



Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteiner Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

PATENTSCHRIFT A5

640 948

<p>②① Gesuchsnummer: 7862/78</p> <p>②② Anmeldungsdatum: 20.07.1978</p> <p>③① Priorität(en): 21.07.1977 US 817595</p> <p>②④ Patent erteilt: 31.01.1984</p> <p>④⑤ Patentschrift veröffentlicht: 31.01.1984</p>	<p>⑦③ Inhaber: Technicon Instruments Corporation, Tarrytown/NY (US)</p> <p>⑦② Erfinder: Young Ran Kim, Hartsdale/NY (US)</p> <p>⑦④ Vertreter: E. Blum & Co., Zürich</p>
--	---

⑤④ Verfahren zur Bestimmung von weissen Blutkörperchen und von Blutplättchen neben anderen Blutteilchen mittels Herstellung einer Zellsuspension aus einer Blutprobe.

⑤⑦ Es wird ein Verfahren zur Bestimmung von weissen Blutkörperchen und von Blutplättchen neben anderen Blutteilchen mittels Herstellung einer Zellsuspension aus einer Blutprobe angegeben. Dabei wird die am Koagulieren gehinderte Blutprobe so behandelt, dass die Morphologie der weissen Blutkörperchen und Blutplättchen nicht beeinflusst wird. Dadurch ist es möglich, die Blutplättchen von den weissen Blutkörperchen und die meisten Klassen der weissen Blutkörperchen ohne Einfärbung voneinander zu unterscheiden und auszuzählen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Bestimmung von weissen Blutkörperchen und von Blutplättchen neben anderen Blutteilchen mittels Herstellung einer Zellsuspension aus einer Blutprobe, dadurch gekennzeichnet, dass man

(a) eine am Koagulieren gehinderte Blutprobe mit einem Detergens versetzt, das die roten Blutkörperchen für die anschliessende Auflösung vorbehandelt, ohne die Morphologie der weissen Blutkörperchen zu beeinträchtigen;

(b) ein Fixiermittel unter Aufrechterhaltung des neutralen pH-Wertes des Gemisches zumischt;

(c) das erhaltene Gemisch bei einer Temperatur von 55 bis 62 °C mindestens 2 min bebrütet und

(d) die Zahl der weissen Blutkörperchen und/oder der Blutplättchen bestimmt.

2. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Detergens Polyoxyethylen-20-Sorbitanmonolaurat in einer Menge verwendet, dass eine Konzentration in dem Gemisch von 0,3 bis 2,0 Volumenprozent erhalten wird.

3. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man in der Stufe (a) die mit dem Detergens versetzte Blutprobe etwa 1 min bei Raumtemperatur inkubiert.

4. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man das Gemisch in Stufe (b) nach dem Zusatz des Fixiermittels bei einem pH-Wert von 6 bis 8 hält.

5. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Fixiermittel eine phosphatgepufferte Formaldehydlösung verwendet.

6. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Temperatur in Stufe (c) bei etwa 58 °C und die Inkubationszeit bei 2 min hält.

7. Verfahren gemäss Anspruch 1 zur Bestimmung von weissen Blutkörperchen, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verdünnung der gesamten Probe durchführt, die mindestens zum Teil erst nach der Bebrütungsstufe (c) unter Verwendung einer isotonischen Salzlösung erfolgt, wobei man für das erhaltene Gemisch einen pH-Wert von 6 bis 8,5 wählt.

8. Verfahren gemäss Anspruch 1 zur Bestimmung von weissen Blutkörperchen, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verdünnung der gesamten Probe durchführt, die mindestens zum Teil bereits vor der Behandlung mit dem Detergens in Stufe (a) erfolgt.

9. Verfahren gemäss Anspruch 1 zur Bestimmung von Blutplättchen, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verdünnung der Probe nach der Bebrütungsstufe (c) unter Verwendung einer angesäuerten isotonischen Salzlösung durchführt und für das erhaltene Gemisch einen pH-Wert von 2 bis 4 wählt.

