



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

259884
(11) (B2)

- {22} Přihlášeno 07 11 85
{21} {PV 8019-85}
{32} {31} {33} Právo přednosti od 10 11 84
{34 41 149.6}
Německá spolková republika
{40} Zveřejněno 15 03 88
{45} Vydáno 15 05 89

{51} Int. Cl.⁴
G 01 N 33/48//
G 01 N 33/49

{72}
Autor vynálezu LIMBACH BERTHOLD dr., HELGER ROLAND dr., DARMSTADT (NSR)

{73}
Majitel patentu MERCK PATENT GESELLSCHAFT MIT BESCHRÄNKTER HAFTUNG,
DARMSTADT (NSR)

(54) Způsob dělení krve

1

2

Vzorek krve se nanese na matrici impregnovanou lektinem a oddělí se plazma nebo sérum, přičemž se matrice sestávající ze svého materiálu s relativním odporem proudění až 40 % a napuštěná vzorkem krve 2 až 10× propláchne isotonickým roztokem pufru o pH v rozmezí 5,0 až 10,5 jako ředidlem. Matrice se výhodně propláchne ředidlem protiběžně. Jako matrice se použije savý materiál z bavlněné tkaniny, smíšené tkaniny obsahující bavlnu, celulózy, viskózy nebo materiálu obsahujícího tyto složky. Bavlněná tkanina se použije o hustotě nití 10 až 25 (osnova) a 10 až 20 (útek) nití/cm a plošné hmotnosti 100 až 400 g/m². Matrice může sestávat z více vrstev, přičemž se vrstva nejvzdálenější od naneseného vzorku může hydrofobovat. Při dělení se stanovená látka reprodukovatelně vypláchne, aniž by nastala analýzu rušící hemolýza. Způsob umožňuje dělení krve s malým množstvím vzorku a v krátké době.

Vynález se týká způsobu dělení krve a způsobu jednoduchého oddělení plazmy nebo séra z krve při současném zředění ředidlem.

Kvantitativní analýza biologických látek přítomných v krvi má pro klinickou chemii rozhodující význam. Jako protiklad analýzy jiných tělesných tekutin, jako moči, je však přímé stanovení těchto látek v krvi možné pouze v určitých případech. Obvykle se musí před vlastní analýzou oddělit rušivé části, především erythrocyty. Přitom se musí obzvláště dbát na to, aby nenastalo žádné ovlivnění výsledku analýzy hemolýzou. Nejčastěji používaný způsob dělení je odstředění analyzovaných vzorků krve. Nevýhodou jsou však přitom náklady na aparaturu a nezbytné velké objemy vzorků. Kromě toho pro provádění nezbytný kvalifikovaný personál a pro manipulaci a dopravu vzorků séra jsou nutná rozsáhlá bezpečnostní opatření. Kromě toho jsou spojeny s oddělením přípravy vzorků a vlastní analýzy problémy s identifikací vzorků.

Podle stavu techniky jsou známé způsoby k dělení krve, které spočívají na aglutinaci erythrocytů přidávkou lektinů. Přitom se přidávají ke vzorku krve ve vhodné nádobě příslušné látky a po určité době se odebere sérum nebo plazma. Jako nádoba se přitom použije v nejjednodušším případě samotná trubice na odběr krve (DE-OS 2038722) nebo má nádoba tvar podložního sklíčka (DE-AS 1498577) nebo má jiný libovolný tvar. Lektiny se nanesou do příslušné nádoby buď jako pevná látka, nebo se imobilizují na látkách obsažených v nádobě (EP — OS 57110). Všem těmto systémům je společné to, že se sérum nebo plazma uvolní z krve odstranění po určité době z dělicího rozsahu, aby se přivedla do jiného rozsahu další analýzy. Přitom zůstanou oddělené erythrocyty a část séra nebo plazmy v dělicí zóně. Toto neúplné převedení vytvořeného séra nebo plazmy vyžaduje pro další analýzu buď odměření použitého množství vzorku ve srovnání k celkovému reakčnímu roztoku, nebo práci bez zředění roztoku vzorku. Tento způsob vykazuje proto rovněž řadu nevýhod.

