



Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer:

390 844 B

(12)

PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 2799/84

(51) Int.Cl.⁵ : **G01N 33/50**
G01N 33/52

(22) Anmeldetag: 31. 8.1984

(42) Beginn der Patentdauer: 15.12.1989

(45) Ausgabetag: 10. 7.1990

(30) Priorität:

2. 9.1983 HU 3060/83 beansprucht.

(56) Entgegenhaltungen:

US-PS4290769 US-PS4392864

(73) Patentinhaber:

REANAL FINOMVEGYSZERGYAR
BUDAPEST (HU).

(72) Erfinder:

MUSZBEK LASZLO DR.
DEBRECEN (HU).
ADANY ROZA DR.
DEBRECEN (HU).
HARSANYI ILONA
BUDAPEST (HU).
ZAJKA GABRIELLA DR.
BUDAPEST (HU).

(54) REAGENS ZUR BESTIMMUNG DER THROMBOZYTEN- UND LEUKOZYTENZAH

(57) Zur gleichzeitigen Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl auf normalem lichtmikroskopischem Wege wird ein Reagens verwendet, das 0,1 - 5 Gew. Teile Aceton, 0,05 - 2,0 Gew. Teile Formaldehyd 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.

AT 390 844 B

Die Erfindung betrifft ein Reagens zur Bestimmung der Thrombozyten und Leukozytenzahl.

Gegenstand der Erfindung ist ein zur gleichzeitigen Bestimmung der Thrombozyten und Leukozytenzahl in Vollblut auf normalem lichtmikroskopischem Wege geeignetes, Aceton und Formaldehyd oder Glutaraldehyd, Mineralsalze und Farbstoffe enthaltendes Reagens.

5 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 beschafft werden. Diese Methode ist zur
10 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
15 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 (Gentiana-violett; chemischer Name: Hexamethyl-p-rosanilin-hydrochlorid) eingesetzt.
20 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 Türklösung ist zu diesem Zweck im allgemeinen geeignet und hat sich gut bewährt, ist jedoch zur Bestimmung der Thrombozytenzahl nicht geeignet.
25 Dies ist ein wichtiger Nachteil, weil die gemeinsame Durchführung der beiden verbreiteten Laboratoriumsuntersuchungen sehr oft notwendig wäre. Zur Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl in Vollblut mit Hilfe eines normalen Lichtmikroskops ist eine Farbstofflösung erforderlich, welche

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

30 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 normalen 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
35 Phasenkontrastmikroskops durchgeführt werden.

Das Ziel der Erfindung ist es, eine Farbstofflösung zur Verfügung zu stellen, mit welcher die Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl in Vollblut, 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 Kombination der haemolysierenden-
40 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 haemolysierende-
fixierende Lösung mit dem Farbstoff nicht inkompatibel ist, d. h. keinen Niederschlag bildet.

