



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 665 030 A5

⑤① Int. Cl.⁴: G 01 N 33/50

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

⑫ **PATENT SCHRIFT** A5

⑫① Gesuchsnummer: 4076/84

⑫② Anmeldungsdatum: 27.08.1984

⑫③ Priorität(en): 02.09.1983 HU 3060/83

⑫④ Patent erteilt: 15.04.1988

⑫⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 15.04.1988

⑦③ Inhaber:
Reanal Finomvegyszergyar, Budapest (HU)

⑦② Erfinder:
Muszbek, Laszlo, Dr., Debrecen (HU)
Adany, Roza, Dr., Debrecen (HU)
Zajka, Gabriella, Dr., Budapest (HU)
Harsanyi, Ilona, Dr., Budapest (HU)

⑦④ Vertreter:
Patentanwälte Schaad, Balass, Sandmeier, Alder,
Zürich

⑤④ **Reagens zur Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl.**

⑤⑦ Das Reagens zur gleichzeitigen Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl auf normalem lichtmikroskopischem Wege enthält 0,1 - 5 Gew. Teile Aceton, 0,05 - 2,0 Gew. Teile Formaldehyd und/oder Glutaraldehyd, 0,001 - 0,1 Gew. Teile eines Thiazinfarbstoffes - vorteilhaft Toluidinblau -, 0,1 - 2,0 Gew. Teile eines Mineralsalzes, vorteilhaft Natriumchlorid, und zu 100 Gew. Teilen Wasser.

PATENTANSPRÜCHE

1. Reagens zur gleichzeitigen Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl auf normalem lichtmikroskopischem Wege, dadurch gekennzeichnet, dass es 0,1 bis 5 Gew. Teile Aceton, 0,05 bis 2,0 Gew. Teile Formaldehyd und/oder Glutaraldehyd, 0,001 bis 0,1 Gew. Teile eines Thiazinfarbstoffes, 0,1 bis 0,2 Gew. Teile eines Mineralsalzes und zu 100 Gew. Teilen Wasser enthält.

2. Reagens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es als Thiazinfarbstoff Toluidinblau enthält.

3. Reagens nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es als Mineralsalz Natriumchlorid enthält.

4. Verfahren zur Herstellung eines, zur gleichzeitigen Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl auf normalem lichtmikroskopischem Wege geeigneten Reagens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man 0,1 bis 5 Gew. Teile Aceton, 0,05 bis 2,0 Gew. Teile Formaldehyd oder Glutaraldehyd, 0,001 bis 0,1 Gew. Teile eines Thiazinfarbstoffes und 0,1 bis 2,0 Gew. Teile eines Mineralsalzes mit einer zu 100 Gew. Teilen notwendigen Menge von Wasser vermischt.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass man als Thiazinfarbstoff Toluidinblau verwendet.

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass man 200 ml einer 0,9%igen Natriumchloridlösung, 25 ml Aceton, 5 ml eines 35%igen Formaldehyds, 770 ml ionenausgetauschtes destilliertes Wasser und 100 mg Toluidinblaufarbstoff miteinander vermischt.

BESCHREIBUNG

Die Erfindung betrifft ein Reagens zur gleichzeitigen Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl und ein Verfahren zur Herstellung desselben.

Gegenstand der Erfindung ist ein zur gleichzeitigen Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl aus vollem Blut auf normalen lichtmikroskopischem Wege geeignetes, Aceton und Formaldehyd oder Glutaraldehyd, Mineralsalze und Farbstoffe enthaltendes Reagens.

Es ist bekannt, dass die Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl in den Kreis der Standardmethoden der klinischen Laboratorien fällt. Die Thrombozytenzählung kann nach verschiedenen Methoden durchgeführt werden:

1. Elektronische Partikelzählung mit zur Thrombozytenzählung entwickelten Automaten. Obwohl diese Methode rasch und einfach ist, müssen sehr kostspielige Instrumente beschaffen werden. Diese Methode ist zur Ersetzung der mikroskopischen Bestimmung nicht immer geeignet. Die Reproduzierbarkeit dieses Verfahrens ist auch schlechter als dieselbe der mikroskopischen Zähler.

