

(12) **Ausschließungspatent**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **232 557 A5**4(51) **G 01 N 33/49****AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP G 01 N / 266 855 7
 (31) 3060/83

(22) 31.08.84
 (32) 02.09.83

(44) 29.01.86
 (33) HU

(71) siehe (73)

(72) Muszbek, László, Dr.; Ádány, Róza, Dr.; Harsányi, Ilona; Zajka, Gabriella, Dr., HU

(73) Reanal Finomvegyszergyár, Budapest XIV, Telepes u. 53, HU

(54) **Reagens zur Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl und Verfahren zur Herstellung desselben**

(57) Die Erfindung betrifft ein Reagens zur gleichzeitigen Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl auf lichtmikroskopischem Wege, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es 0,1–5 Gew. Teile Aceton, 0,05–2,0 Gew. Teile Formaldehyd oder Glutaraldehyd, 0,001–0,1 Gew. Teile eines Thiazinfarbstoffes, insbesondere Toluidinblau, 0,1–2,0 Gew. Teile eines Mineralsalzes, vorzugsweise Natriumchlorid und ad 100 Gew. Teile Wasser enthält.

Patentansprüche:

1. Reagens zur gleichzeitigen Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl auf lichtmikroskopischem Wege, **gekennzeichnet dadurch**, daß es 0,1–5 Gew.-Teile Aceton, 0,05–2,0 Gew.-Teile Formaldehyd und/oder Glutaraldehyd, 0,001–0,1 Gew.-Teile eines Thiazinfarbstoffes, vorzugsweise Toluidinblau, 0,1–2,0 Gew.-Teile eines Mineralsalzes, vorzugsweise Natriumchlorid, und ad 100 Gew.-Teile Wasser enthält.
2. Verfahren zur Herstellung eines zur gleichzeitigen Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl auf normalem lichtmikroskopischem Wege geeigneten Reagens, **gekennzeichnet dadurch**, daß man 0,1–5 Gew.-Teile Aceton, 0,05–2,0 Gew.-Teile Formaldehyd oder Glutaraldehyd, 0,001–0,1 Gew.-Teile eines Thiazinfarbstoffes, vorzugsweise Toluidinblau, 0,1–2,0 Gew.-Teile eines Mineralsalzes mit einer ad 100 Gew.-Teilen notwendigen Menge von Wasser vermischt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß man 200 ml einer 0,9%igen Natriumschwermetalllösung, 25 ml Aceton, 5 ml eines 35%igen Formaldehyds, 770 ml ionenaustauschtes destilliertes Wasser und 100 mg Toluidinblaufarbstoff miteinander vermischt.

Hierzu 4 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Reagens zur Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl auf normalem lichtmikroskopischem Wege und ein Verfahren zur Herstellung desselben.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bekannt, daß die Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl ein in klinischen Laboren häufig durchzuführender Vorgang ist. Die Thrombozytenzählung kann nach verschiedenen Methoden erfolgen:

- 1) Elektronische Partikelzählung mit speziell zur Thrombozytenzählung entwickelten Automaten. Obwohl diese Methode schnell und einfach ist, müssen sehr kostspielige Instrumente beschafft werden. Diese Methode ist als Ersatz der mikroskopischen Bestimmung nicht immer geeignet. Die Reproduzierbarkeit dieses Verfahrens ist auch schlechter als die der mikroskopischen Zählung.
- 2) Thrombozytenzählung mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops unter Anwendung einer kokain- oder novokainhaltigen Lösung oder einer anderen Thrombozytenzählerlösung. Für die Durchführung dieses Verfahrens ist ein kostspieliges Phasenkontrastmikroskop erforderlich. Ein weiterer wesentlicher Nachteil besteht darin, daß diese Methode für das die Versuche durchführende Personal ermüdend und anstrengend ist, insbesondere bei einer hohen Versuchszahl, wo es vor allem zu einer Schädigung der Augen kommen kann.
- 3) Bestimmung der Thrombozytenzahl mit einer Färbungsmethode. Dieses Verfahren ist das einfachste und kann mit Hilfe eines normalen Mikroskops durchgeführt werden. Nach den gegenwärtig verwendeten Methoden wird als Farbstoff Kristallviolett (Genzianviolett chemische Bezeichnung: Hexamethyl-p-rosanilin-hydrochlorid) eingesetzt. Gegenüber dieser Methode wird der berechtigte Einwand erhoben, daß sie im Vergleich zur Phasenkontrastbestimmung ungenau ist, weil nicht alle Thrombozyten einwandfrei und damit gut erkennbar gefärbt werden.

