeführt werden, der mit einem UV Detektor und einer DC-Impedanzmessungsvorrichtung ausgestattet ist, um die Hämoglobinkonzentration der Blutprobe zu messen und die Leukozytenzahlen zu zählen oder um weiterhin die Leukozytensubpopulationen, basierend auf dem erhaltenen Populationsverteilungshistogramm, zu differenzieren. In dem letzteren Fall werden die Leukozyten in drei Subpopulationen, einschließlich Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten, differenziert.

[0039] Die Nachweisverfahren, die für das Zählen der Leukozyten durch einen Blutanalysator, der mit einer DC-Impedanzmessungsvorrichtung ausgestattet ist, verwendet werden, sind allgemein in dem US Patent Nr. 2,656,508 (für Wallace H. Coulter) beschrieben, auf dessen Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird. Das Verfahren zur Differenzierung der Leukozytensubpopulationen, unter Verwendung der DC-Impedanzmessung, wird in den US Patenten mit den Nummern 4,485,175 und 4,528,274 beschrieben.

[0040] Die vorstehend beschriebenen organischen Liganden, wie zum Beispiel Triazol und Melamin, bilden nicht nur mit Hämoglobin stabile Chromogene, sondern stabilisieren auch die Leukozyten in der behandelten Probenmischung. Dieser Leukozytenstabilisierungseffekt verhindert ein Überlysern der Leukozyten und eine Kernschrumpfung, erleichtert die auf ihren Kernvolumina basierende Trennung der Leukozytensubpopulationen und macht die Differentiation der Leukozyten in drei Subpopulationen mit einem breiten pH-Wertbereich möglich. Beispiel 4 erläutert solche erfolgreichen Beispiele, die Leukozytenstabilisatorliganden in den lytischen Reagenzzusammensetzungen der vorliegenden Erfindung verwenden.

[0041] Im allgemeinen ist die lytische Reagenzzusammensetzung der vorliegenden Erfindung, die die vorstehend beschriebenen organischen Liganden und grenzflächenaktiven Mittel umfaßt, befähigt, die Gesamthämoglobinkonzentration einer Blutprobe in einem sehr breiten pH-Wertbereich zu messen. Vorzugsweise wird eine Kombination eines quartären Ammoniumsalzes oder -salze mit irgendeinem der organischen Liganden verwendet, um die gleichzeitige Messung der Gesamthämoglobinkonzentration und das Zählen der Leukozytenzahlen in einer Blutprobe durch ein DC-Impedanzmessungsverfahren zu liefern.

[0042] Besonders bevorzugt wird eine Kombination eines quartären Ammoniumsalzes oder -salze mit einem organischen Liganden, der mit der differentiellen Leukozytenanalyse verträglich ist, verwendet, um gleichzeitig die Messung der Gesamthämoglobinkonzentration, das Zählen der Leukozytenzahlen und das differentielle Zählen der Leukozytensubpopulationen einer Blutprobe zu liefern. In dem am meisten bevorzugten Verfahren werden die Leukozyten in drei Subpopulationen, einschließlich Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten, differenziert.

[0043] Die cyanidfreie lytische Reagenzzusammensetzung und das Verfahren für deren Verwendung liefern im Vergleich zu den Verfahren der Hämoglobinmessung aus dem Stand der Technik mehrere Vorteile. Die vorliegende Erfindung erlaubt eine genaue Messung der Hämoglobinkonzentration einer Blutprobe in Abwesenheit von Cyanid, zusammen mit einer Bestimmung der Gesamtleukozytenzahlen oder der Differenzierung der Leukozytensubpopulationen in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Die lytische Reagenzzusammensetzung wandelt das, in einer Blutprobe vorhandene Hämoglobin, während ungefähr von 8 Sekunden bis 60 Sekunden, in Abhängigkeit von dem verwendeten organischen Liganden und dem Verdünnungsmittel, schnell in ein stabiles Chromogen um, wodurch eine schnelle automatische Analyse gestattet wird. Das einmal gebildete Hämoglobinchromogen ist während der Zeit der Messung stabil.

[0044] **Fig. 2** zeigt eine Reihe von Absorptionsspektren einer Blutprobe, die nach dem Verfahren von Beispiel 1 verarbeitet wurde, wobei die lytische Reagenzzusammensetzung von Vorschrift 1a verwendet wurde, die Tetrazol als den Hämoglobinliganden und COULTER® ISOTON® II (ein handelsübliches Blutverdünnungsmittel) als das Verdünnungsmittel enthielt. **Fig. 2** veranschaulicht insgesamt 12 Spektren, die von 12 Sekunden bis 12 Stunden nach der Zugabe der lytischen Reagenzzusammensetzung mit einem zeitlichen Abstand von einer Stunde erfasst wurden. Die Spektren des Hgb-Tetrazol Chromogens sind sehr stabil und zeigen keine Verschiebung oder Zerfall während der Zeitspanne der Datenerfassung über zwölf Stunden.

[0045] Die Art eines spezifischen Hämoglobinchromogens hängt von dem organischen Liganden ab, der in der lytischen Reagenzzusammensetzung verwendet wird. Die meisten Chromogene, die durch die Behandlung der Blutprobe mit der lytischen Reagenzzusammensetzung der vorliegenden Erfindung unter Verwendung der vorstehend beschriebenen organischen Liganden gebildet werden, haben ihre maximale Absorptionswellen zwischen 510 nm und 560 nm. Daher können die Chromogene durch die meisten handelsüblichen Blutanalysatoren unter Einbeziehung des Absorptionskoeffizienten des spezifischen Chromogens gemessen werden.

[0046] Die lytische Reagenzzusammensetzung der vorliegenden Erfindung kann mit vielen geeigneten Blutverdünnungsmitteln verwendet werden. **Fig. 3** zeigt die Spektren einer Vollblutprobe, die mit dem vorstehend beschriebenen Verfahren behandelt worden ist, wobei die lytische Reagenzzusammensetzung, die Tetrazol (Beispiel 2) enthielt, verwendet wurde und die Phosphat-gepufferte Standardsalzlösung und ein handelsübliches Blutverdünnungsmittel, mit COULTER® ISOTON® III als die Verdünnungsmittel, verwendet wurden. Mit beiden Verdünnungsmitteln bildet sich im wesentlichen dasselbe Hämoglobinchromogen, das bei 540 nm gemessen werden kann.

[0047] Im Gegensatz zu den früheren Reagenzien weist die lytische Reagenzzusammensetzung der vorliegenden Erfindung einen breiten pH-Wertbereich von 1 bis 13 auf. Dies erweitert den Umfang der Chemikalien, die als Hämoglobinligand verwendet werden können. Zum Beispiel bildet das Kaliumsalz der Oxonsäure mit Hämoglobin ein stabiles Chromogen, das bei 538 nm eine starke Absorption aufweist. Das Kaliumsalz der Oxonsäure ist jedoch nur in Wasser bei einem niedrigen pH-Wert, der geringer als pH-Wert 3 ist, leicht löslich. Die vorherigen neutralen und alkalischen Reagenzien schließen die Verwendung dieser Chemikalie für die Hämoglobinmessung aus. Sakata lehrt in dem US Patent Nr. 5,242,832, dass bei einem pH-Wert von 3,0 oder weniger die Beschädigung der Leukozyten zunimmt, wodurch die Messung der Leukozyten schwierig gemacht wird. **Fig. 4** zeigt die Histogramme der Leukozytensubpopulationsverteilung, die nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung unter Verwendung einer lytischen Reagenzzusammensetzung von Beispiel 4 erhalten wurden, die 0,5% Kaliumsalz der Oxonsäure enthält und einen pH-Wert von 2,3 und COULTER® ISOTON® III als das Verdünnungsmittel aufweist. Wie durch die **Fig. 4c** und **4d** veranschaulicht wird, werden die Leukozyten deutlich in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten differenziert. **Fig. 6b** zeigt eine ausgezeichnete lineare Korrelation zwischen den Leukozytenzahlen, die auf einem handelsüblichen automatisierten Blutanalysator, COULTER® STKS, erhalten wurden und den Ergebnissen, die unter Verwendung von einer der lytischen Reagenzzusammensetzungen von Beispiel 3 (Vorschrift 3b) auf demselben Gerät erhalten wurden, wobei der pH-Wert der lytischen Reagenzzusammensetzung nur 1,67 beträgt.

[0048] Die lytische Reagenzzusammensetzung der vorliegenden Erfindung und das Verfahren für deren Verwendung liefert eine genaue Hämoglobinmessung, eine genaue Zählung der Leukozyten und differentielles Zählen der Leukozytensubpopulationen. Die **Fig. 5a** und **6a** zeigen eine ausgezeichnete lineare Korrelation zwischen den Hämoglobinkonzentrationen, die auf einem COULTER® STKS unter Verwendung eines herkömmlichen lytischen Reagens erhalten wurden, und den Hämoglobinkonzentrationen, die unter Verwendung der lytischen Reagenzzusammensetzungen von Beispiel 3 (Vorschrift 3a und 3b) erhalten wurden. Die **Fig. 5b** und **6b** veranschaulichen die ausgezeichnete Korrelation zwischen der Leukozytenzählung, die auf einem COULTER® STKS erhalten wurde, und den Ergebnissen, die unter Verwendung von Vorschrift 3a und 3b auf demselben Gerät erhalten wurden.

[0049] Die lytische Reagenzzusammensetzung der vorliegenden Erfindung liefert eine genaue Hämoglobinmessung in Gegenwart gewöhnlicher störender Materialien. Es wurden insgesamt 72 Vollblutproben unter Verwendung der Vorschrift 3a von Beispiel 3 auf einem COULTER® STKS analysiert. 70% der Proben sind klinische Proben, die verschiedene Krankheiten umfassten, wie zum Beispiel Sichelzellkrise und Hepatitis C. Es

ist bekannt, dass diese abnormalen Blute abnormale Hämoglobine und Störmaterialien für die Hämoglobinmessung enthalten. Die Messergebnisse unter Verwendung der lytischen Reagenzzusammensetzung und dem Verfahren der vorliegenden Erfindung korrelieren jedoch ausgezeichnet mit dem herkömmlichen Cyanid Hgb-Verfahren, wie durch die **Fig. 5** und **6** veranschaulicht wird, wodurch gezeigt wird, dass die Gesamthämaglobinkonzentration der verschiedenen klinischen Proben durch Verwendung der lytischen Reagenzzusammensetzung der vorliegenden Erfindung gemessen werden kann.