10. Verfahren gemäss Anspruch 1 zur Bestimmung von Blutplättchen, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verdünnung der Probe teilweise durch Zusatz der isotonischen Salzlösung vor der Behandlung mit dem Detergens in Stufe (a) durchführt.

Die bestehenden Verfahren zum Auszählen von Blutplättchen haben sich als nicht ganz verlässlich erwiesen. Automatisierte Ausführungen dieser Verfahren haben sich bisher auf Chemismen gestützt, die zu falsch bestimmten Blutplättchenzählungen geführt haben.

Bei typischen Verfahren zur Zählung von Blutplättchen wird ein Material zu einer Gesamtblutprobe hinzugegeben, um die roten Blutkörperchen aufzulösen. Die Verfahren zum Auflösen der roten Blutkörperchen, die bisher angewandt wurden, besitzen jedoch schädliche Nebenwirkungen: Material von den Blutplättchen selbst wird extrahiert, einige weisse

Blutkörperchen werden zerteilt, und in einigen Fällen bilden sich Niederschläge aus Proteinen. Wenn von diesen Vorgängen einer oder mehrere stattfinden, wird die angezeigte Plättchenzählung falsch berechnet.

Was die Differentialzählungen für weisse Blutkörperchen, die gegenwärtig verfügbar sind, angeht, so ist es bisher nicht möglich, weisse Blutkörperchen zu erhalten, die durch Auflösung frei von roten Blutkörperchen sind, ohne dass die weissen Blutkörperchen gleichzeitig geschädigt werden. Daher ist eine angemessene Differenzierung der Leukocyten, wie sie in der US-PS 3 741 875 beschrieben ist, nur möglich, wenn die Zellen durch cytochemische Umsetzung angefärbt werden.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, die Unterscheidung der Blutplättchen von den Hüllen der roten Blutkörperchen und den Leukocyten sowie Informationen über die Grösse der Blutplättchen zu gewinnen und die Unterscheidung der meisten Klassen der ungefärbten Leukocyten aufgrund ihrer Grösse und Granulareigenschaften zu ermöglichen.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung von weissen Blutkörperchen und von Blutplättchen neben anderen Blutteilchen mittels Herstellung einer Zellsuspension aus einer Blutprobe, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man

(a) eine am Koagulieren gehinderte Blutprobe mit einem Detergens versetzt, das die roten Blutkörperchen für die anschliessende Auflösung vorbehandelt, ohne die Morphologie der weissen Blutkörperchen zu beeinträchtigen;

(b) ein Fixiermittel unter Aufrechterhaltung des neutralen pH-Wertes des Gemisches zumischt,

(c) das erhaltene Gemisch bei einer Temperatur von 55 bis 62 °C mindestens 2 min bebrütet und

(d) die Zahl der weissen Blutkörperchen und/oder der Blutplättchen bestimmt.

In einer bevorzugten Durchführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens wird als Detergens Polyoxyethylen-20-Sorbitanmonolaurat verwendet und die Bebrütung 2 min bei etwa 58 °C durchgeführt.

In einer automatisierten Apparatur für kontinuierlichen Durchflussbetrieb, wie dem Hemalog D (Eingetragenes Warenzeichen der Technicon Instruments Corporation), die der Erleichterung der differentiellen Zählung der weissen Blutkörperchen dient, und bei dem automatisierten Verfahren gemäss US-PS 3 741 875 werden die einzelnen Zellarten mit Hilfe von cytochemischen Verfahren speziell identifiziert und markiert. Der Strom aus gefärbten und ungefärbten Zellen fliesst durch eine optische Sichtkammer, in der ein fotoelektrisches Messverfahren die Amplituden des absorbierten Lichtes und getrennt davon das von jeder Zelle gestreute Licht misst. Elektronische Signale werden aufgrund ihrer Amplitude eingeteilt und zu Kategorien klassifiziert, die den unterschiedlichen Zellarten entsprechen. Für die fünf hauptsächlichsten Arten von weissen Blutkörperchen von Gesamtblut werden die entsprechenden Daten für eine Probe/min ausgedruckt. Mit dem spezifischen Verfahren zur chemischen Identifizierung werden die weissen Blutkörperchen angefärbt. Das gestreute Licht misst die durch das Verfahren beeinflusste Grösse der Zellen grob.