In der haematologischen Diagnostik stellt die Leukozytenzählung die am häufigsten angewendete Methode dar. Die im ungarischen Pharmakopia (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 erheblicher Nachteil, weil eine gemeinsame Durchführung der beiden Untersuchungen sehr oft notwendig wäre. Zur Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl aus vollem Blut mit Hilfe eines normalen Lichtmikroskops ist eine Farbstofflösung erforderlich, die

- a) die vollständige Haemolyse der Erythrozyten ohne Reduktion der Thrombozyten- und Leukozytenzahl hervorruft,
- b) sowohl die Thrombozyten als auch die Leukozyten fixiert und
- c) einen solchen Farbstoff enthält, der an den obengenannten Formkörpern mit einer großen Affinität gebunden ist und auf diesem Wege dieselben in normalem Licht fixiert.

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

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung einer Farbstofflösung, mit der 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.

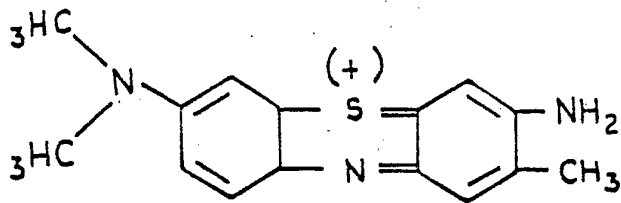
Darlegung des Wesens der Erfindung

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

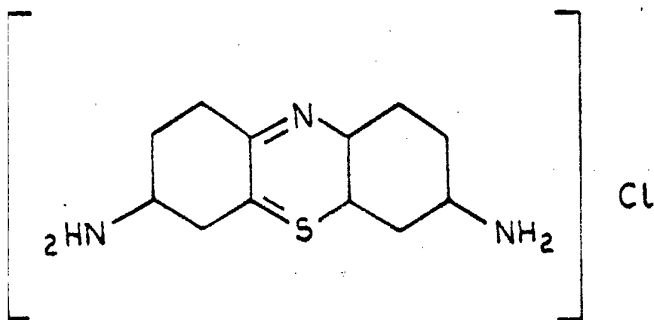
Die Bildung von mikroskopischen Niederschlägen muß nämlich vermieden werden, da solche Niederschläge einen Thrombozytencharakter aufweisen und damit das Ergebnis der Bestimmung verfälschen können.

Die bisher verwendeten Farbstofflösungen vom Kresylviolett-Typ 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 erkennbar.

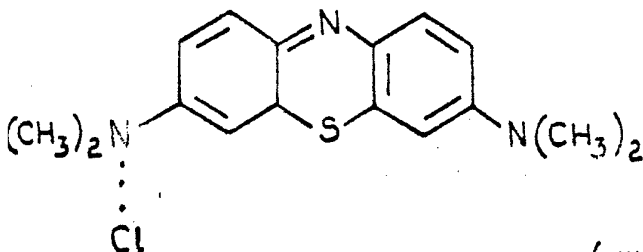
Erfindungsgemäß wurde gefunden, daß die sog. Thiazinfarbstoffe für diesen Zweck ausgezeichnet geeignet sind. Die Farbstoffe vom Thiazintyp sind durch die Gegenwart von zwei Chromophorgruppen gekennzeichnet. Verbindungen vom Thiazintyp wurden in der ärztlichen Praxis bereits auf verschiedenen Gebieten verwendet (z. B. Färbung von Bakterien, in der Histochemie), die Fach- und Patentliteratur enthält jedoch keinerlei Hinweis auf die erfindungsgemäße Erkenntnis. Die wichtigsten Vertreter dieser Verbindungsgruppe sind das Toluidinblau (Formel I), das Thionin (Formel II) und das Methylenblau (Formel III).