Úkolem vynálezu je vyvinout způsob dělení krve, který se jednak provádí jednoduše a bez problémů a jednak se může spojit jednoduchým způsobem s vlastní reakcí a integrovat na společný analytický systém.

Neočekávaně bylo zjištěno, že se může na základě matrice impregnované lektinem vytvořit způsob dělení krve, při kterém se může dělicí zóna po přidání vzorku krve několikrát propláchnout ředicím pufrům, přičemž se stanovena látka reprodukovatelně vypláchne, aniž by nastala analýza rušící hemolýza.

Obzvláště neočekávané je to, že se lektiny použité k oddělení nemusí imobilizovat na matrici jako ve způsobu popsaném v EP — OS 57110 a dělicí reakce je kratší než 30

sekund oproti 0,5 až 3 hodinám při způsobu popsaném v DE — OS 2038722.

Úkol se vyřeší tak, že se dělený vzorek krve nanese na vrstvu matrice se speciálními vlastnostmi impregnovanou lektinem nebo směsí lektinů a potom se vrstva matrice nasáklá krví několikrát propláchne ředidlem.

Předmětem vynálezu je způsob dělení krve nanesením vzorku krve na matrici impregnovanou lektinem a oddělením plazmy nebo séra, který se vyznačuje tím, že se matrice sestávající ze svého materiálu s relativním odporem při proudění až 40 % a napuštěná vzorkem krve 2 až 10× propláchne isotonickým roztokem pufru o pH v rozmezí 5,0 až 10,5 jako ředidlem.

Matrice se s výhodou propláchne ředidlem protiběžně.

Jako matrice ve způsobu podle vynálezu se použijí všechny své materiály se strukturou tkaniny nebo vlákna, které mají pokud možno nepatrný relativní odpor proudění. Jako relativní odpor proudění se přitom rozumí odpor, který vykazuje určitý materiál protékajícímu roztoku.

Zjistí se z procentuálního zvýšení doby průtoku roztoku sloupcem a dodatečně matricí. Obecně nenastane při hodnotách <30 % žádné rušení, při hodnotách >40 % silné rušení klinicko-chemického zkušebního postupu. Obzvláštní význam má přitom také nasáklivost použitého materiálu; materiál má potom například dostatečně velkou nasáklivost, když zcela pohltí objem tekutiny ležící v rozmezí maximálně pohltitelného množství tekutiny, maximálně během 10 až 15 sekund. Jako výhodné matricové materiály se osvědčily materiály z bavlněné a viskózní tkaniny a směsné tkaniny, obsahující tyto materiály a celulózní materiály. Materiály mohou mít například v případě bavlny hustotu nití 10 až 25 (osnova) a 10 až 20 (útek) nití/cm při plošné hmotnosti 100 až 400 g/m².

Matrice použitá ve způsobu podle vynálezu může sestávat z více vrstev uvedených materiálů. Přitom se může počet materiálových vrstev použitých k dělení značně měnit: na jedné straně je závislý na sací a dělicí kapacitě tkaniny a na objemu děleného vzorku krve, na druhé straně omezuje počet vrstev zvýšení dporu proudění. Obecně jsou dostatečné k dělení normální krve podle vynálezu 1 až 4 vrstvy; u obzvláště tenkých materiálů se může případně také použít více vrstev. Při použití více vrstev se může vrstva nejvíce vzdálená od naneseného vzorku ještě hydrofobovat. Hydrofobizace se provádí například nanesením roztoku dichlormethanu parafinem při teplotě místnosti na matricový kotouč a následujícím vysušením.

Jako lektin (aglutinin) jsou vhodné všechny látky, které projevují silnou aglutinaci erythrocytů. Vhodným lektinem je například lektin ze *Solanum tuberosum*, *Tritium vulga-*

ris, *Ricinus communis*, sójových bobů, *Phaseolus vulgaris*, Lentil, pšeničných klíčků, *Phytolacca americana*. Případně je možný přídavek látek zesilujících aglutinaci, například kationtových polymerů jako hexadimethrinbromidu, polymeru N,N,N',N'-tetramethylhexamethyldiaminu a trimethylenbromidu, N,N,N',N'-tetramethyl-1,6-hexandiaminového polymeru s 1,3-dibrompropánem, poly(N,N,N',N'-tetramethyl-N-trimethylenhexamethyldianomiumdibromidu).