[0050] Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung und sollen in keiner Weise derart ausgelegt werden, dass sie den Umfang der Erfindung, so wie er in den Ansprüchen definiert ist, beschränken. Es versteht sich, dass offenbarungsgemäß verschiedene andere Bestandteile und Verhältnisse verwendet werden können.

#### Beispiel 1

[0051] Es wurden die Reagenzien der folgenden Zusammensetzungen hergestellt.

##### Vorschrift 1a

Tetrazol	5,0 g
Tetradecyltrimethylammoniumbromid	15,0 g
auf 1 Liter angepasstes destilliertes Wasser	
pH-Wert	2,77

##### Vorschrift 1b

Tetrazol	10,0 g
Dodecyltrimethylammoniumchlorid (50%ige Lösung)	35,0 ml
Tetradecyltrimethylammoniumbromid	3,5 g
auf 1 Liter angepasstes destilliertes Wasser	
pH-Wert	6,19

##### Vorschrift 1c

Chinaldinsäure	5,0 g
Dodecyltrimethylammoniumchlorid (50%ige Lösung)	50,0 ml
auf 1 Liter angepasstes destilliertes Wasser	
pH-Wert	2,55

##### Vorschrift 1d

Melamin	5,0 g
Tetradecyltrimethylammoniumbromid	3,6 g
Dodecyltrimethylammoniumchlorid (50%ige Lösung)	36,0 ml
auf 1 Liter angepasstes destilliertes Wasser	
pH-Wert	4,55

##### Vorschrift 1e

Tetrazol	5,0 g
Chemfac NB-104 (Komplex-Phosphatester, hergestellt von Chemax, Inc.)	30,0 g
auf 1 Liter angepasstes destilliertes Wasser	
pH-Wert	7,11

[0052] 11,6 µl einer Vollblutprobe wurden mit 2500 µl ISOTON® II verdünnt, dann wurden 403 µl von einer der vorstehenden lytischen Reagenzzusammensetzungen manuell mit der vorher verdünnten Probe gemischt. Das Absorptionsspektrum der Probe wurde dann sofort auf einem Beckman DU 7500 Spektrophotometer gemessen. Die **Fig. 1a** bis **1b** zeigen die Spektren der Blutproben, die entsprechend dem vorstehenden Verfahren unter Verwendung der Vorschriften **1b** und **1c** behandelt worden sind. **Fig. 2** zeigt insgesamt zwölf Spek-

tren, die von einer Blutprobe erhalten wurden, die entsprechend dem vorstehenden Verfahren unter Verwendung der Vorschrift 1a verarbeitet worden ist. Die Spektren wurden von 12 Sekunden bis 12 Stunden nach der Zugabe der lytischen Reagenzzusammensetzung mit einem zeitlichen Abstand von einer Stunde erfasst.

### Beispiel 2

[0053] Es wurde ein Reagenz mit der folgenden Zusammensetzung hergestellt.

Tetrazol	5,0 g
Dodecyltrimethylammoniumchlorid (50%ige Lösung)	36,0 ml
Tetradecylammoniumbromid	3,6 g
destilliertes Wasser	1 Liter
pH-Wert	2,73

[0054] 11,6 µl einer Vollblutprobe wurden mit 2500 µl eines Blutverdünnungsmittels verdünnt, dann wurden 403 µl der vorstehenden Vorschrift manuell mit der vorher verdünnten Probe gemischt. Das Absorptionsspektrum der Probe wurde dann sofort auf einem Beckman DU 7500 Spektralphotometer gemessen. Für die Hämoglobinmessung wurden fünf handelsübliche Blutverdünnungsmittel verwendet, das heißt COULTER® ISOTON® III, COULTER® ISOTON® II, Technicon H™ Systems RBC DIL (ein handelsübliches Produkt von Technicon Instruments Corp.), die Phosphat-gepufferte Standardsalzlösung und die Natriumchlorid Standardsalzlösung. Das gebildete Chromogen weist einen maximalen Absorptionspeak bei ungefähr 540 nm mit einer Schulter bei ungefähr 565 nm auf. Die maximale Absorption des Chromogen unterscheidet sich nur schwach bei der Verwendung von verschiedenen Verdünnungsmitteln, das heißt 540 nm mit ISOTON® III, 539 nm mit ISOTON® II, Technicon H™ Systems RBC DIL und der Phosphat-gepufferten Standardsalzlösung und 538 nm mit der Natriumchlorid Standardsalzlösung. Das Chromogen bildete sich sofort nach der Reaktion der vorstehenden lytischen Reagenzzusammensetzungen, in von 8 Sekunden bis ungefähr 35 Sekunden in Abhängigkeit von dem verwendeten Blutverdünnungsmittel. **Fig. 3** zeigt die Spektren, die nach dem vorstehenden Verfahren erhalten wurden, unter Verwendung der Phosphat-gepufferten Standardsalzlösung und ISOTON® III als Verdünnungsmittel.

### Beispiel 3

[0055] Es wurden die Reagenzien der folgenden Zusammensetzungen hergestellt.

#### Vorschrift 3a

Tetrazol	5,0 g
Tetradecyltrimethylammoniumbromid	15,0 g
auf 1 Liter angepasstes destilliertes Wasser	
pH-Wert	12,06

#### Vorschrift 3b

Anilin-2-sulfonsäure	5,0 g
Tetradecyltrimethylammoniumbromid	10,0 g
Ketyltrimethylammoniumbromid	4,0 g
destilliertes Wasser	1 Liter
pH-Wert	1,67

#### Vorschrift 3c

Chinaldinsäure	5,0 g
Dodecyltrimethylammoniumchlorid (50%ige Lösung)	40,0 ml
destilliertes Wasser	1 Liter
pH-Wert	2,58

[0056] Ungefähr 70 Blutproben, deren Hämoglobinkonzentration im Bereich von 6 bis 17 g/dl lagen und deren Leukozytenzahl im Bereich von 1000/µl bis 40000/µl lag, wurden auf einem kalibrierten COULTER® STKS Gerät bei einer Standard Gerätekonfiguration gemessen, mit der Ausnahme, dass das lytische Reagenz, das LYSE S® III diff durch die vorstehenden Formulierungen ersetzt worden ist. Für jede Vorschrift waren ungefähr

die Hälfte der Proben klinische Proben, die verschiedene Krankheiten umfassten. Im Falle der Vorschrift 3a waren 70% der Proben klinische Proben. **Fig. 5** zeigt die Korrelationen zwischen der Hämoglobinkonzentration und den Leukozytenzahlen (aufgezeichnet als WBC in  $10^3/\mu\text{l}$ ), die unter Verwendung des Referenzreagens LYSE S® III diff erhalten wurden, und die Ergebnisse, die unter Verwendung der Vorschrift 3a auf demselben Gerät erhalten wurden. **Fig. 6** zeigt die Korrelationen zwischen der Hämoglobinkonzentration und den Leukozytenzahlen, die unter Verwendung des lytischen Reagens LYSE S® III diff erhalten wurden, und die Ergebnisse, die unter Verwendung der Vorschrift 3b auf demselben Gerät erhalten wurden.

[0057] Die **Fig. 5** und **6** zeigen zwischen den lytischen Reagenzzusammensetzungen der vorliegenden Erfindung und dem herkömmlichen Cyanid enthaltenden lysierenden Reagenz ausgezeichnete lineare Korrelationen in der Hämoglobinkonzentration und den WBC-Messungen.

#### Beispiel 4

[0058] Es wurden die Reagenzien der folgenden Zusammensetzungen hergestellt. Lytisches Reagenz

##### Vorschift 4a

Triazol	10,0 g
Dodecyltrimethylammoniumchlorid (50%ige Lösung)	35,0 ml
Tetradecyltrimethylammoniumbromid	3,5 g
auf 1 Liter angepasstes destilliertes Wasser	
pH-Wert	6,39

##### Vorschift 4b

Kaliumsalz der Oxonsäure	5,0 g
Dodecyltrimethylammoniumchlorid (50%ige Lösung)	35,0 ml
Tetradecyltrimethylammoniumbromid	3,5 g
auf 1 Liter angepasstes destilliertes Wasser	
der pH-Wert wurde mit HCl auf 2,3 eingestellt	

##### Verdünnungsmittel

Natriumsulfat	9,7 g
Natriumchlorid	4,0 g
auf 1 Liter angepasstes destilliertes Wasser	
der pH-Wert wurde mit 1%iger NaOH auf 7,14 eingestellt	

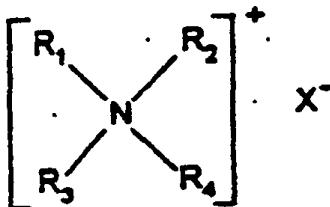
[0059] 85 Blutproben, deren Hämoglobinkonzentration im Bereich von 6 bis ungefähr 17 g/dl lagen und deren Leukozytenzahl im Bereich von  $1500/\mu\text{l}$  bis  $45000/\mu\text{l}$  lag, wurden auf einem kalibrierten COULTER COUNTER® Modell S-Plus IV bei einer Standard Gerätekonfiguration gemessen, wobei die Referenzreagenzien, LYSE S® III diff und ISOTON® III verwendet wurden. Dann wurden dieselben Proben nochmals auf demselben Gerät analysiert, mit der Ausnahme, dass das lytische Reagenz, LYSE S® III diff durch die vorstehenden lytischen Reagenzzusammensetzung ersetzt wurde und ISOTON® III durch das vorstehende Verdünnungsmittel ersetzt wurde. **Fig. 4** zeigt die Histogramme der Leukozytensubpopulationsverteilung von 4 dieser Blutproben, die auf dem COULTER COUNTER® Modell S-Plus IV erhalten wurden. Die **Fig. 4a** und **4b** wurden unter Verwendung der Vorschift 4a und dem vorstehenden Verdünnungsmittel erhalten, wobei **Fig. 4a** ein Histogramm von einem normalen Blut zeigt und **Fig. 4b** ein Histogramm von einem Blut mit vermehrten Monozyten zeigt. Die **Fig. 4c** und **4d** wurden unter Verwendung der Vorschift 4b und ISOTON® III erhalten, wobei **Fig. 4c** ein Histogramm von normalem Blut zeigt und **Fig. 4d** ein Histogramm von einer klinischen Probe mit mehr als 90% Granulozyten zeigt. Die **Fig. 7a** bis **7e** zeigen die Korrelationen zwischen der Anzahl der Leukozyten (aufgezeichnet als WBC in  $10^3/\mu\text{l}$ , **Fig. 7a**), der Lymphozyten % (**Fig. 7b**), der Monozyten % (**Fig. 7c**), der Granulozyten % (**Fig. 7d**) und der Hämoglobinkonzentration (**Fig. 7e**), die unter Verwendung der Referenzreagenzien erhalten wurden und diejenigen, die unter Verwendung der Vorschift 4a und dem vorstehenden Verdünnungsmittel erhalten wurden. Die Korrelationskoeffizienten, so wie die Steigungen und Achsenabschnitte der Regressionslinien zeigen ausgezeichnete lineare Korrelationen für die Hämoglobinkonzentration, WBC, Lymphozyten % und Granulozyten % und eine gute Korrelation für Monozyten %.