(I)



(II)



(III)

Gegenstand der Erfindung ist daher ein Reagens zur gleichzeitigen Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl auf normalem lichtmikroskopischem Weg, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es 0,1–5 Gew.-Teile Formaldehyd und/oder Glutaraldehyd, 0,001–0,1 Gew.-Teile eines Thiazinfarbstoffes, vorzugsweise Toluidinblau, 0,1–2,0 Gew.-Teile eines Mineralsalzes, vorzugsweise Natriumchlorid und ad 100 Gew.-Teile Wasser enthält. Nach einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung enthält das Reagens 0,1–5,0 Gew.-Teile Aceton, 0,05–2,0 Gew.-Teile Aceton, 0,05–2,0 Gew.-Teile Formaldehyd, 0,001–0,1 Gew.-Teile Toluidinblau, 0,1–2 Gew.-Teile Natriumchlorid und ad 100 Gew.-Teile Wasser.

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

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

Zum Vergleich wird die erfindungsgemäße Reagenslösung auf dem Gebiet der Thrombozytenzählung mit dem unter dem Handelsnamen THROMBOFIX® in den Verkehr gebrachten Thrombozytenzählerpräparat und auf dem Gebiet der Leukozytenzählung mit einer Türklösung verglichen. Die Vergleichsversuche werden mit dem Blut von 41 Patienten (Thrombozyten- und Leukozytenzahlbestimmung) durchgeführt.

Die Ergebnisse sind im kartesischen Koordinatensystem angegeben (Fig. 2 und 4). Die Korrelation zwischen den beiden Methoden und die Parameter (a, b) der bei Korrelationen beschreibenden Funktion $y = ax + b$ werden mit Hilfe eines Rechners vom Typ HP90 der Fa. Hewlett-Packard/USA bestimmt.

Bei der Thrombozytenzählung beträgt die Korrelation r von 0,927; der lineare funktionelle Zusammenhang zwischen den beiden Methoden kann durch die Gleichung $y = 1,05x - 0,94$ beschrieben werden. Hierin sind y das mit der erfindungsgemäßen Thrombozytenzählerlösung erhaltene Ergebnis und x das mit THROMBOFIX® erhaltene Ergebnis (Fig. 2).

Es wurde festgestellt, daß die beim Arbeiten mit der erfindungsgemäßen Reagenslösung erhaltene Thrombozytenzahl um etwa 5% höher ist als die bei der selben Probe unter Anwendung von THROMBOFIX® erhaltene.

Unter Berücksichtigung des Charakters der Bestimmung kann ein zu hohes Ergebnis nicht vorliegen. Der erhaltene Unterschied ist also dem Umstand zuzuschreiben, daß die Farbstoffkomponente der erfindungsgemäßen Reagenslösung zu den sauren Gruppen der Makromolekülen der Thrombozyten eine wesentlich größere Affinität zeigt, wodurch das Bild stärkere Kontraste aufweist und besser wahrgenommen werden kann. Beim Arbeiten mit der erfindungsgemäßen Reagenslösung kann also die mit den bekannten Farbstofflösungen erhaltene systematische „Untermessung“ vermieden werden.

Es sei noch erwähnt, daß das THROMBOFIX® auch unter Anwendung eines Phasenkontrastmikroskops eine ähnliche „Untermessung“ zeigte.

Bei der Leukozytenzählung zeigt die erfindungsgemäße Methode mit der Türklösung eine Korrelation r von 0,959; der Zusammenhang kann durch die lineare Funktion $y = 0,97x + 0,23$ beschrieben werden. Dies weist darauf hin, daß zwischen den beiden Verfahren kein signifikanter Unterschied vorhanden ist.