2. Thrombozytenzählung mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskopes unter Anwendung einer kokain- oder novokainhaltigen Lösung oder einer anderen Thrombozytenzählerlösung. Zur Durchführung dieses Verfahrens ist das Phasenkontrastmikroskop unentbehrlich. Ein weiterer wesentlicher Nachteil besteht darin, dass diese Methode für das die Versuche durchführende Personal ermüdend, anstrengend und augenverderbend ist, insbesondere bei einer hohen Versuchszahl.

3. Bestimmung der Thrombozytenzahl mit einer Färbungsmethode. Dieses Verfahren ist das einfachste und kann mit Hilfe eines Mikroskops durchgeführt werden. Nach den gegenwärtig verwendeten Methoden wird als Farbstoff Kristallviolett (Genzianviolett; chemischer Name: Hexamethyl-p-rosanilin-hydrochlorid) eingesetzt. Gegenüber diesen

Methoden wird der berechtigte Einwand erhoben, dass diese im Vergleich zur Phasenkontrastbestimmung verzerren, weil nicht alle Thrombozyten auf eine gut sichtbare Weise gefärbt werden.

In der haematologischen Diagnostik stellt die Leukozytenzählung die am verbreitetsten verwendete Methode dar. Die im ungarischen Pharmakopiea (Ph.Hg.VI.) beschriebene Türkölösung ist zu diesem Zweck im allgemeinen geeignet und hat sich gut bewährt, ist jedoch zur Bestimmung der Thrombozytenzahl nicht geeignet. Dies ist ein wichtiger Nachteil, weil die gemeinsame Durchführung der beiden verbreiteten laboratorischen Versuchen sehr oft notwendig wäre. Zur Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl aus vollem Blut mit Hilfe eines normalen Lichtmikroskops ist eine Farbstofflösung erforderlich, welche

a) die vollständige Hämolyse der Erythrozyten ohne Reduktion der Thrombozyten- und Leukozytenzahl hervorruft;

b) sowohl die Thrombozyten als auch die Leukozyten fixiert; und

c) einen solchen Farbstoff enthält, welcher an den obengenannten Formkörpern mit einer grossen Affinität gebunden ist und auf diesem Wege dieselbe in normalem Licht fixiert.

Eine Lösung, welche den obigen ersten zwei Forderungen Genüge leistet, ist zwar bekannt (Scand. J. Clin. Invest. 33, 121 [1974]), die Thrombozytenzählung kann jedoch nur unter Anwendung eines Phasenkontrastmikroskops durchgeführt werden.

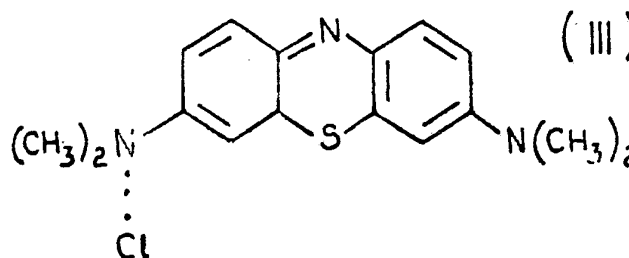
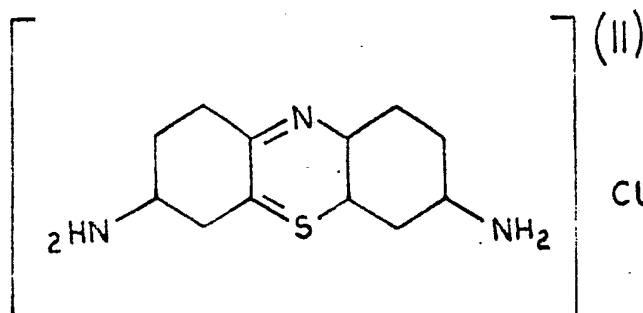
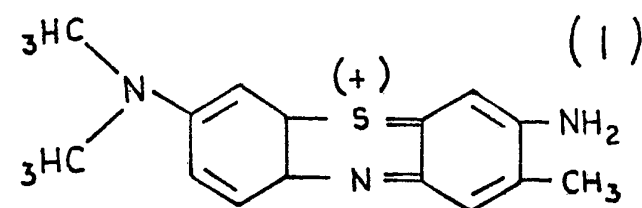
Das Ziel der Erfindung ist die Herstellung einer Farbstofflösung, mit welcher die Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl aus vollem Blut, unter Anwendung eines normalen Lichtmikroskops, unter Behebung der obigen Nachteile der bekannten Reagenzien durchgeführt werden kann.