**Patentansprüche**

1. Cyanidfreie lytische Reagenzzusammensetzung, umfassend eine wässrige Lösung von

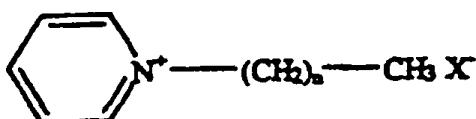
(I) mindestens einem grenzflächenaktiven Mittel in einer ausreichenden Menge, um Erythrozyten zu hämolsieren und Hämoglobin zu einer Bestimmung der Hämoglobinkonzentration freizusetzen, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus

(a) quartären Ammoniumsalzen, dargestellt durch folgende Molekularstruktur



worin R<sub>1</sub> eine Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinylgruppe mit 10 bis 18 Kohlenstoffatomen ist, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> und R<sub>4</sub> Alkylgruppen mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen sind und X<sup>-</sup> Chlorid- und Bromidanionen ist,

(b) Pyridiniumsalzen, dargestellt durch folgende Molekularstruktur



worin n eine ganze Zahl von 7 bis 12 ist und X<sup>-</sup> eine anionische Gruppe ist,

(c) Alkylsulfonsäure oder Alkalimetallsalzen von Alkylsulfonaten und

(d) organischen Phosphatestern oder Alkalimetallsalzen von organischen Phosphatestern und

(II) einem organischen Liganden in einer ausreichenden Menge, um ein stabiles Chromogen mit Hämoglobin zu bilden, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus

(a) Triazol und dessen Derivaten und

(b) Tetrazol und dessen Derivaten,

und wobei der pH der lytischen Reagenzzusammensetzung im Bereich von 1 bis 13 ist.

2. Lytische Reagenzzusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das grenzflächenaktive Mittel ein quartäres Ammoniumsalz mit einer Konzentration im Bereich von etwa 2 g/l bis etwa 250 g/l umfaßt.

3. Lytische Reagenzzusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das grenzflächenaktive Mittel ein Pyridiniumsalz mit einer Konzentration im Bereich von etwa 2 g/l bis etwa 130 g/l umfaßt.

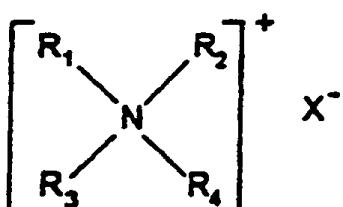
4. Lytische Reagenzzusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das grenzflächenaktive Mittel eine Alkylsulfonsäure oder ein Alkalimetallsalz eines Alkylsulfonats mit einer Konzentration im Bereich von etwa 8 g/l bis etwa 30 g/l umfaßt.

5. Lytische Reagenzzusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das grenzflächenaktive Mittel einen organischen Phosphatester oder ein Alkalimetallsalz eines organischen Phosphatesters mit einer Konzentration im Bereich von etwa 15 g/l bis etwa 70 g/l umfaßt.

6. Lytische Reagenzzusammensetzung nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei der organische Ligand Konzentrationen in einem Bereich von etwa 1 g/l bis etwa 30 g/l aufweist.

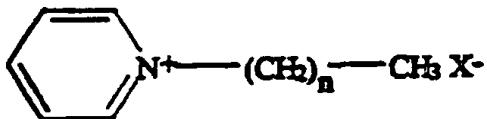
7. Cyanidfreie lytische Reagenzzusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das grenzflächenaktive Mittel aus der Gruppe, bestehend aus

(a) quartären Ammoniumsalzen, dargestellt durch folgende Molekularstruktur



worin R<sub>1</sub> eine Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinylgruppe mit 10 bis 18 Kohlenstoffatomen ist, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> und R<sub>4</sub> Alkylgruppen mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen sind und X<sup>-</sup> Chlorid- und Bromidanionen ist,

pen mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen sind und  $X^-$  Chlorid- und Bromidanionen ist, und  
 (b) Pyridiniumsalzen, dargestellt durch folgende Molekularstruktur



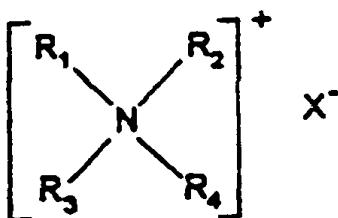
worin n eine ganze Zahl von 7 bis 12 ist und  $X^-$  eine anionische Gruppe ist, ausgewählt ist, und wobei das grenzflächenaktive Mittel in einer ausreichenden Menge vorliegt, um Erythrozyten zu hämolsieren und Hämoglobin zu einer Bestimmung der Hämoglobinkonzentration freizusetzen und Leukozytenzellkerne zu einer Bestimmung der Leukozytenanzahl zu erhalten.

8. Lytische Reagenzzusammensetzung nach Anspruch 7, wobei das grenzflächenaktive Mittel ein quartäres Ammoniumsalz mit einer Konzentration im Bereich von etwa 4 g/l bis etwa 150 g/l umfaßt.

9. Lytische Reagenzzusammensetzung nach Anspruch 7, wobei das grenzflächenaktive Mittel ein Pyridiniumsalz mit einer Konzentration im Bereich von etwa 2 g/l bis 130 g/l umfaßt.

10. Lytische Reagenzzusammensetzung nach Anspruch 7, wobei der organische Ligand Konzentrationen in einem Bereich von etwa 1 g/l bis etwa 30 g/l aufweist.

11. Cyanidfreie lytische Reagenzzusammensetzung nach Anspruch 7, wobei  
 (I) das grenzflächenaktive Mittel ein quartäres Ammoniumsalz ist, dargestellt durch folgende Molekularstruktur



worin  $R_1$  eine Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinylgruppe mit 10 bis 18 Kohlenstoffatomen ist,  $R_2$ ,  $R_3$  und  $R_4$  Alkylgruppen mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen sind und  $X^-$  Chlorid- oder Bromidanionen ist, wobei das grenzflächenaktive Mittel in einer ausreichenden Menge vorliegt, um Erythrozyten zu hämolsieren und Hämoglobin zu einer Bestimmung der Hämoglobinkonzentration freizusetzen und Leukozytenzellkerne zu einer differentiellen Analyse der Leukozyten zu erhalten, und

(II) der organische Ligand in einer ausreichenden Menge, um ein stabiles Chromogen mit Hämoglobin zu bilden, aus Triazol und dessen Derivaten ausgewählt ist, und wobei der pH der lytischen Reagenzzusammensetzung im Bereich von 2 bis 10 ist.

12. Lytische Reagenzzusammensetzung nach Anspruch 11, wobei das quartäre Ammoniumsalz eine Konzentration im Bereich von etwa 4 g/l bis etwa 50 g/l aufweist.

13. Lytische Reagenzzusammensetzung nach Anspruch 11, wobei der organische Ligand Konzentrationen in einem Bereich von etwa 1 g/l bis etwa 30 g/l aufweist.

14. Verfahren zur Messung der Gesamthämoglobinkonzentration einer Blutprobe unter Verwendung der cyanidfreien, lytischen Reagenzzusammensetzung nach einem vorhergehenden Anspruch, umfassend  
 (a) das Verdünnen einer Blutprobe mit einem Blutverdünnungsmittel,

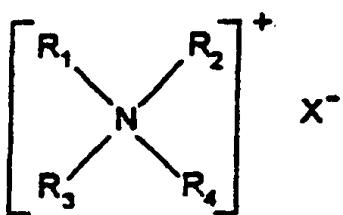
(b) das Mischen der verdünnten Blutprobe mit der cyanidfreien, lytischen Reagenzzusammensetzung nach Anspruch 1, um Erythrozyten zu lysieren und ein stabiles Hämoglobinchromogen zu bilden,  
 (c) das Messen der Extinktion des gebildeten Hämoglobinchromogens bei einer vorherbestimmten Wellenlänge,

(d) das Bestimmen der Gesamthämoglobinkonzentration der Blutproben aus der gemessenen Extinktion des Hämoglobinchromogens, und

(e) das Aufzeichnen der Gesamthämoglobinkonzentration der Blutprobe.

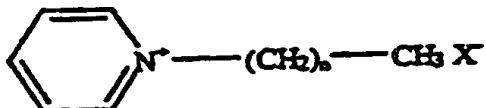
15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Extinktion der Blutprobe zwischen etwa 510 nm und etwa 560 nm gemessen wird.

16. Verfahren nach Anspruch 14 oder Anspruch 15, wobei das grenzflächenaktive Mittel in der lytischen Reagenzzusammensetzung aus der Gruppe, bestehend aus  
 (a) quartären Ammoniumsalzen, dargestellt durch folgende Molekularstruktur



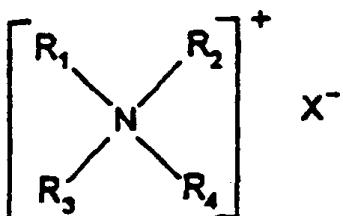
worin  $R_1$  eine Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinylgruppe mit 10 bis 80 Kohlenstoffatomen ist,  $R_2$ ,  $R_3$  und  $R_4$  Alkylgruppen mit ein bis vier Kohlenstoffatomen sind und  $X^-$  Chlorid- oder Bromidanionen ist, und

- (b) Pyridiniumsalzen, dargestellt durch folgende Molekularstruktur



worin  $n$  eine ganze Zahl von 7 bis 12 ist und  $X^-$  eine anionische Gruppe ist, ausgewählt ist, und wobei das grenzflächenaktive Mittel in einer ausreichenden Menge vorliegt, um Erythrozyten zu hämolsieren und Hämoglobin zu einer Bestimmung der Hämoglobinkonzentration freizusetzen und Leukozytenzellkerne zu einer Bestimmung der Leukozytenanzahl zu erhalten, und weiter die Schritte umfaßt von  
 das Zählen der Leukozytenanzahl in einem automatisierten Blutanalysator unter Verwendung einer DC-Impe-  
 danzmessung, und  
 das Aufzeichnen der Leukozytenanzahl der Blutprobe.