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

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Zählerlösung

200 ml einer 0,9%igen Lösung von Natriumchlorid in destilliertem Wasser werden mit 5 ml 35%igen Formaldehyd und 770 ml ionenausgetauschtem destilliertem Wasser vermischt. Nach starkem Umrühren 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 jegliche, auch die geringste Ausscheidung von Thrombozyten vermieden wird. Nach der 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 mit einer Kunststoffkanüle beträgt das Verhältnis von Blut zu Citrat 9:1.

Durchführung des Verfahrens

Zu 25 µl gerinnungsverhinderten venösen Blut werden in einem Kunststoffproberröhrchen 475 µl der Zählerlösung gegeben, und die Mischung wird ohne Umrühren 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 umgerührt, 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 Quadranten 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 Gerinnungsverhinderung mit Äthylendiamintetraessigsäure erfolgte. Die Leukozytenzahl wird in G/l erhalten.

Beispiel 3

Bestimmung der Thrombozyten- und Leukozytenzahl aus kapillarem Blut

Eine desinfizierte Fingerspitze oder Ferse wird angestochen, der erste Blutstropfen wird abgestrichen; woraufhin 25 µl Blut in eine Pipette mit einer Kunststoffspritze (z. B. Finnpipette, Gilson- oder Eppendorf-Pipette usw.) eingesaugt. 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 Zählerlösung und gründlichem Schütteln wird die Lösung bei Raumtemperatur mindestens 15 Minuten lang stehengelassen, nach erneutem Umrühren tropfenweise in eine Bürker-Kammer gegeben und in der feuchten Kammer 10 Minuten lang sedimentieren gelassen. Die Thrombozytenzahl und die Leukozytenzahl wird in ähnlicher 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 anstelle von Formaldehyd 80 g eines 25%igen Glutaraldehyds verwendet.