Die Erfindung beruht auf der überraschenden Erkenntnis, dass durch Kombinierung der hämolsierenden-fixierenden Lösung mit einem basischen Farbstoff grosser Affinität eine zur gemeinsamen Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl unter Anwendung eines normalen Lichtmikroskops geeignete Reagenslösung erhalten wird. Die obigen beiden Bedingungen können in jenem Falle erfüllt werden, falls die hämolsierende-fixierende Lösung mit dem Farbstoff nicht inkompatibel ist, d.h. keinen Niederschlag bildet.

Die Bildung von mikroskopischen Niederschlägen soll vermieden werden, solche Niederschläge können nämlich einen Thrombozytencharakter aufweisen und damit das Ergebnis der Bestimmung verzerren.

Die bisher verwendeten Farbstofflösungen des Kresylviolett-Typs entsprechen nur teilweise den obigen Forderungen; die Kresylviolettfarbstoffkomponenten der Zählerlösung besitzen nämlich einen schwach basischen Charakter; deshalb werden die Thrombozyten nur blass gefärbt und die Leukozyten werden nicht eindeutig gezeigt.

Es wurde erfindungsgemäss gefunden, dass die sog. Thiazinfarbstoffe zu diesem Zweck ausgezeichnet geeignet sind. Die Farbstoffe des Thiazintyps sind durch die Gegenwart von zwei Chromophorgruppen gekennzeichnet. Verbindungen des Thiazintyps wurden in der ärztlichen Praxis bereits an verschiedenen Gebieten verwendet (z.B. Färbung von Bakterien, in der Histochemie), die Fach- und Patentliteratur enthält jedoch überhaupt keinen Hinweis auf die erfindungsgemässe Erkenntnis. Die wichtigsten Vertreter dieser Verbindungsgruppe sind das Toluidinblau (Formel I), das Thionin (Formel II) und das Methylenblau (Formel III).



Gegenstand der Erfindung ist ein Reagens zur gleichzeitigen Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl auf normalem lichtmikroskopischem Wege, dadurch gekennzeichnet, dass es 0,1–5 Gew. Teile Aceton, 0,05–2,0 Gew. Teile Formaldehyd und/oder Glutaraldehyd, 0,001–0,1 Gew. Teil eines Thiazinfarbstoffes — vorteilhaft Toluidinblau —, 0,1–2,0 Gew. Teile eines Mineralsalzes, vorteilhaft Natriumchlorid und zu 100 Gew. Teilen Wasser enthält.

Nach einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung besteht das Reagens aus 0,1–5,0 Gew. Teilen Aceton, 0,05–2,0 Gew. Teilen Formaldehyd, 0,001–0,1 Gew. Teile Toluidinblau und 0,1–2 Gew. Teilen Natriumchlorid.

Der besondere Vorteil der erfindungsgemäss verwendeten Farbstoffe besteht darin, dass diese auch gegenüber den sauren Makromolekülen der Thrombozyten und Leukozyten eine sehr grosse Affinität aufweisen und dementsprechend eine sehr intensive und markante Visualität zur Folge haben.