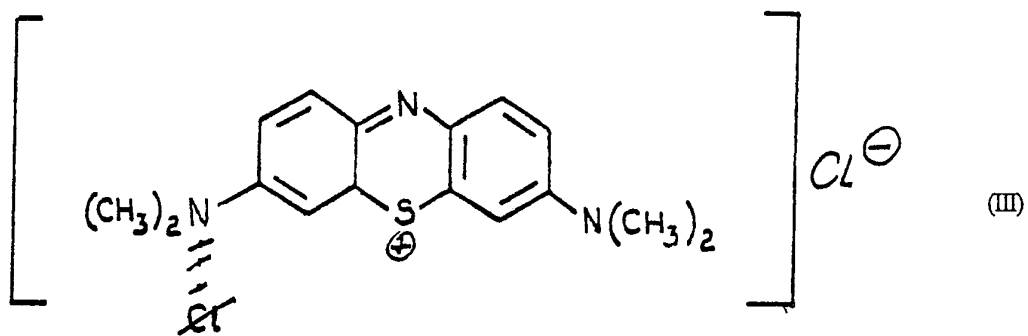
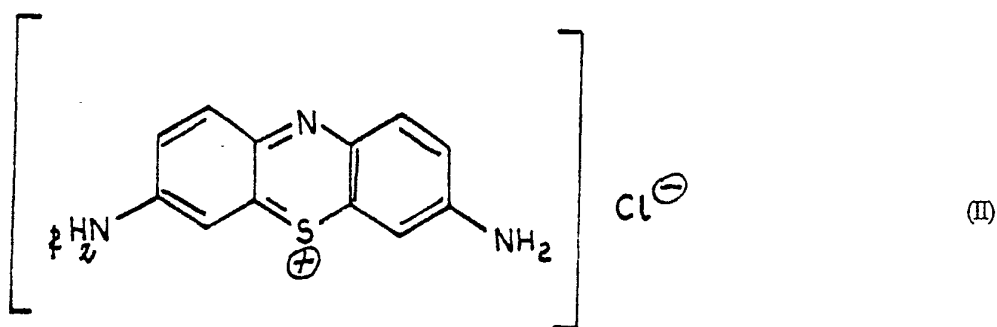
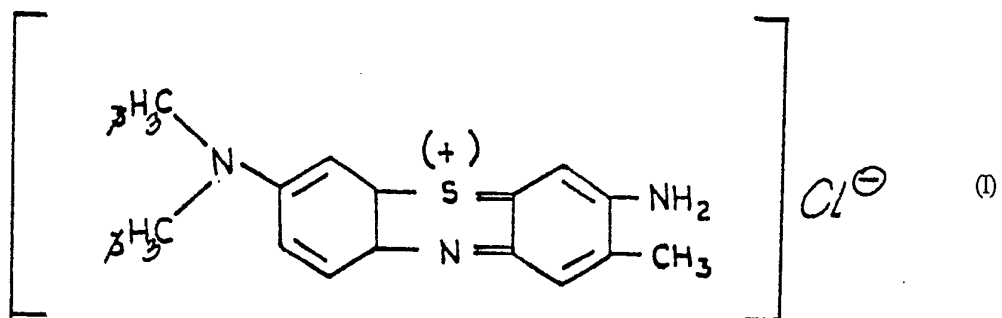
Die Bildung von mikroskopischen Niederschlägen soll vermieden werden, solche Niederschläge können
45 nämlich einen Thrombozytencharakter aufweisen und damit das Ergebnis der Bestimmung verzerren.

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 gefunden, daß die sog. Thiazinfarbstoffe zu diesem Zweck ausgezeichnet geeignet sind. Die
50 Farbstoffe des Thiazintyps sind durch die Gegenwart zweier chromophorer Gruppen gekennzeichnet. Verbindungen des Thiazintyps wurden in der ärztlichen Praxis bereits in verschiedenen Gebieten verwendet (z. B. Färbung von Bakterien, in der Histochemie), die Fach- und Patendliteratur enthält jedoch überhaupt keinen Hinweis auf die Erkenntnis. Die wichtigsten Vertreter dieser Verbindungsgruppe sind das Toluidinblau (Formel I), das Thionin (Formel II) und das Methylenblau (Formel III).

55

60



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. Teil 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 Zellzählungsmethode ist dann befriedigend, wenn die Standardabweichung unter 10 % liegt. Bei einer Thrombozytenzahl von 218,8 G/l ist SD = $\pm 5,0$ und unter Anwendung dieser Werte beträgt der Variationskoeffizient (als Standarddeviation, in % ausgedrückt) 2,28 (Abbildung 1). Es soll noch erwähnt werden, daß der G/l Wert die im SI-System angegebene Thrombozyten- und Leukozytenzahl bedeutet [$G/l = \text{Giga}[\text{Zellenzahl}]/l = \text{Zellenzahl} \times 10^9$] (Abbildung 1).

Der optimale Fehler der Leukozytenzählung beträgt bei einem Durchschnitt von 5,08 G/l, 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^R 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 $y = a \cdot x + b$ werden mit Hilfe einer Rechenmaschine bestimmt.

Bei der Thrombozytenzählung ist die Korrelation (r) = 0,927; der lineare funktionelle Zusammenhang zwischen den beiden Methoden kann mit der Gleichung $y = 1,05 \cdot x - 0,94$ beschrieben werden; y = das mit der erfindungsgemäßen Thrombozytenzählerlösung erhaltene Ergebnis; x = das mit THROMBOFIX^R 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^R 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^R auch unter Anwendung eines Phasenkontrastmikroskops eine ähnliche Untermessung zeigte.