Das erfindungsgemässe Verfahren zur Erzielung einer differentiellen Zählung der weissen Blutkörperchen lässt sich sowohl der manuellen als auch der automatisierten Durchführungsform anpassen. In jedem der beiden Fälle ermöglicht das Verfahren eine wirksame Unterscheidung der meisten normalen Klassen ungefärbter Leukocyten durch Lichtstreuung allein, da die Morphologie der weissen Blutkörperchen nicht beeinträchtigt worden ist. Die Zählung ist genau, weil die vorbereiteten Zellen frei von Klumpen aus weissen Blutkörperchen, Hüllen roter Blutkörperchen oder Blutplättchen sind.

Eine weit verbreitete Methode zur Zählung von Blutplättchen beruht auf der Verwendung einer konzentrierten Harnstofflösung zur Auflösung der roten Blutkörperchen. Bei diesem Verfahren wird auch etwas Material von Blutplättchen extrahiert, und es werden einige weisse Blutkörperchen zerteilt, wodurch Teilchen erzeugt werden, die sich in den dabei verwendeten Instrumenten nicht von Blutplättchen unterscheiden lassen, wodurch die Zählung der Blutplättchen falsch wird, und bei einigen abnormen Blutproben wird die Bildung von sehr feinen Proteinniederschlägen verursacht, die sich ebenfalls in den verwendeten Instrumenten von Blutplättchen nicht unterscheiden lassen und wodurch ebenfalls in derartigen Blutproben die Zählung der Blutplättchen beeinträchtigt wird.

Die Extraktion von Blutplättchenmaterial durch den Harnstoff erniedrigt das Lichtbrechungsvermögen der Blutplättchen, wodurch die Grösse des Signals des gestreuten Lichtes erniedrigt wird, das durch sie in den verwendeten Instrumenten erzeugt wird. Demzufolge verschmelzen die kleinsten Signale, die von den Blutplättchen ausgehen, mit den grössten Rauschsignalen des Systems, die durch das elektronische Rauschen in den Detektoren und Verstärkern sowie von den gleichzeitig durch den fotometrischen Lichtstreuungsdetektor erfolgenden Durchtritt einer grossen Anzahl von Zellhüllen von roten Blutkörperchen, d.h. Membranen von roten Blutkörperchen, die von ihrem Inhalt durch die Auflösung befreit worden sind, erzeugt werden. Es ist daher nicht möglich, eine Schwelle zwischen dem Rauschen und der durch die Blutplättchen hervorgerufenen Anzeige mit grosser Zuverlässigkeit genau festzusetzen.

Durch das erfindungsgemässe Verfahren wird eine Methode geschaffen, bei der die roten Blutkörperchen aufgelöst werden, ohne dass Material von den Blutplättchen extrahiert wird, ohne dass die weissen Blutkörperchen zerteilt werden und ohne dass sich aus den Proteinen abnormer Blutproben Niederschläge bilden. Das erfindungsgemässe Verfahren liefert eine Hochpulsverteilung von Signalen mit einem grossen, wohl definierten Minimum zwischen Rauschen und Blutplättchen sowie einem weiteren grossen, wohldefinierten Minimum zwischen Blutplättchen und weissen Blutkörperchen.

Ausserdem bleiben bei dem erfindungsgemässen Verfahren die Unterschiede in der Morphologie der weissen Blutkörperchen erhalten, wodurch die Unterscheidbarkeit der meisten Klassen an weissen Blutkörperchen voneinander ohne Anfärbung ermöglicht wird.