Der wichtigste Vorteil der erfindungsgemässen Reagenzien besteht darin, dass dieselben die Empfindlichkeit der bekannten Reagenzien wesentlich übertreffen. Diese Tatsache kann durch die folgenden Versuche nachgewiesen werden:

Die aus Proben mit einer unbekannten Thrombozyten- und Leukozytenzahl gewonnenen Ergebnisse werden im Laufe von zwanzig nacheinanderlaufenden Thrombozyten- und Leukozytenzahlbestimmungen erhalten. Die Genauigkeit der Zellenzählungsmethode ist dann befriedigend, wenn die standardde Deviation unter 10% liegt. Bei einer Thrombozytenzahl von 218,8 G/1 ist $SD = \pm 5,0$ und unter Anwendung dieser Werte beträgt der Variationskoeffizient (als standardde Deviation, in % ausgedrückt) 2,28 (Abbildung 1).

Es soll noch erwähnt werden, dass der G/1 Wert im SI System angegebene Thrombozyten- und Leukozytenzahl

bedeutet ($G/1 = \text{Giga [Zellenzahl]} 1 = \text{Zellenzahl} \times 10^9$) (Abbildung 1).

Der optimale Fehler der Leukozytenzählung beträgt bei einem Durchschnitt von 5,08 G/1, $SD = \pm 0,042$, was einem Variationskoeffizient von 0,8% entspricht (Abbildung 3).

Zum Vergleich wird die erfindungsgemässe Reagenslösung auf dem Gebiet der Thrombozytenzählung mit dem unter dem Namen THROMBOFIX® in Verkehr gebrachten Thrombozytenzählerpräparat der Firma Gödecke und auf dem Gebiet der Leukozytenzählung mit einer Türkölösung verglichen. Die Vergleichsversuche werden mit dem Blut von 41 Patienten, unter parallelen Thrombozyten- und Leukozytenzahlbestimmungen durchgeführt.

Die Ergebnisse werden im Descartes-Koordinatensystem angegeben (Abbildungen 2 und 4). Die Korrelation zwischen den beiden zwei Methoden und die standarden Parameter (a, b) der die Korrelationen beschreibenden Funktion $y = ax + b$ werden mit Hilfe einer Hewlett-Packard HP-90 Rechenmaschine bestimmt.

Bei der Thrombozytenzählung ist die Korrelation ($r = 0,927$; der lineare funktionelle Zusammenhang zwischen den beiden Methoden kann mit der Gleichung $y = 1,05x - 0,94$ beschrieben werden; $y =$ das mit der erfindungsgemässen Thrombozytenzählerlösung erhaltene Ergebnis; $x =$ das mit THROMBOFIX® erhaltene Ergebnis (Abbildung 2).

Es kann festgestellt werden, dass die unter Anwendung der erfindungsgemässen Reagenslösung erhaltene Thrombozytenzahl um etwa 5% höher ist, als die aus der selben Probe unter Anwendung von THROMBOFIX® erhaltene Thrombozytenzahl.

Unter Berücksichtigung des Charakters der Bestimmung kommt eine Übermessung nicht in Betracht. Der erhaltene Unterschied kann der Tatsache zugeschrieben werden, dass die Farbstoffkomponente der erfindungsgemässen Reagenslösung zu den sauren Gruppen der Makromolekülen der Thrombozyten eine wesentlich grössere Affinität zeigt, das Bild weist deshalb stärkere Kontraste auf und kann besser wahrgenommen werden. Unter Anwendung der erfindungsgemässen Reagenslösung kann also die mit den bekannten Farbstofflösungen erhaltene systematische Untermessung eliminiert werden.

Es soll noch erwähnt werden, dass das THROMBOFIX® auch unter Anwendung eines Phasenkontrastmikroskops eine ähnliche Untermessung zeigte.