Jako obzvláště vhodné se osvědčily směsi lektinů s malým podílem kationtových polymerů, například lektinové směsi ze sójových bobů a *Solanum tuberosum* v poměru 2 : 1 s 2 % kationtového polymeru nebo lektinová směs z pšeničných klíčků, sójových bobů, *Phaseolus vulgaris* v poměru 1 : 2 : 8 rovněž s 2 % kationtového polymeru.

Několikanásobné propláchnutí dělicí vstvy nasáklé krví umožňuje fotometrickou analýzu důležitých parametrů pro klinickou diagnostiku. Přitom jsou možné na základě zředění také obzvláště k rušení náchylné tzv. koncové způsoby pro substráty obsažené v krvi ve vyšší koncentraci. Způsob podle vynálezu umožňuje na jedné straně několikanásobným průtokem ředidla zónou dosažení dostatečně reprodukovatelného vypláchnutí stanovovaných látek, takže není zapotřebí dalšího pipetování, na druhé straně umožňuje výběrem zbývajících parametrů zabránit rušení analyzovaného roztoku produkty dělení krve, aniž by se musely zařadit komplikované přípravné úseky, například imobilizace lektinů nebo další reakční doba. Postup vícenásobného průtoku se může provádět libovolným způsobem, s výhodou v protiběžné formě provedení, při které ředidlo protéká střídavě maticí ze strany nanesení vzorku a potom ze strany odvrácené nanesení vzorku, protože se může provádět s nepatrnými náklady na aparaturu. Tento postup je v nejjednodušším případě proveditelný pomocí jednocestné stříkačky ponořené do kyvety. Samozřejmě jsou možné také jiné protiběžné a nikoliv protiběžné formy provedení a také sloučeniny dělení krve a následující klinicko-chemické analýzy v celkovém reakčním úseku.

Jako vzorek se může použít jak kapilární, tak také venózní krev. Vzorek se může nanést na dělicí úsek buď ihned po získání, nebo teprve později za přídavku látek bránících srážení jako kyseliny ethyldiamintetraoctové (EDTA) nebo citranu.

Jako ředidlo se mohou použít isotonické pufové roztoky, přičemž se mohou použít všechny dostupné pufové látky jako fosforečnan, glycin, citran, tris (hydroxymethyl)aminomethan(tris), triethanolamin, piperazin-N,N'-bis (2-ethansulfonová kyselina (pipes), atd. Hodnota pH použitého pufo-

vého roztoku se může zvolit v rozmezí 5,0 až 10,5, s výhodou jsou fosforečnanové, triethanolaminové a glycinové pufrы v rozmezí pH 6,5 až 10.

Zásadně jsou všechna stanovení substrátu po dělení vzorku krve obvyklá v klinické chemii proveditelná způsobem podle vynálezu. Volným výběrem poměru ředění vzorku až celkového roztoku se mohou bez obtíží stanovit jak substráty obsažené ve vysoké koncentraci v krvi, tak také nepatrná aktivita proteinů.

Vynález bude blíže objasněn v následujících příkladech.

Příklad 1

Stanovení relativního odporu proudění.

Kotouče ($\varnothing$ 10 mm) různých matic se napustí 50 μ l roztoku 0,03 molu/l fosforečnanového pufru, 0,1 molu/l chloridu sodného, 1 % kationtového polymeru, 13 μ g lektinu z pšeničných klíčků a 25 μ g lektinu ze sójových bobů a suší se. K takto impregnovaným kotoučům se přidá 30 μ l krve s přídavkem EDTA, a upnou se do sloupce ($\varnothing$ 10 milimetrů) nad výstupním otvorem ($\varnothing$ 1 milimetr). Při uzavřeném výtakovém otvoru se naplní 20 ml isotonického roztoku chloridu sodného a po otevření uzávěru se zjistí čas až do úplného výtoku daného objemu tekutiny. Srovnáním s dobou výtoku u sloupce bez matrice se stanoví relativní odpor proudění jako procentuální zvýšení doby průtoku.