17. Verfahren nach Anspruch 14 oder Anspruch 15, wobei  
 (I) das grenzflächenaktive Mittel ein quartäres Ammoniumsalz ist, dargestellt durch folgende Molekularstruktur



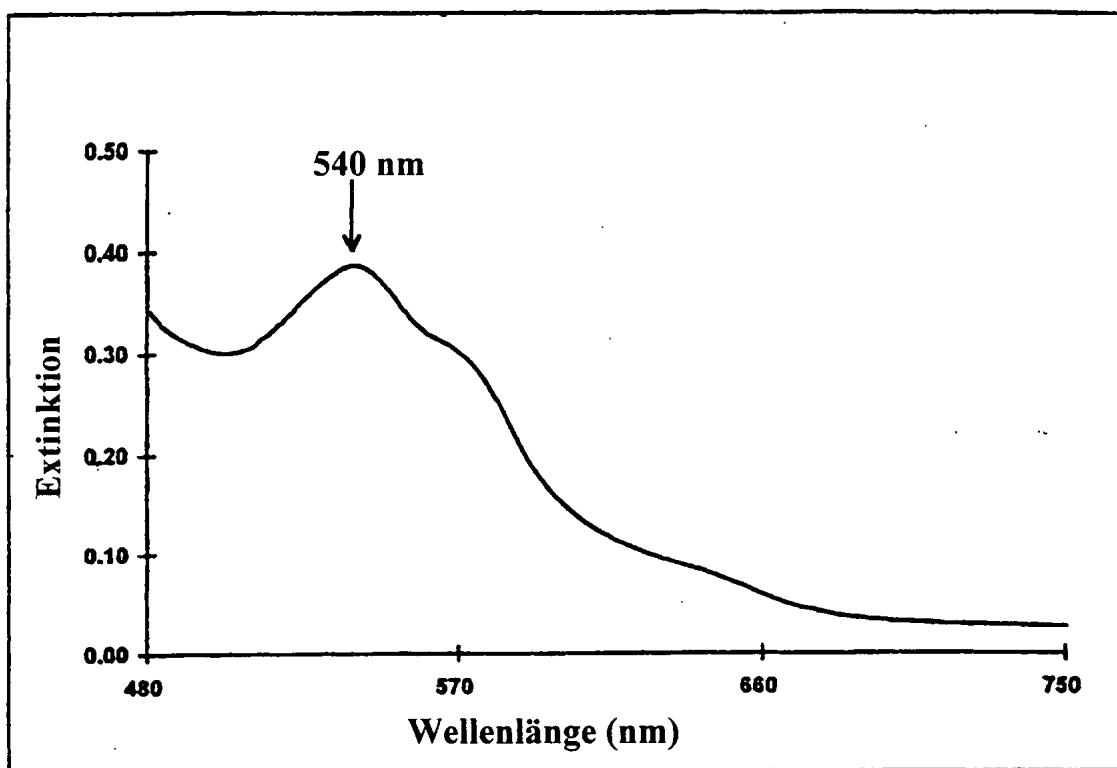
worin  $R_1$  ein Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinylgruppe mit 10 bis 18 Kohlenstoffatomen ist,  $R_2$ ,  $R_3$  und  $R_4$  Alkylgruppen mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen sind und  $X^-$  Chlorid- oder Bromidanionen ist, wobei das grenzflächenaktive Mittel in einer ausreichenden Menge vorliegt, um Erythrozyten zu hämolsieren und Hämoglobin zu einer Bestim-  
 mung der Hämoglobinkonzentration freizusetzen und Leukozytenpopulationenzellkerne zu einer differentiellen Analyse der Leukozyten zu erhalten, und

(II) der organische Ligand in einer ausreichenden Menge, um ein stabiles Chromogen mit Hämoglobin zu bilden, aus

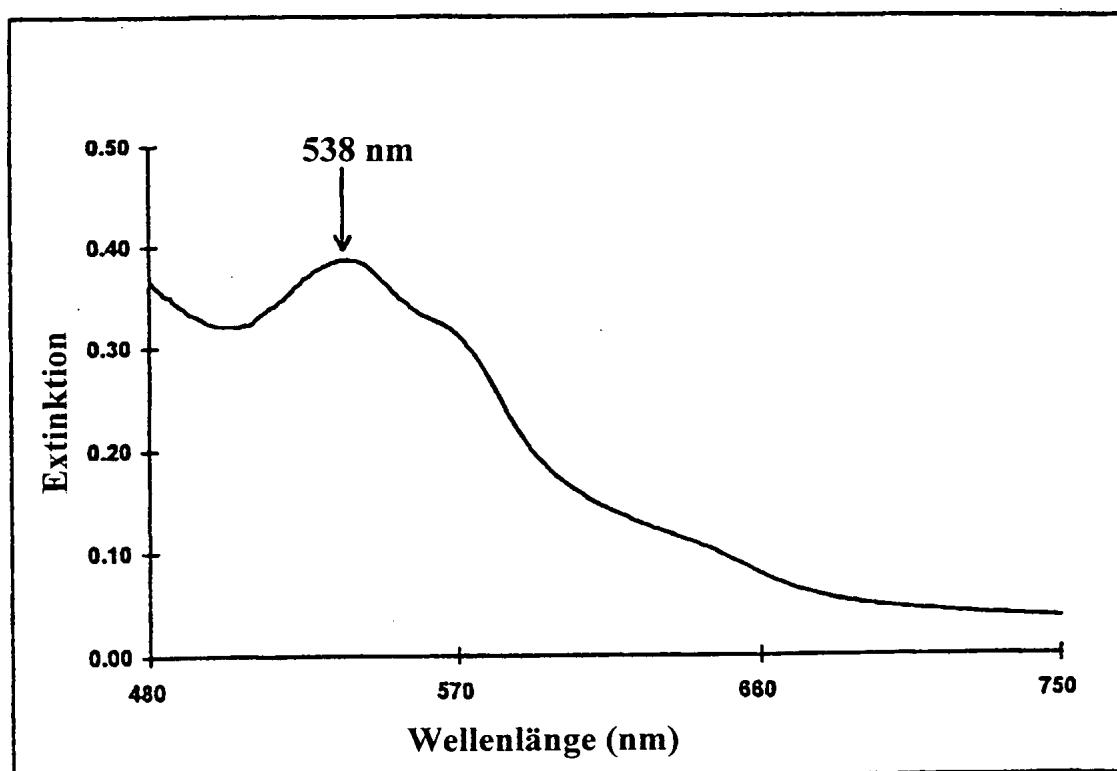
- (a) Triazol und dessen Derivaten ausgewählt ist,  
 und wobei der pH der lytischen Reagenzzusammensetzung im Bereich von 2 bis 10 ist, und weiter die Schritte umfaßt von  
 das Zählen der Leukozytenanzahl in einem automatisierten Blutanalysator unter Verwendung einer DC-Impe-  
 danzmessung,  
 das Unterscheiden der Leukozytenpopulationen nach einem Populationsverteilungshistogramm und  
 das Aufzeichnen der Leukozytenanzahl und Leukozytenpopulationen.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