Bei der Leukozytenzählung zeigt die erfindungsgemässe Methode mit der Türkölösung eine Korrelation $r = 0,959$; der Zusammenhang kann mit der linearen Funktion $y = 0,97x + 0,23$ beschrieben werden. Dies weist darauf hin, dass zwischen den beiden Verfahren kein signifikanter Unterschied vorliegt.

Weitere Einzelheiten der Herstellung und Anwendung der erfindungsgemässen Reagenslösung sind den nachstehenden Beispielen zu entnehmen, ohne den Schutzzumfang auf diese Beispiele einzuschränken.

Beispiel 1

Zählerlösung

200 ml einer mit destilliertem Wasser gebildeten 0,9%igen Natriumchloridlösung werden mit 5 ml 35%igem Formaldehyd und 770 ml ionenausgetauschtem destilliertem Wasser vermischt. Nach starker Umrührung werden in der Lösung 100 mg Toluidinblaufarbstoff gelöst. Die erhaltene Lösung wird durch ein G-4 Glasfilter filtriert. Nach Zugabe von 25 ml Aceton muss die Lösung klar und partikelfrei sein.

Beispiel 2

Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl in mit einem Antigerinnungsmittel behandelten venösen Blut

Das Blut wird zweckmässig mit Äthylendiamintetraessigsäure als Antigerinnungsmittel behandelt, weil in Gegenwart von Äthylendiamintetraessigsäure nicht einmal eine minimale Ausscheidung der Thrombozyten erfolgt. Nach Abnahme des Blutes mit Äthylendiamintetraessigsäure wird die Äthylendiamintetraessigsäurekonzentration durch vorherige Eintrocknung einer wässrigen Dinatriumäthylendiamintetraessigsäure-Stammlösung in einem Kunststoffröhrchen auf 2 mg/ml eingestellt. Die Blutgerinnung kann auch unter Anwendung einer mit destilliertem Wasser gebildeten, 3,3%igen Trinatriumcitratlösung verhindert werden; bei der Abnahme des Blutes in einer Kunststoffkanüle beträgt das Verhältnis 9 Teile Blut zu 1 Teil Citrat.

Durchführung des Verfahrens:

Zu 25 µl gerinnungsverhinderten venösen Blut werden in einem Kunststoffprobierröhrchen 475 µl der Zählerlösung zugegeben und die Mischung wird ohne Aufrührung bei Raumtemperatur 15 Minuten lang stengelassen. Die Zählung der Thrombozyten und Leukozyten muss innerhalb von 6 Stunden durchgeführt werden. Vor der Zählung wird die Lösung wieder aufgerührt, tropfenweise in eine Bürker-Kammer gegeben und in der feuchten Kammer 10 Minuten lang sedimentieren gelassen.

a) Thrombozytenzählung

Die Summe der in den 10 Rechtecken der Bürker-Kammer gezählten Thrombozytenzahl wird mit 2 (Gerinnung mit Äthylendiamintetraessigsäure verhindert) bzw. 2,2 (Gerinnung mit Citrat verhindert) multipliziert. Die Thrombozytenzahl wird in G/l erhalten.

b) Leukozytenzählung

Die Zahl der in vier, durch drei Linien begrenzten Qua-

draten gefundenen Leukozyten wird mit 18 dividiert (oder mit 0,055 multipliziert) im Falle der Gerinnungsverhinderung mit Citrat bzw. mit 20 dividiert (oder mit 0,05 multipliziert), falls die Gerinnungsverhinderung mit Äthylendiamintetraessigsäure durchgeführt wurde. Die Leukozytenzahl wird in G/l erhalten.