Příklad 2

Stanovení vlastností dělení krve u různých matic

Matricové kotouče impregnované podle příkladu 1 se upevní v jednocestné stříkačce (průměr 10 mm) pomocí krycího kotouče uprostřed otevřeného a napustí se 30 μ l krve s přídavkem EDTA. Po 30 sekundách se ponoří špička stříkačky do kyvety s 1 ml roztoku obsahujícího 0,03 molu/l fosforečnanového pufru o pH 7,25 a 0,1 molu/l chloridu sodného. Roztok se stříká nasátím a vytáčením několikrát protiběžně matricovým kotoučem. Přitom se zjistí po každém vypláchnutí na základě extinkce měřené při 405 nm podíl hemolýzy a posoudí se kvalitativně. Získané výsledky jsou shromážděny v následující tabulce. Přitom znamená +++ velice dobře, ++ dobře, + dostatečně, — nedostatečně, — zcela nedostatečně. Pro dobré dělení krve je proto zapotřebí co nejmenšího odporu proudění a dobré nasáklivosti matrice.

Tabulka

Matrice č.	Materiál	Hustota nití [nitě/cm] osnova	4	5	Nasák- livost	Doba průtoku [sek]	Relativní odpor proudění [%]	Dělení krve po 1 3 propláchnutí
1	2	3	4	5	6	7	8	9 10
1	bavlna	25,0	18,7	120	+	29	2	++ +
2	bavlna	17,9	11,3	123	+	31	9	++ +
3	bavlna	13,6	19,9	316	+	36	26	+ +
4	68 % bavlny 32 % polyesteru	—	—	55	+	35	24	++ +
5	polyester	76,9	39,8	108	+	32	12	+ +
6	70 % polyesteru 30 % viskózy	12,3	11,8	224	+	31	10	++ +
7	56 % polyesteru 44 % vlny	31,9	34	187	+	44	54	— —
8	vlna	25,9	22,8	113	+	41	43	— —
9	vlna	24,1	22,2	116	—	31	10	— —
10	celulóza	—	—	—	—	30	5	++ +

Příklad 3

Vhodnost různých puřových roztoků jako ředidlo

Při třech provedeních pokusů se maticový kotouč z bavlněné tkaniny ($\varnothing$ 10 mm) impregnuje nanesením 100 μ l roztoku dichlormethanu nasyceného při teplotě místnosti parafinem a následujícím vysušením a na něj se položí další kotouč impregnova-

ný lektinem uvedeným v následující tabulce. Po nanesení 30 μ l krve s přířávkem EDTA na takto preparovanou dělicí zónu se tato ještě třikrát protiběžně propláchne 1 ml puřového roztoku o různé hodnotě pH. Pomocí extinkce při 405 nm se kvalitativně zjistí výsledky dělení krve. Jak vyplývá z tabulky, jsou jako ředidlo velice dobře vhodné puřové roztoky o pH v rozmezí 5,5 až 10,5. Zhodnocení odpovídá příkladu 2.

Příklad 4

Stanovení glukózy v krvi

Matricový kotouč ($\varnothing$ 10 mm) z bavlněné tkaniny (matrice 1 z příkladu 2) se hydrofobuje podle příkladu 3, další se napustí 50 μ l roztoku obsahujícího 0,01 molu/l fosforečnanového pufru o pH 7,25, 2% kationtového polymeru, 16 μ g lektinu ze sójových bobů a 8 μ g lektinu z *Solanum tuberosum* a suší se. Oba kotouče se položí na sebe (hydrofóbní jako spodní) do jednocestné stříkačky ($\varnothing$ 10 mm). Na horní kotouč se potom nanese při různých pokusech 20 μ l vzorku krve s přidavkem EDTA, který obsahoval různou koncentraci glukózy. Obsah glukózy se zjistí dodatečně stanovením v séru. Potom se zóny dělení v oddělených po-