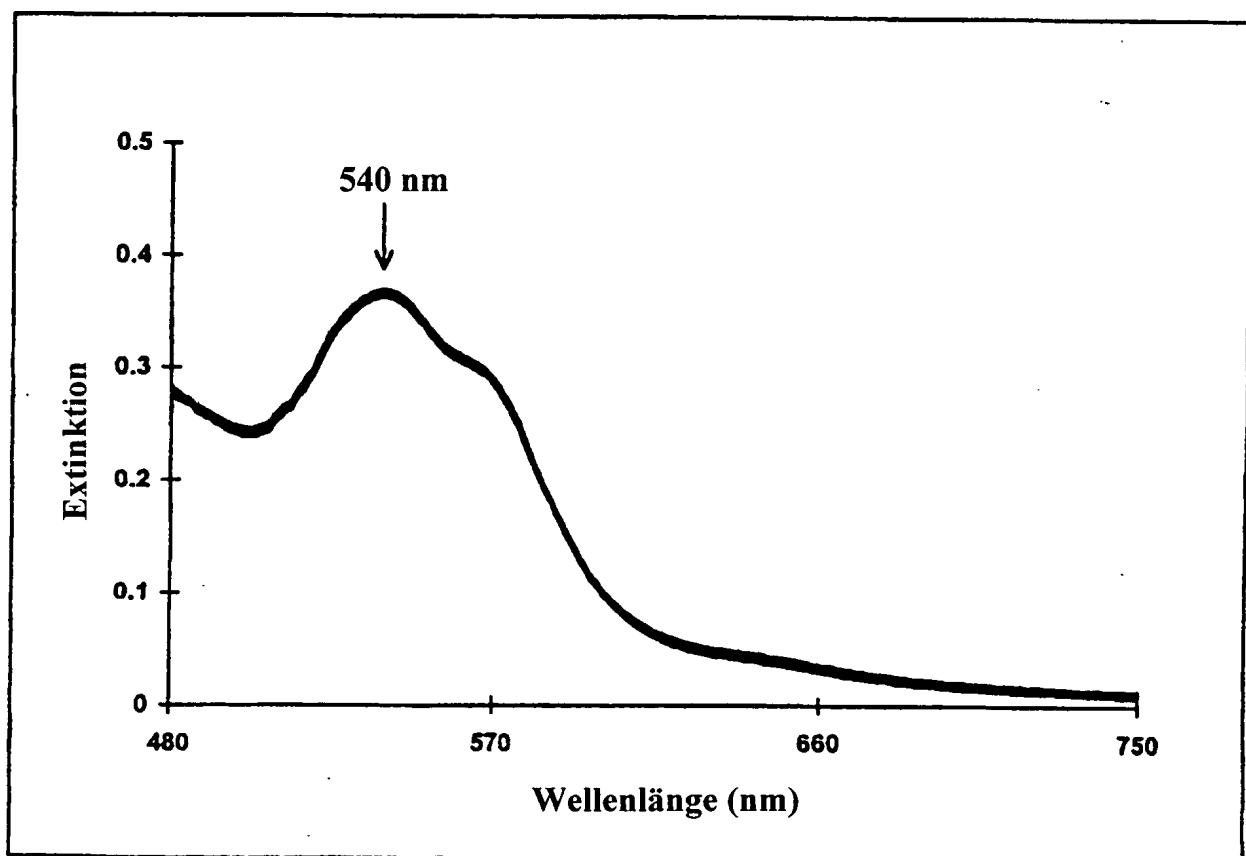
Anhängende Zeichnungen



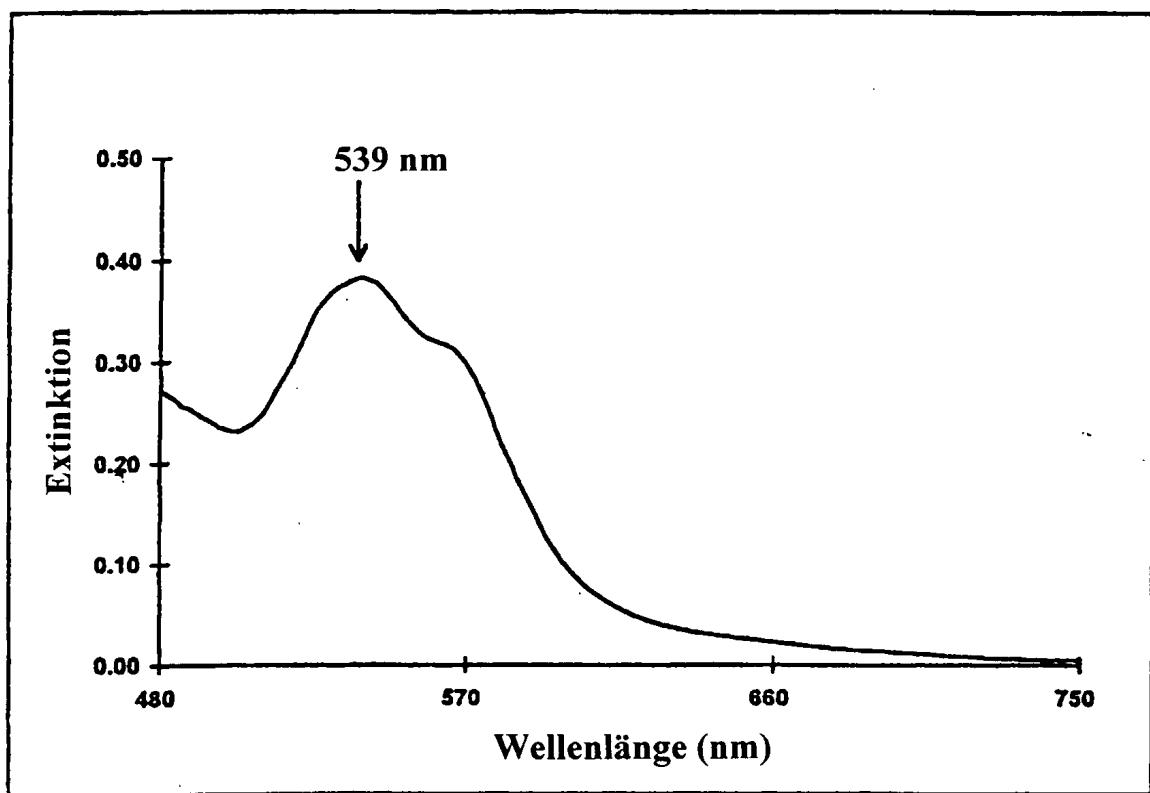
Figur 1a



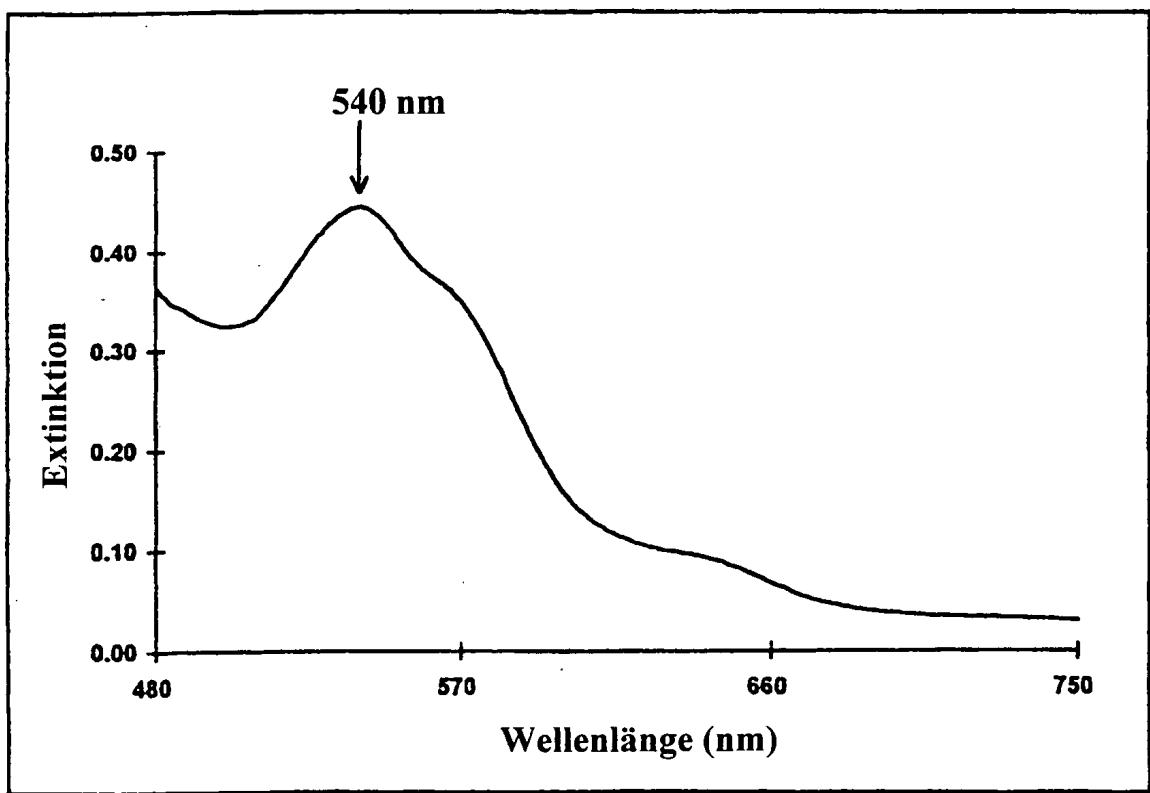
Figur 1b



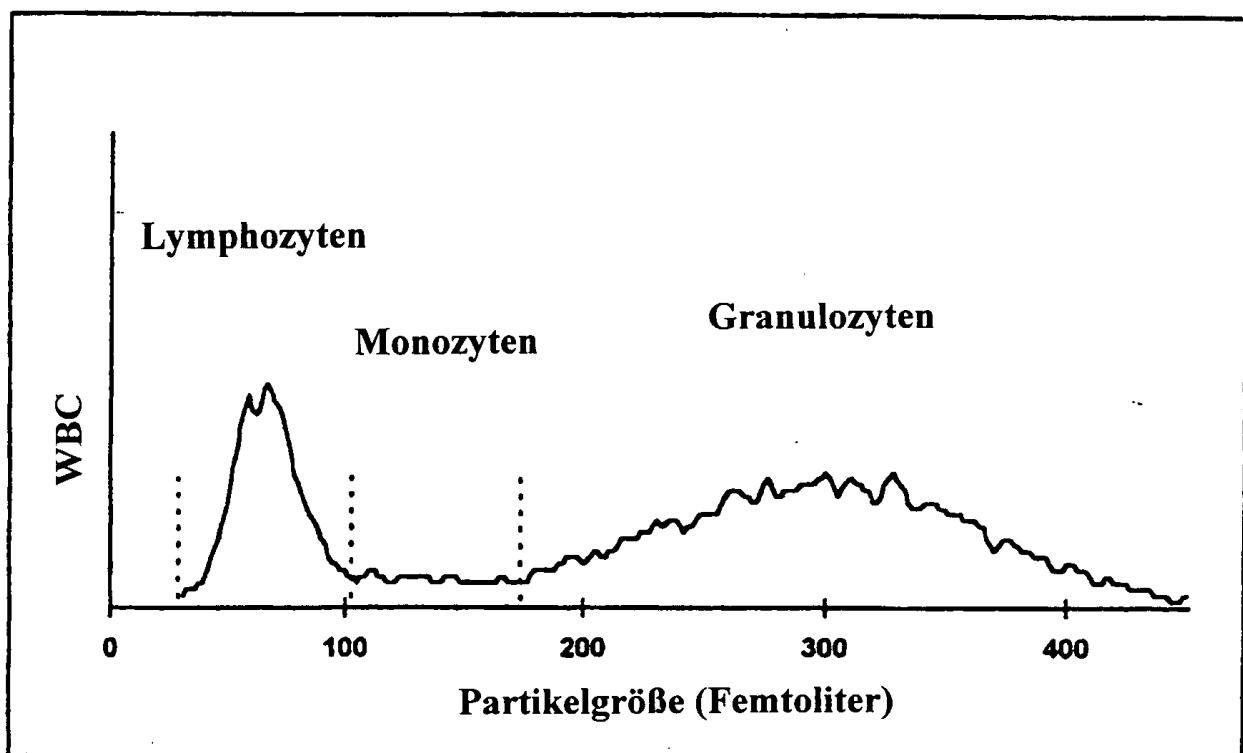
Figur 2