Beispiel 3

Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl aus kapillarem Blut

Eine desinfizierte Fingerspitze oder Ferse wird gestochen, der erste Blutropfen wird abgestrichen und 25 µl Blut in eine Pipette mit einer Kunststoffspritze (Typ: z.B. Finnpiquette, Gilson oder Eppendorf usw.) aufgesaugt. Diese Blutmenge wird in ein Kunststoffröhrchen, welches 25 µl einer 2 mg/ml Äthylendiamintetraessigsäurelösung enthält, eingewogen und mit dem Antigerinnungsmittel gut vermischt. Nach Zugabe von 450 µl der Zählerlösung und gründlichem Schütteln wird die Lösung bei Raumtemperatur mindestens 15 Minuten lang stengelassen, nach erneuter Aufrührung tropfenweise in eine Bürker-Kammer gegeben und in der feuchten Kammer 10 Minuten lang sedimentieren gelassen.

Die Thrombozytenzahl und Leukozytenzahl wird auf ähnliche Weise wie bei dem mit einem Antigerinnungsmittel behandelten Blut bestimmt; bei der Thrombozytenzählung beträgt der Multiplikationsfaktor 2; bei der Leukozytenzählung muss mit 20 dividiert werden.

Beispiel 4

Man verfährt wie im Beispiel 1, mit dem Unterschied, dass man anstatt Formaldehyd 80 g eines 25%igen Glutaraldehyds verwendet.