kusech jednou a třikrát protiběžně propláchnou 1 ml roztoku 0,03 molu/l fosforečnanového pufru o pH 7,25 a 0,3 molu/l chloridu sodného a změří se extinkce získaného roztoku při 365 nm. Potom se přidá 50 μ l reakčního roztoku obsahujícího 100 kU/l ($kU = 1\,000$ mezinárodních enzymových jednotek) glukózodehydrogenázy, 2 kU mutarotázy a 21 mmolu/l nikotinamidadenindinukleotidu (NAD^+) v 0,1 molu/l fosforečnanového pufru o pH 7,6 a po 10 minutách se znova změří extinkce celkového roztoku při 365 nm. Z rozdílu extinkce se získá vynásobením faktorem 630 obsah glukózy výchozího vzorku; příslušné výsledky jsou uvedeny v následující tabulce. Celkově z tabulky vyplývá, že při vícenásobném propláchnutí se získají lepší výsledky než při jednom propláchnutí.

Stanovení glukózy

v séru	podle způsobu dle vynálezu při jednom propláchnutí	standardní odchylka ze 6 hodnot	při několika- násobném propláchnutí	standardní odchylka ze 6 hodnot
mg/dl	mg/dl	%	mg/dl	%
59	52	21,0	61	2,4
78	86	12,9	74	3,0
120	131	4,9	114	3,5
139	144	9,0	135	3,9
179	189	4,9	171	2,3
235	233	8,6	240	3,9
310	293	21,0	318	4,6
520	540	18,0	543	2,4

Příklad 5

Stanovení močoviny v krvi

Do jednocestné stříkačky ($\varnothing$ 10 mm) se vloží matricový kotouč z hydrofóbní bavlněné tkaniny (matrice 1 podle příkladu 2) a na ni další matricový kotouč, který byl napuštěn roztokem 0,025 molu/l fosforečnanového pufru o pH 8,0, 0,1 molu/l chloridu sodného obsahujícího 2,5 % kationtového polymeru a 19 μ g lektinu z *Ricinus communis* a potom vysušený. Na horní kotouč se dá 15 μ l vzorku krve s přidavkem EDTA, který obsahoval různé koncentrace močoviny. Obsah močoviny se zjistil dodatečně v séru. Potom se dělicí zóny krve propláchnou jednou a třikrát protiběžně roztokem 0,03 molu/l triethanolaminového pufru o pH 8 a 0,3

molu/l chloridu sodného v oddělených pokusech. Potom se přidá 50 μ l reakčního roztoku obsahujícího 25 kU/l glutamát-dehydrogenázy, 0,2 molu/l ketoglutarátu, 4,6 mmolu/l redukovaného nikotinamidenindinukleotidu ($NADH$) a 30 mmolu/l adenosindifosfátu (ADP) v 0,3 mmolu/l triethanolaminového pufru o pH 8 a měří se po 10 minutách extinkce E_1 při 334 nm. Potom se přidá 20 μ l roztoku 450 kU/l ureázy v 0,1 molu/l triethanolaminového pufru o pH 8 a po další 10 minutové reakční době se měří při teplotě místnosti extinkce E_2 při 334 nm. Z $E_1 - E_2$ se stanoví po vynásobení faktorem 165 obsah močoviny výchozího vzorku; příslušné výsledky jsou uvedeny v následující tabulce. Z ní vyplývá, že obzvláště při několikanásobném protiběžném propláchnutí se získají velice dobré výsledky.

Stanovení močoviny

v séru	podle způsobu dle vynálezu při jednom propláchnutí	standardní odchylka ze 6 hodnot	při více- násobném propláchnutí	standardní odchylka ze 6 hodnot
mg/dl	mg/dl	%	mg/dl	%
32	31	17,4	31	3,9
40	39	6,8	41	3,1
49	46	7,6	48	2,0
52	51	12,1	53	2,8
61	56	9,1	62	3,2
72	68	5,9	74	3,3
88	89	7,2	91	2,4
93	88	6,1	90	3,5
99	99	11,0	108	2,4
125	122	10,5	121	3,8