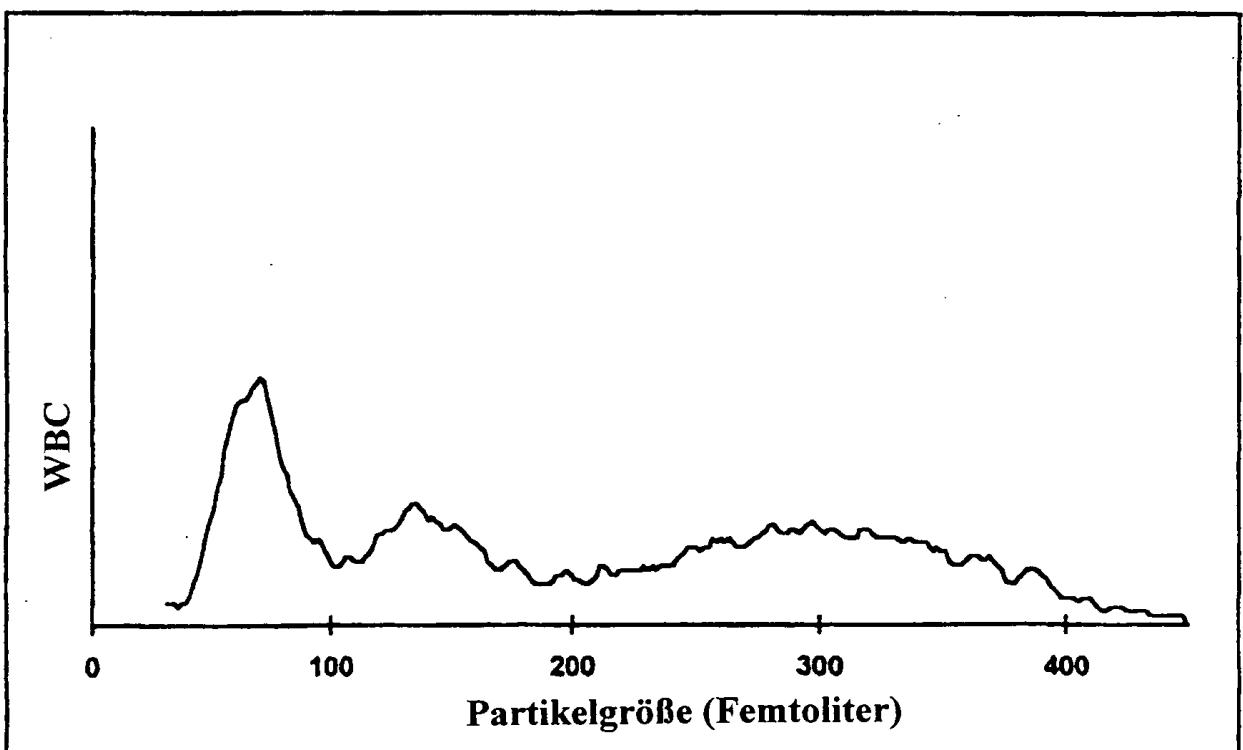
Figur 3a



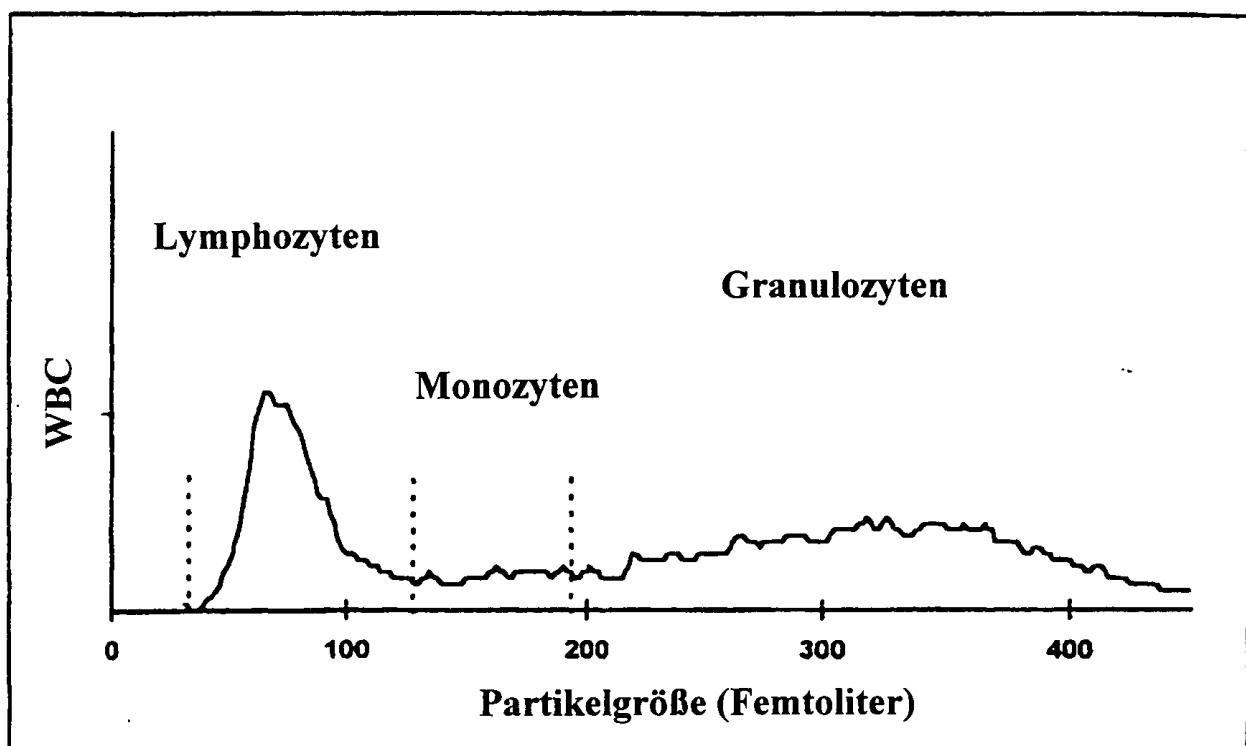
Figur 3b



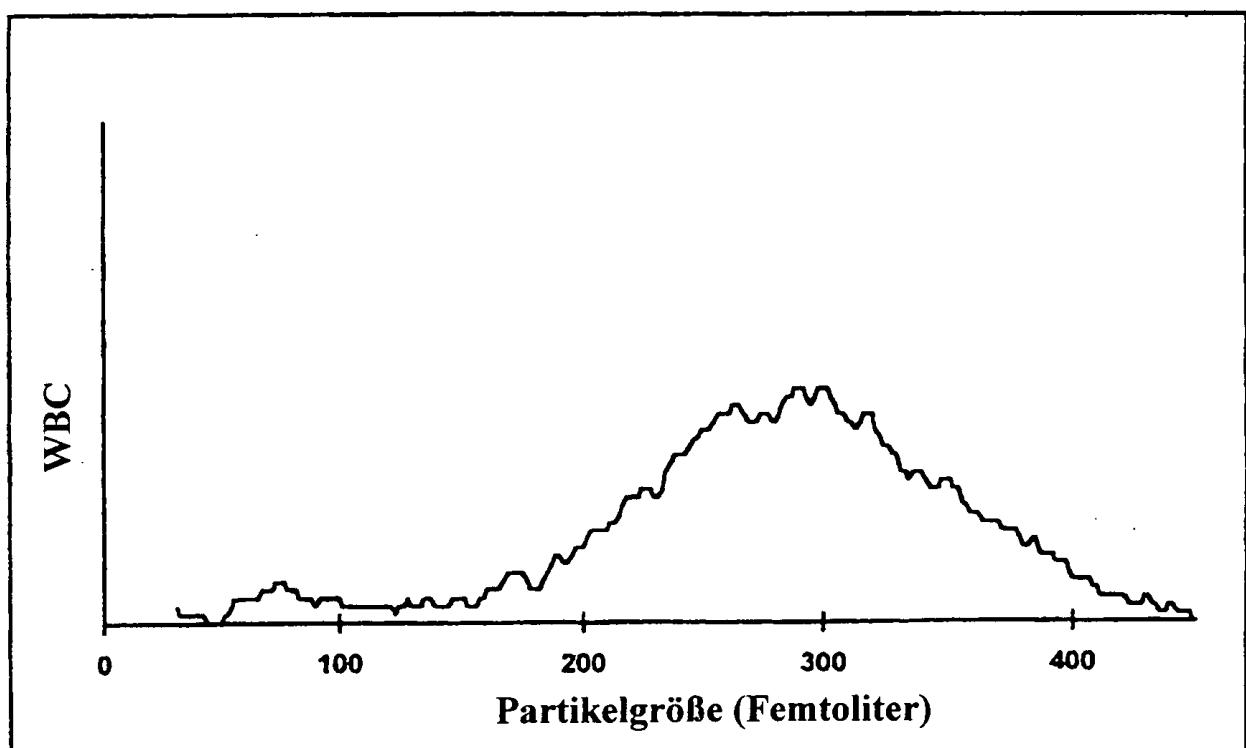
Figur 4a



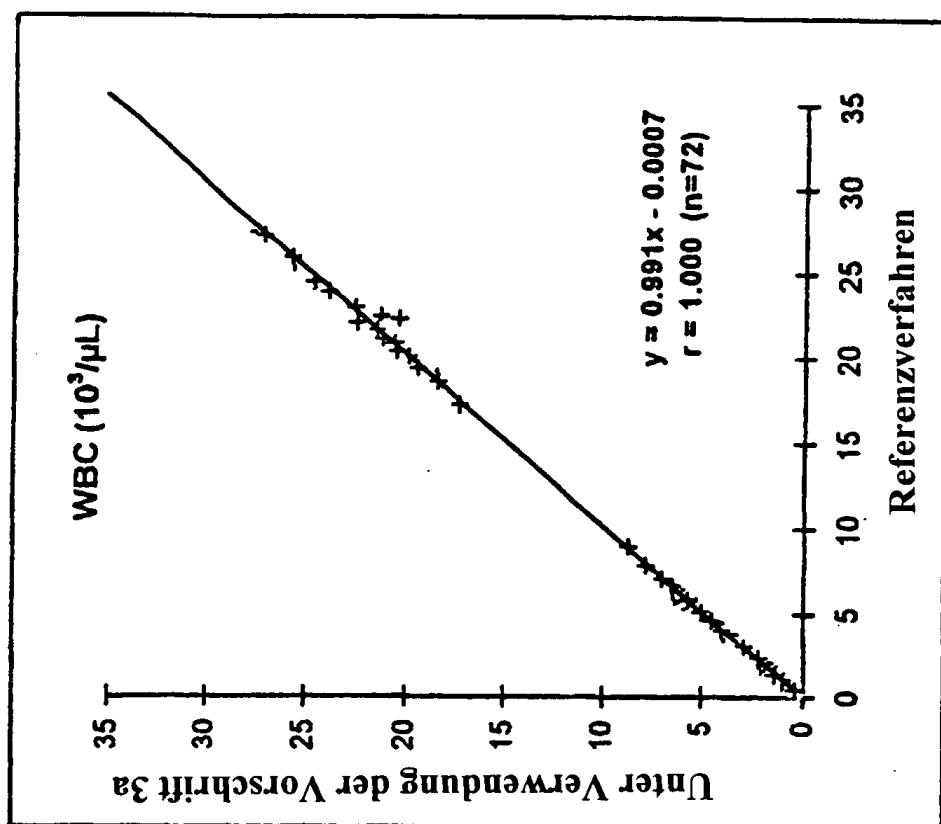
Figur 4b