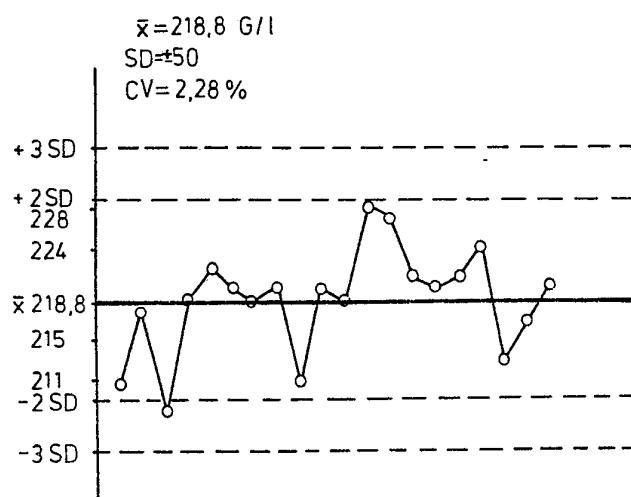


Abb. 1

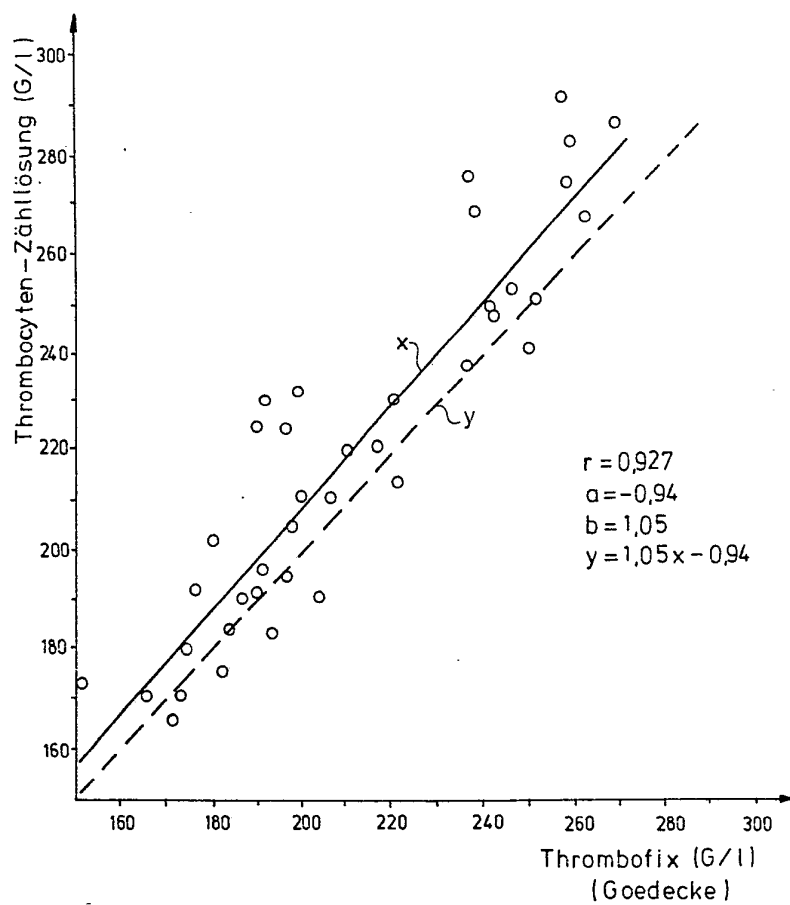


Abb. 2

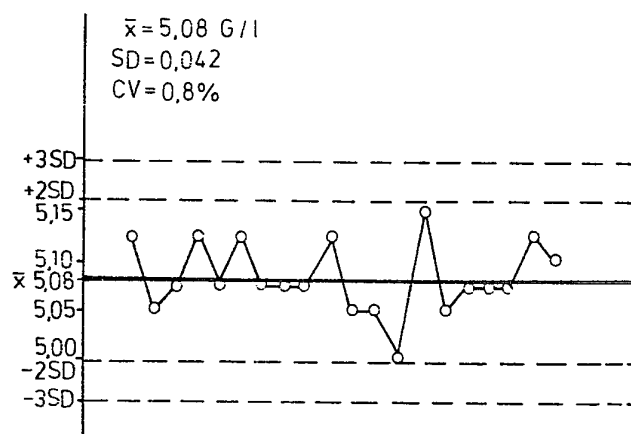


Abb. 3

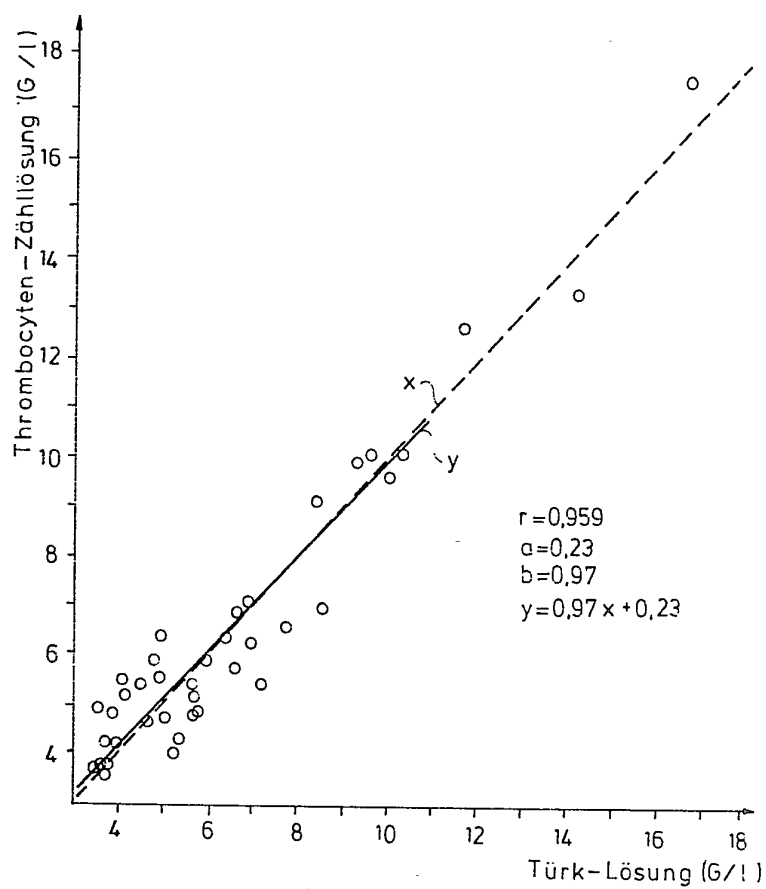


Abb. 4