Příklad 6

Stanovení γ -glutamyltranspeptidázy v krvi

Do jednocestné stříkačky se vloží nad maticový kotouč hydrofóbní bavlněné tkaniny (matrice 1 podle příkladu 2) 4 maticové kotouče z celulózové tkaniny (matrice 10 podle příkladu 2), které byly napuštěny 100 μ l roztoku 0,015 molu/l fosforečnanového pufru o pH 6,5, 0,3 molu/l chloridu sodného obsahujícího 2 % kationtového polymeru, 25 μ g lektinu ze sójových bobů a 13 μ g lektinu z pšeničných klíčků. Na takto předem připravené kotouče se nanese 70 μ l vzorku krve s přídavkem EDTA, který obsahoval různé aktivity γ -glutamyltranspeptidázy. Pro kontrolu byla provedena stanovení séra. Potom se dělicí zóny krve propláchnou jednou a třikrát protiběžně 1 ml roztoku 0,015 molu/l fosforečnanového pufru o pH 6,5 a 0,3 molu/l chloridu sodného v oddělených pokusech. K oběma řadám pokusů se připipetuje 100 μ l roztoku 1 molu/l glycyglycinu v 0,3 molu/l tris-pufu o pH 8,25 a roztok se dá při 25 °C do termostatu. Po 4 minutách se přidá 100 μ l roztoku 30 mmolu/l L- γ -glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilidu v 0,3 molu/l tris-pufu o pH 8,25. Potom se zaznamená po 7 minut zvýšení extinkce při 405 nm a ze zjištěného rozdílu extinkce za minutu se stanoví vynásobením faktorem 3 600 aktivita výchozího vzorku. Jak ukazují výsledky v následující tabulce, dosáhnou se při metodě s několikanásobným proplachováním lepší výsledky než při jednom propláchnutí.

nou jednou a třikrát protiběžně 1 ml roztoku 0,015 molu/l fosforečnanového pufru o pH 6,5 a 0,3 molu/l chloridu sodného v oddělených pokusech. K oběma řadám pokusů se připipetuje 100 μ l roztoku 1 molu/l glycyglycinu v 0,3 molu/l tris-pufu o pH 8,25 a roztok se dá při 25 °C do termostatu. Po 4 minutách se přidá 100 μ l roztoku 30 mmolu/l L- γ -glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilidu v 0,3 molu/l tris-pufu o pH 8,25. Potom se zaznamená po 7 minut zvýšení extinkce při 405 nm a ze zjištěného rozdílu extinkce za minutu se stanoví vynásobením faktorem 3 600 aktivita výchozího vzorku. Jak ukazují výsledky v následující tabulce, dosáhnou se při metodě s několikanásobným proplachováním lepší výsledky než při jednom propláchnutí.

Stanovení γ -glutamyltranspeptidázy

v séru	podle způsobu dle vynálezu při jednom propláchnutí	standardní odchylka ze 6 hodnot	při více- násobném propláchnutí	standardní odchylka ze 6 hodnot
mg/dl	mg/dl	%	mg/dl	%
13	14	24,0	14	8,9
19	18	13,0	18	5,7
31	30	16,0	30	4,8
56	56	7,5	52	4,3
66	63	15,0	70	0,8
84	84	13,0	85	4,5
87	88	9,3	92	4,9
106	108	6,2	105	3,3
115	112	7,1	116	4,1
140	139	6,0	138	4,7
215	209	8,1	195	5,2

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob dělení krve nanesením vzorku krve na matrici impregnovanou lektinem a oddělením plazmy nebo séra, vyznačený tím, že se matrice sestávající ze savého materiálu s relativním odporem proudění až 40 % a napuštěná vzorkem krve 2 až 10× propláchne isotonickým roztokem pufru o pH v rozmezí 5,0 až 10,5 jako ředidlem.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se matrice propláchne 2 až 10× protiběžně ředidlem.

3. Způsob podle bodů 1 a 2, vyznačený

tím, že se jako matrice použije savý materiál z bavlněné tkaniny, smíšené tkaniny obsahující bavlnu, celulózy, viskózy nebo materiálu obsahujícího tyto složky.

4. Způsob podle bodu 3, vyznačený tím, že se použije bavlněná tkanina o hustotě nití 10 až 25 nití/cm a 10 až 20 nití/cm a plošné hmotnosti 100 až 400 g/m².

5. Způsob podle bodů 1 až 4, vyznačený tím, že se použije matrice sestávající z více vrstev, přičemž se vrstva nejvzdálenější od naneseného vzorku může hydrofobovat.