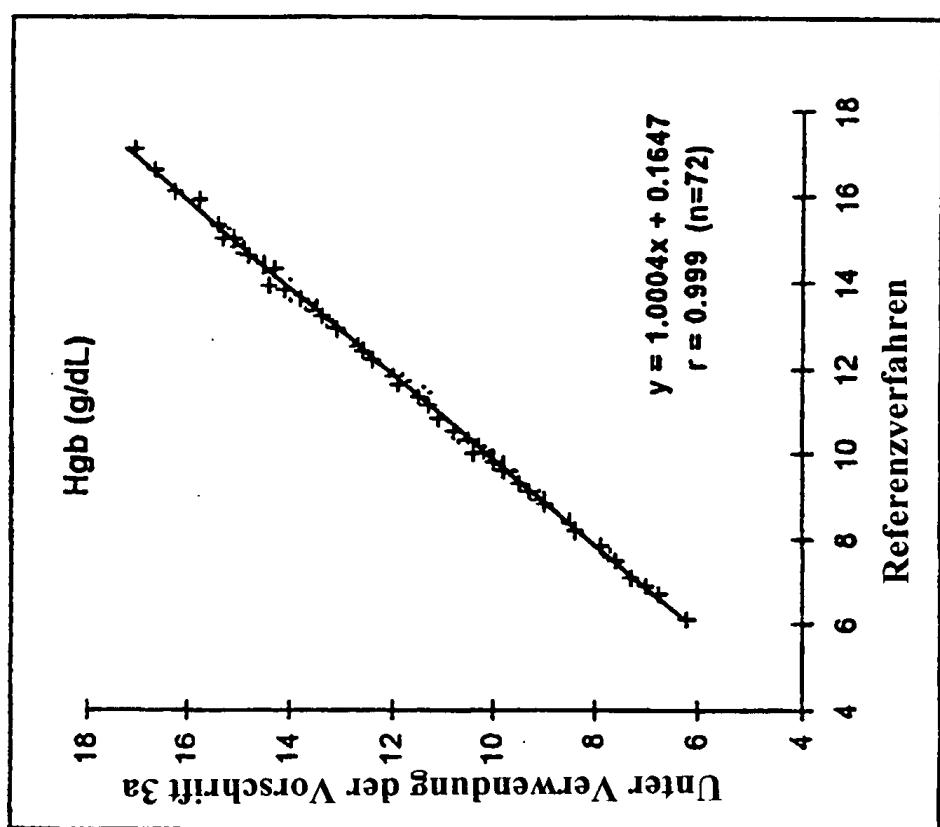
**Figur 4c**



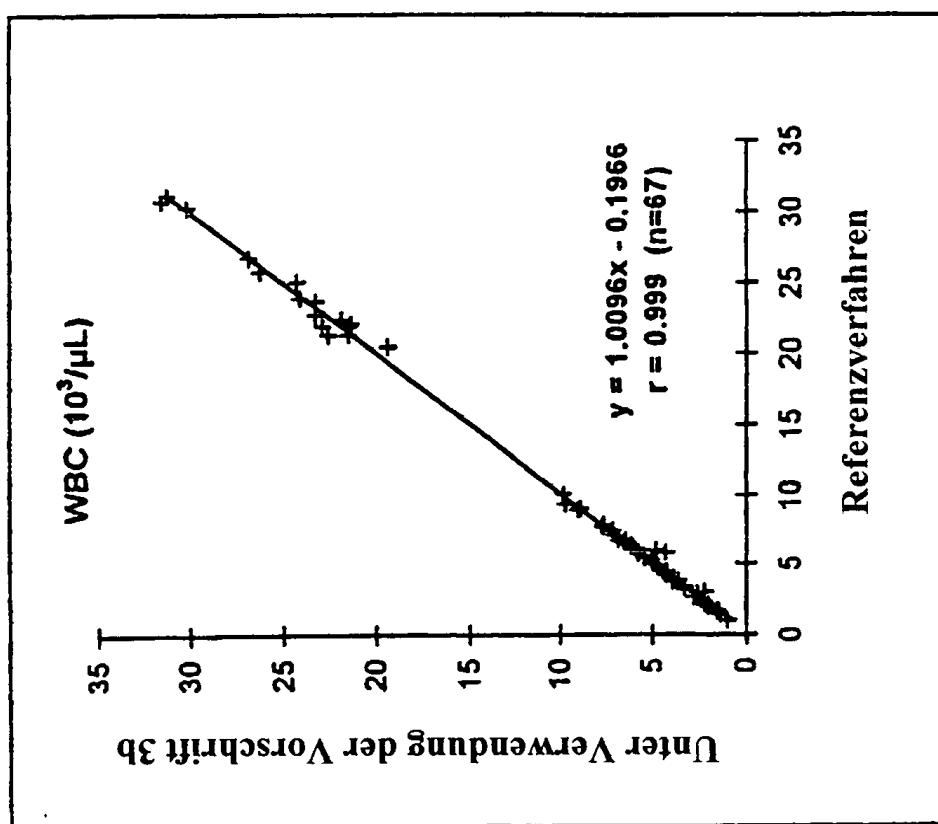
**Figur 4d**



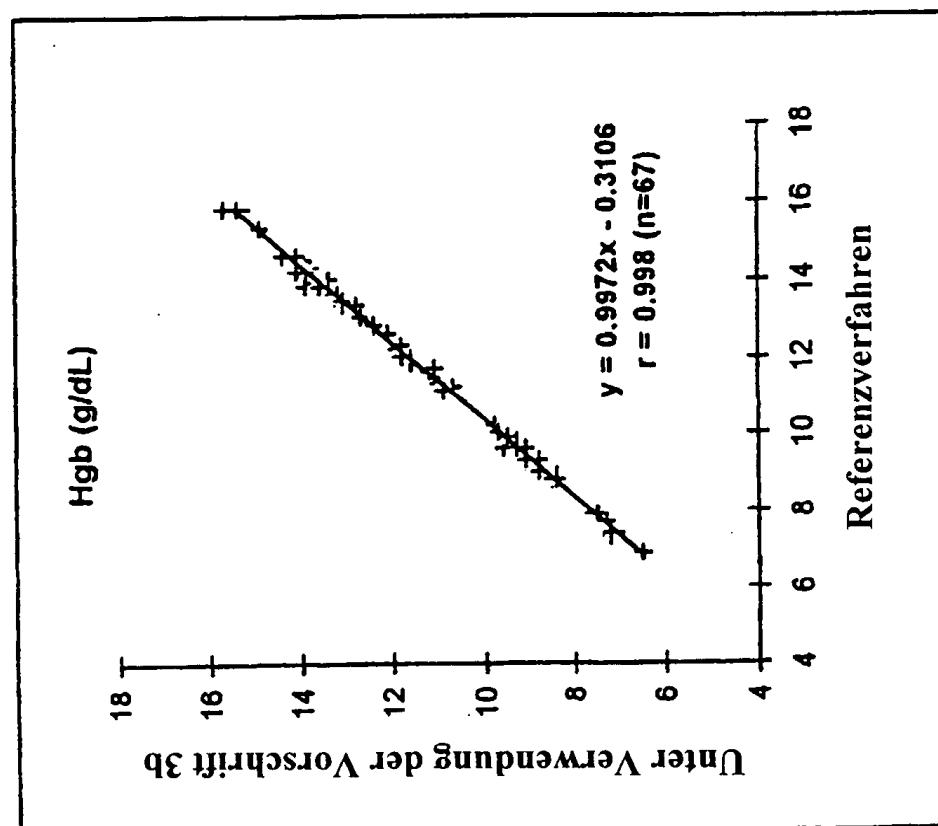
Figur 5b



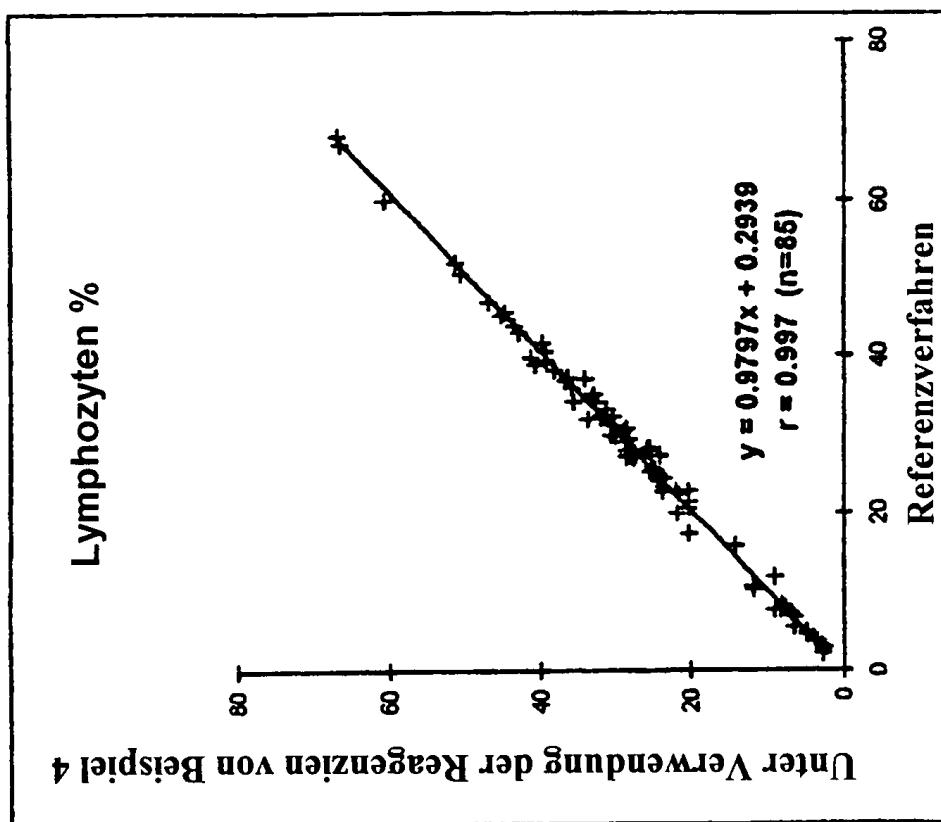
Figur 5a