Gleichgültig, ob das erfindungsgemässe Verfahren zur Erzielung einer differentiellen Zählung der weissen Blutkörperchen oder einer Zählung der Blutplättchen eingesetzt wird, wird zunächst eine am Koagulieren gehinderte Blutprobe mit einem Detergens versetzt, das die roten Blutkörperchen für die anschliessende Auflösung vorbehandelt.

Der Zusatz des Detergens zu diesem Zeitpunkt ist ein wichtiger Schritt des erfindungsgemässen Verfahrens. Das Detergens wirkt als Vorbehandlungsmittel oder Vorkonditionierungsmittel derart, dass es bei den Konzentrationen, in denen es zugesetzt wird, die Morphologie der weissen Blutkörperchen oder der Blutplättchen nicht beeinträchtigt und auch die roten Blutkörperchen nicht auflöst, indessen die roten Blutkörperchen für die anschliessende Auflösung vorbereitet.

Für das erfindungsgemässe Verfahren wird als Detergens vorzugsweise Polyoxyethylen-20-Sorbitanmonolaurat verwendet, wengleich andere Detergentien, wie beispielsweise Polyoxyethylen-23-monolaurylether oder Polyoxyethylen-20-Sorbitanmonooleat, ebenfalls in der Lage sind, die roten Blutkörperchen vorzubehandeln, ohne dass die roten Blutkörperchen aufgelöst werden, und daher in gleicher Weise verwendbar sind.

Die Konzentration des Detergens in dem erhaltenen Gemisch liegt zwischen etwa 0,03 und 2,0% (Volumen/Volumen) und beträgt vorzugsweise etwa 0,4 bis etwa 6,0% (Volumen/Volumen).

Während des erwähnten Vorbehandlungsschrittes wird das erhaltene Gemisch bei Raumtemperatur oder Umgebungstemperatur, beispielsweise bei etwa 25 °C, etwa 1 min lang bebrütet. Dadurch wird ermöglicht, dass das Detergens seine Aufgabe zufriedenstellend erfüllt.

Das bebrütete Gemisch wird unter Rühren und Halten des pH-Wertes im neutralen Bereich mit einem Fixierungsmittel versetzt. Vorzugsweise ist das Fixierungsmittel eine mit Phosphat gepufferte Formaldehydlösung, und der pH-Wert liegt im Bereich von 6 bis 8.

Das Gemisch wird anschliessend bei einer Temperatur von 55 bis 62 °C mindestens 2 min lang und vorzugsweise bei 58 °C 2 min lang bebrütet.

Anschliessend wird das Gemisch nötigenfalls verdünnt und optisch gemessen. Zur Bestimmung der Blutplättchenzahl wird die Verdünnung mit einer angesäuerten isotonischen Salzlösung vorgenommen, wonach das erhaltene Gemisch einen pH-Wert von 2 bis 4 besitzt. Eine Suspension unter Verwendung von mit 0,5% Essigsäure angesäuertem Salzlösung ergibt eine hinreichende Verdünnung, ein verbessertes Verhältnis von Blutplättchensignal zu Rauschen, eine saubere Abtrennung der Blutplättchen von den Hüllen der roten Blutkörperchen und Leukocyten, und die ursprünglichen einzelnen Volumina der Blutplättchen bleiben erhalten. Es ist auch möglich und in manchen Fällen bevorzugt, die Probe durch Zugabe einer isotonischen Salzlösung vor der Behandlung mit dem Detergens teilweise zu verdünnen.

Zur Bestimmung der weissen Blutkörperchen wird die Probe durch Zusatz einer isotonischen Salzlösung mindestens teilweise nach der Bebrütungsstufe verdünnt. Alternativ kann die Probe mindestens teilweise vor der Behandlung mit dem Detergens verdünnt werden.