Bei der Leukozytenzählung zeigt die erfindungsgemäße Methode mit der Türkölösung eine Korrelation $r = 0,059$; der Zusammenhang kann mit der linearen Funktion $y = 0,97 \cdot x + 0,23$ 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 entionisiertem 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 behandeltem venösem 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 gerinnungsgehindertem venösen Blut werden in einem Kunststoffprobierröhrchen 475 µm der Zählerlösung zugegeben und die Mischung wird ohne Aufrührung bei Raumtemperatur 15 Minuten lang stehengelassen. 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 Trombozytenzahl wird in G/l erhalten.

b) Leukozytenzählung

Die Zahl der in vier, durch drei Linien begrenzten Quadraten gefundenen Leukozyten wird durch 18 dividiert (oder mit 0,055 multipliziert) im Falle der Gerinnungsverhinderung mit Citrat bzw. durch 20 dividiert (oder mit 0,05 multipliziert), falls die Gerinnungshemmung 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 µm Blut in eine Pipette mit einer Kunststoffspritze (Typ: z. B. Finnipette, 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 Zählösung und gründlichem Schütteln wird die Lösung bei Raumtemperatur mindestens 15 Minuten lang stehen gelassen, 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 durch 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.

PATENTANSPRUCH

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.

Hiezu 4 Blatt Zeichnungen

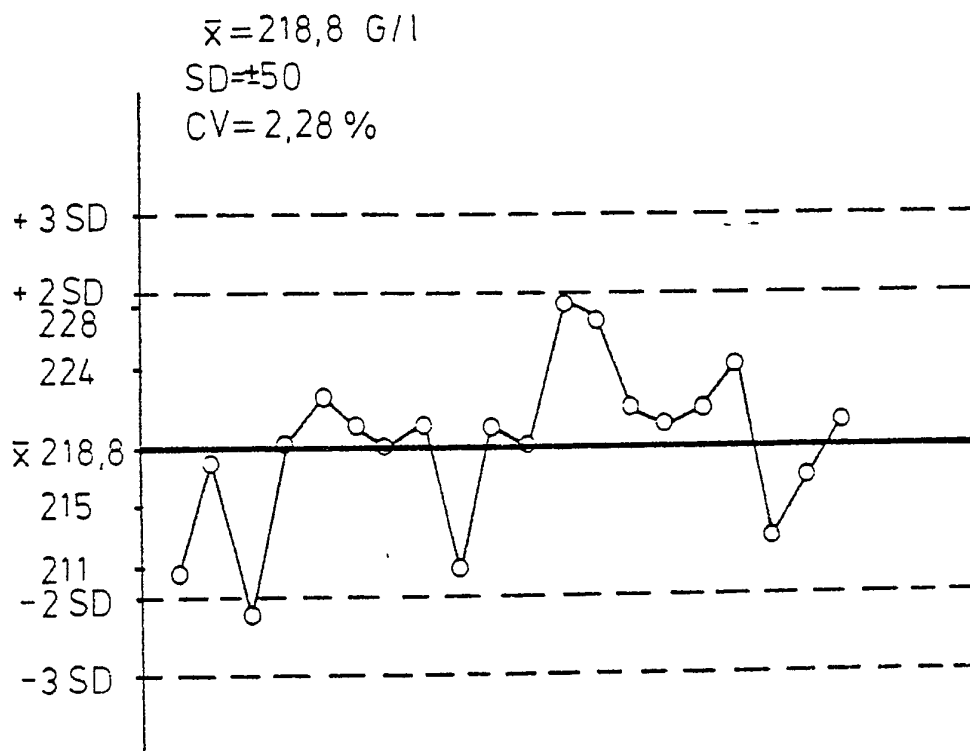


Fig. 1

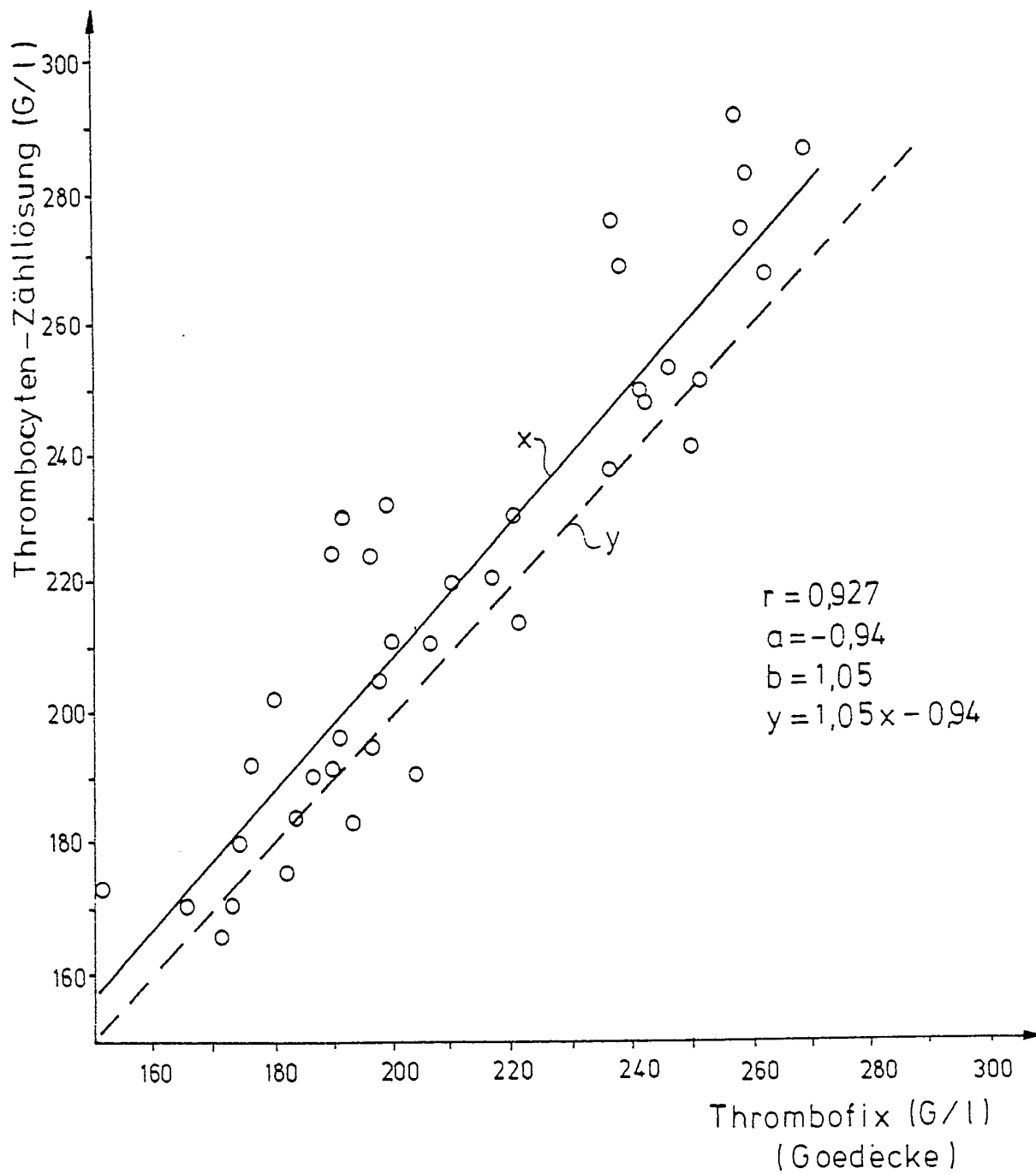


Fig. 2

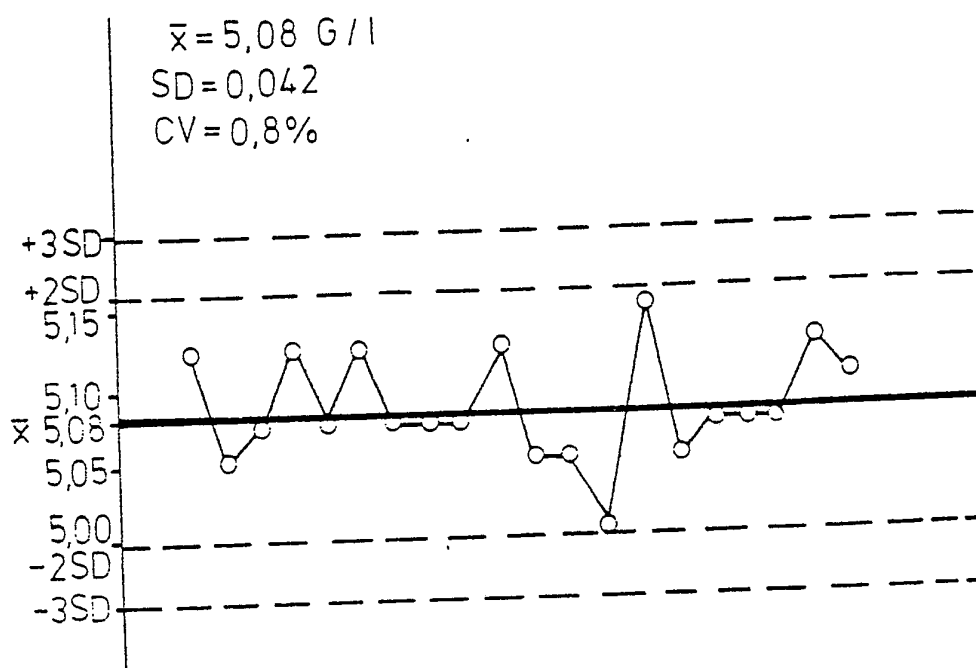


Fig. 5

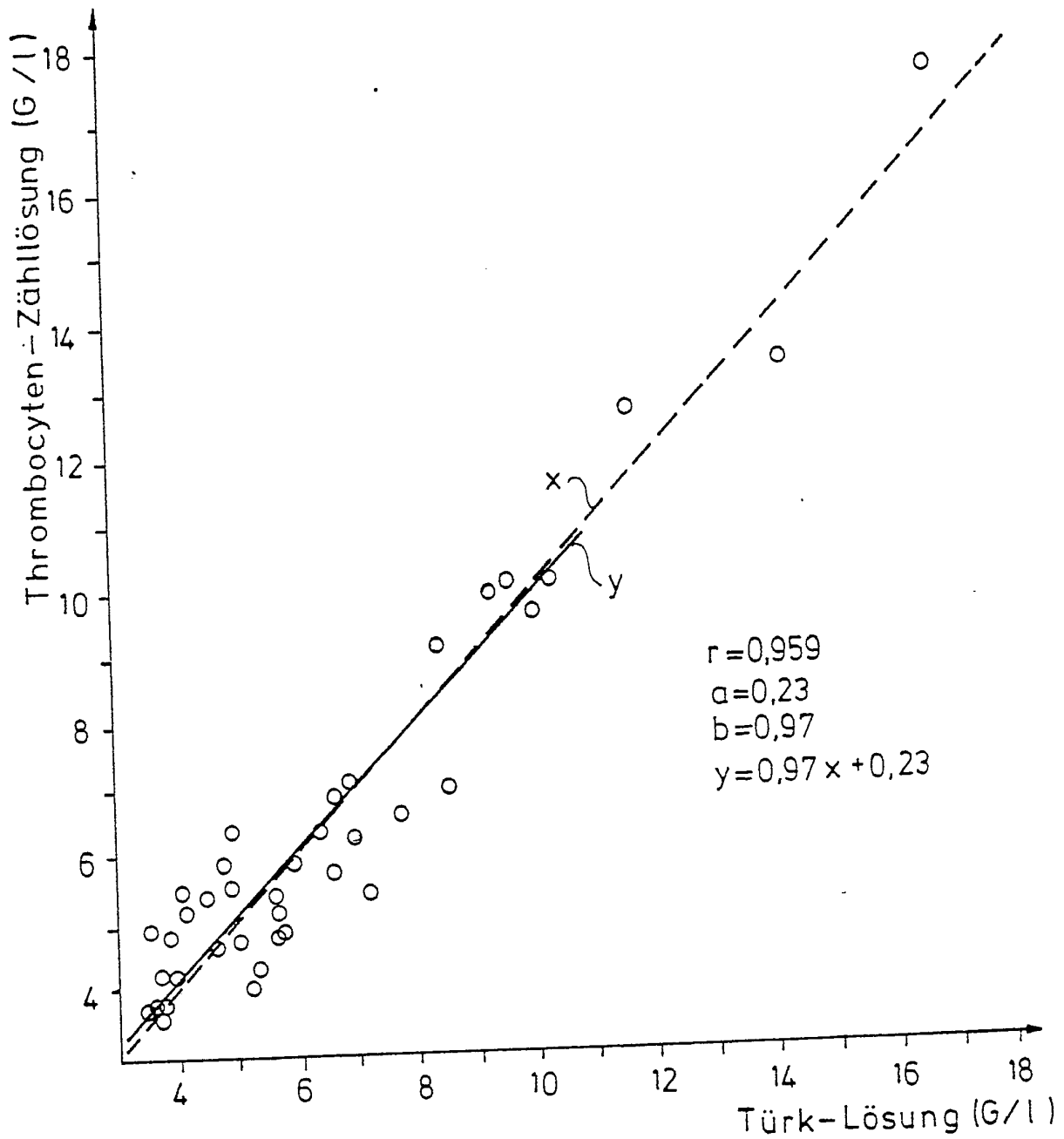


Fig. 4