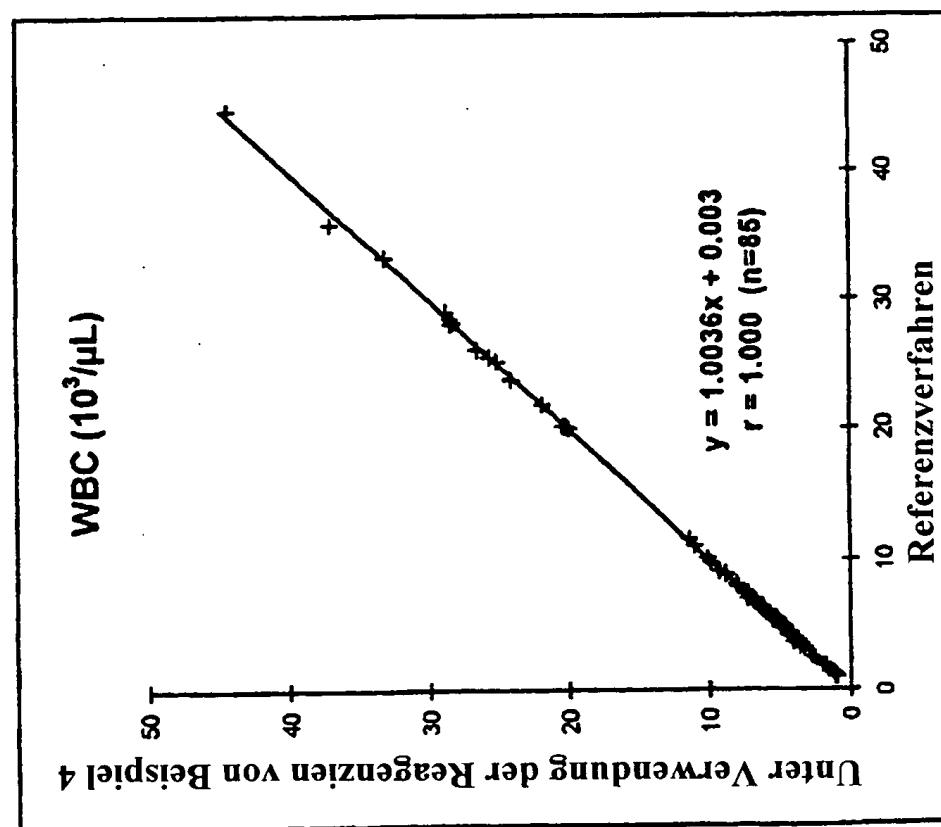
Figur 6b



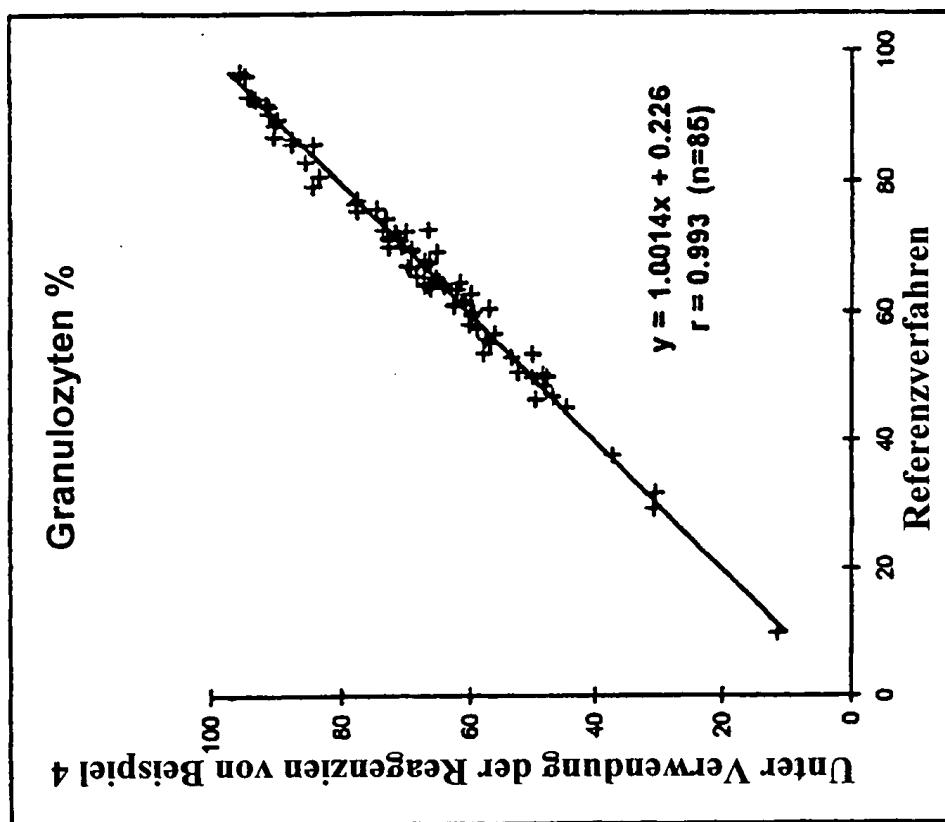
Figur 6a



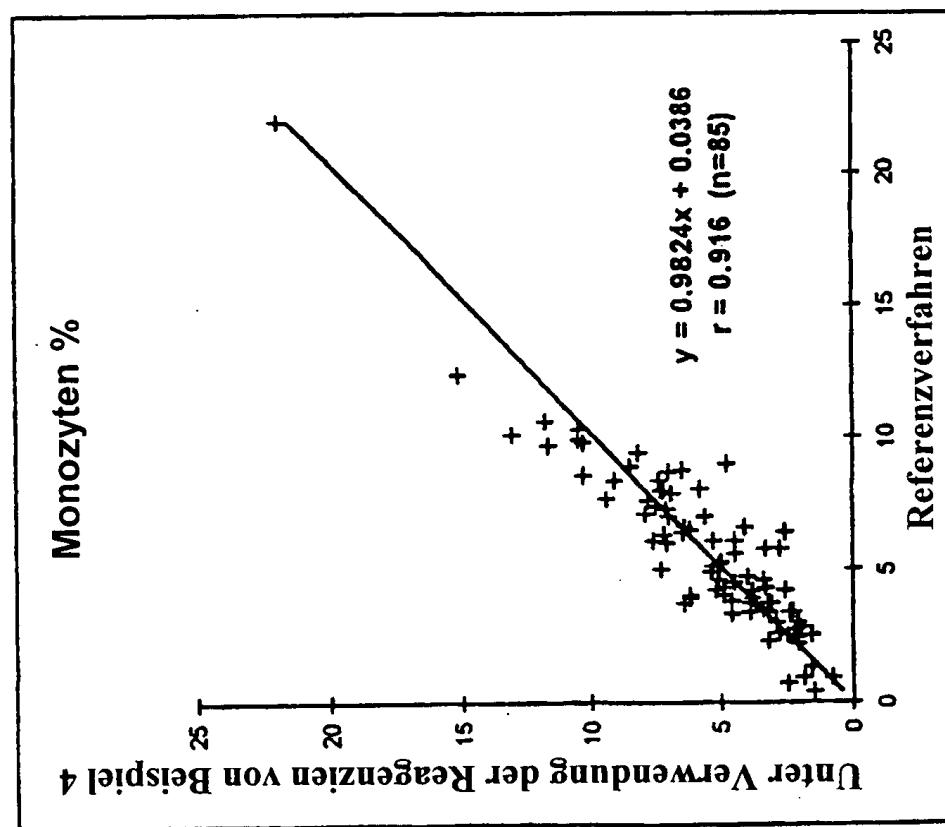
Figur 7b



Figur 7a



Figur 7d



Figur 7c

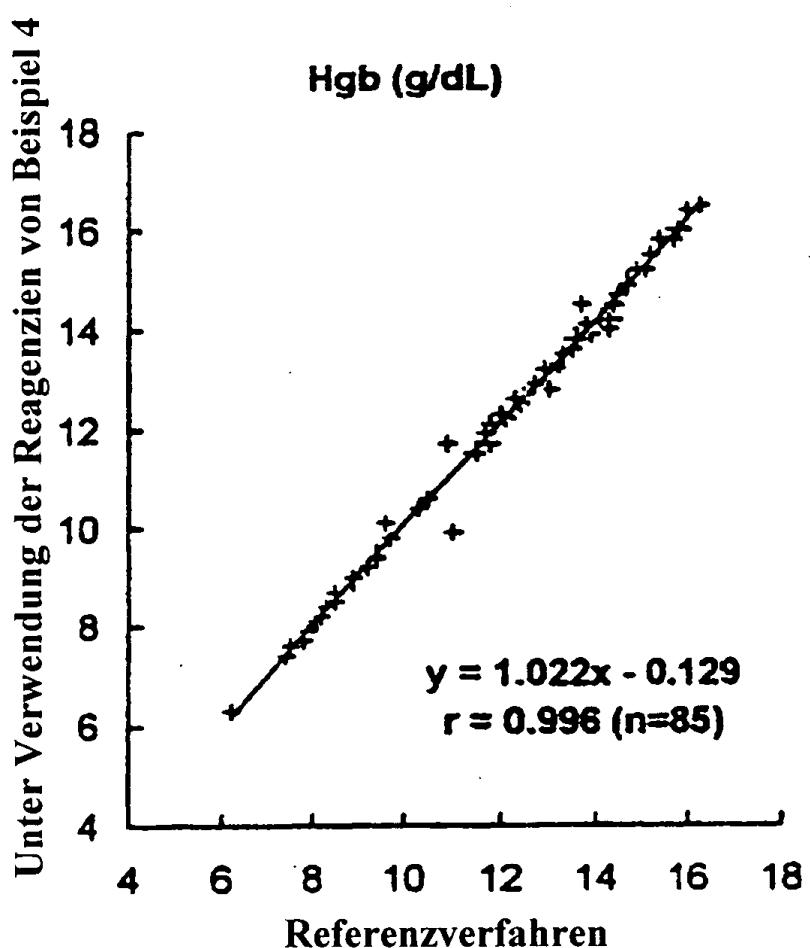


Fig. 7e