Die Suspension von weissen Blutkörperchen, die auf die angegebene Weise mit einer isotonischen Salzlösung verdünnt worden ist, erhält die Morphologie der weissen Blutkörperchen, erlaubt eine Unterscheidung der ungefärbten weissen Blutkörperchen durch Lichtstreuung mit niedrigem und grossem Winkel sowie die Unterscheidung von Lymphocyten, Monocyten, Neutrophilen und Eosinophilen ohne Anfärbung.

Das Verfahren erhält ausserdem die Peroxidaseaktivität der weissen Blutkörperchen, was die weitere Unterscheidung der beiden sonst schwierig zu unterscheidenden Gruppen von Leukocyten ermöglicht, nämlich die der peroxidaseaktiven und -inaktiven Agranulocyten.

Die hergestellte Suspension kann sofort (on line) für die klinisch-hämatologische Analyse durch Lichtstreuung verwendet werden, und sie kann aufbewahrt werden, um als Bezugssuspension für ein derartiges System zu dienen.

Zwei Ausführungsbeispiele der Erfindung werden nachfolgend ausführlich erläutert.

Beispiel 1

Macro-Methode

0,1 ml einer am Koagulieren gehinderten Gesamtblutprobe werden mit 0,32 ml einer 1%igen Lösung von Poyloxyethylen-20-Sorbitanmonolaurat in isotonischer Salzlösung versetzt und das erhaltene Gemisch bei Raumtemperatur etwa 1 min lang bebrütet.

Danach wird das Gemisch unter Rühren mit 0,42 ml phosphatgepufferter Formaldehydlösung mit einem Gehalt von 8 Vol.-% Formaldehyd versetzt und das erhaltene Gemisch 2 min bei 57 °C bebrütet.

A. Bestimmung der weissen Blutkörperchen

Das obige bebrütete Gemisch wurde mit 1,2 ml isotoni-
scher Salzlösung versetzt, und die differentielle Zählung der
weissen Blutkörperchen wurde durch Lichtstreuung durch-
geführt.

B. Bestimmung der Blutplättchen

Das oben erwähnte bebrütete Gemisch wurde mit 1,2 ml
isotonischer Salzlösung versetzt. 0,1 ml des erhaltenen Gemi-
sches wurde zu 4,0 ml einer mit 0,5% Essigsäure angesäuerten
isotonischen Salzlösung hinzugefügt. Die Zählung der Blut-
plättchen und die Messung der Grösse wurden mit Hilfe der
Lichtstreuung durchgeführt.

*Beispiel 2**Micro-Bestimmung*

0,01 ml vor dem Koagulieren geschütztes Gesamtkapil-
larblut wurden im Verhältnis von 1:10 mit einer isotonischen
Salzlösung verdünnt, und 0,1 ml des erhaltenen Gemisches

4

wurden zu 0,32 ml einer 0,125%igen Lösung von Polyoxyet-
hylene-20-Sorbitanmonolaurat in isotomischer Salzlösung
hinzugegeben und das erhaltene Gemisch etwa 1 min bei
Raumtemperatur bebrütet.

5 Das Gemisch wurde danach unter Rühren mit 0,42 ml ei-
ner phosphatgepufferten Formaldehydlösung mit einem Ge-
halt von 8 Vol.-% Formaldehyd versetzt und das erhaltene
Gemisch bei 57 °C 2 min lang bebrütet.

A. Bestimmung der weissen Blutkörperchen

10 Die differentielle Zählung der weissen Blutkörperchen der
obigen Suspension wurde durch Lichtstreuung gemessen.

B. Bestimmung der Blutplättchen

Das obige bebrütete Gemisch wurde mit 1,2 ml isoni-
15 scher Salzlösung versetzt. 0,1 ml des erhaltenen Gemisches
wurden zu 1,0 ml einer mit 0,5% Essigsäure angesäuertes iso-
tonischer Salzlösung hinzugefügt. Die Zählung der Blutplätt-
chen und die Bestimmung der Grösse erfolgten durch Licht-
streuung.