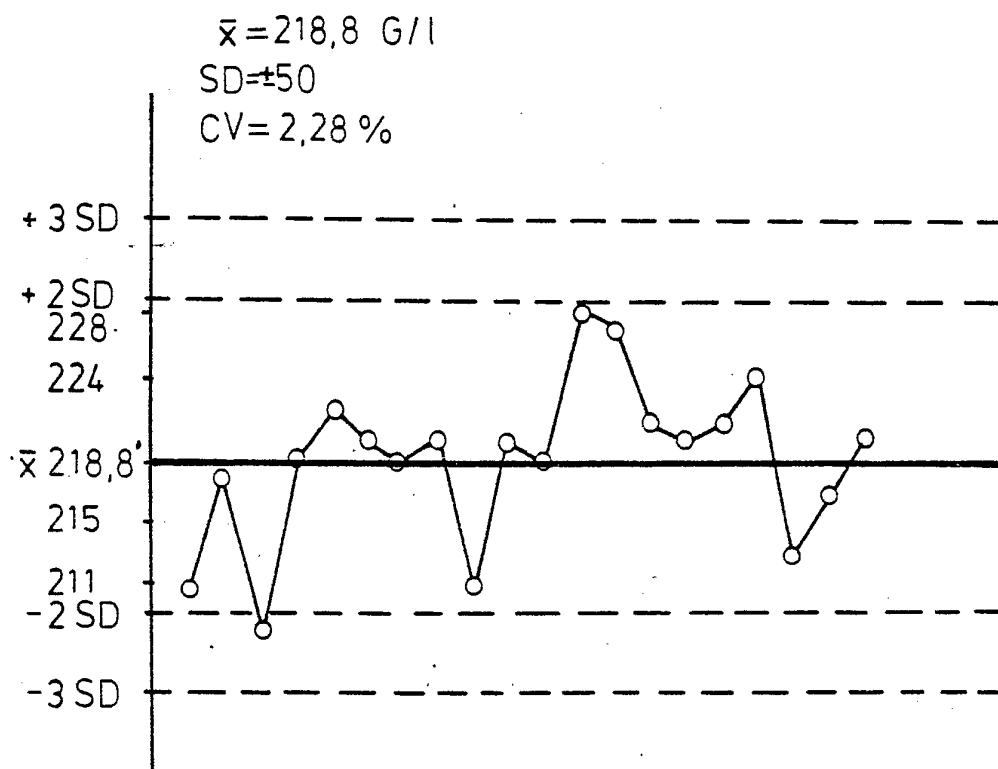


Fig. 1

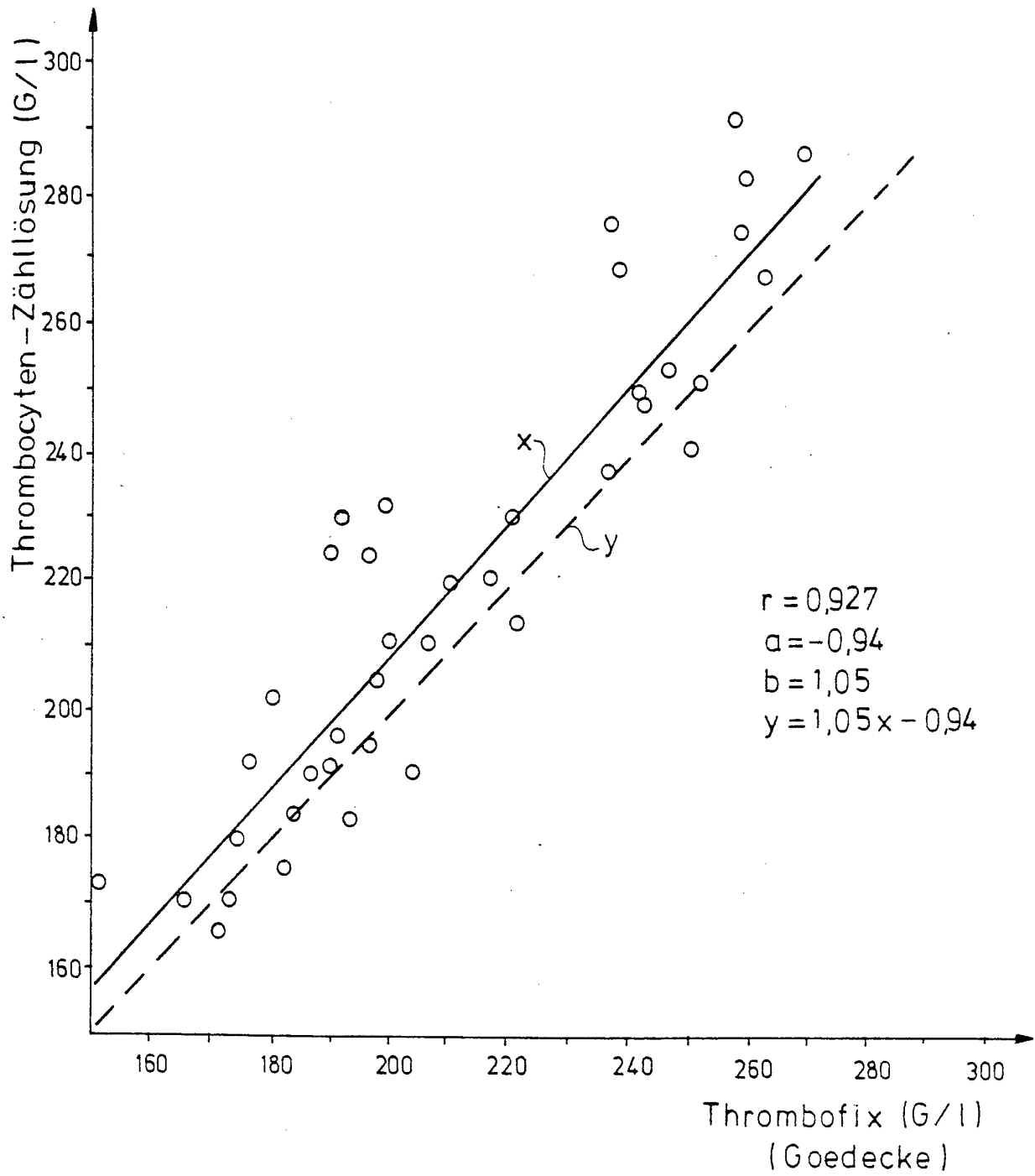


Fig. . 2

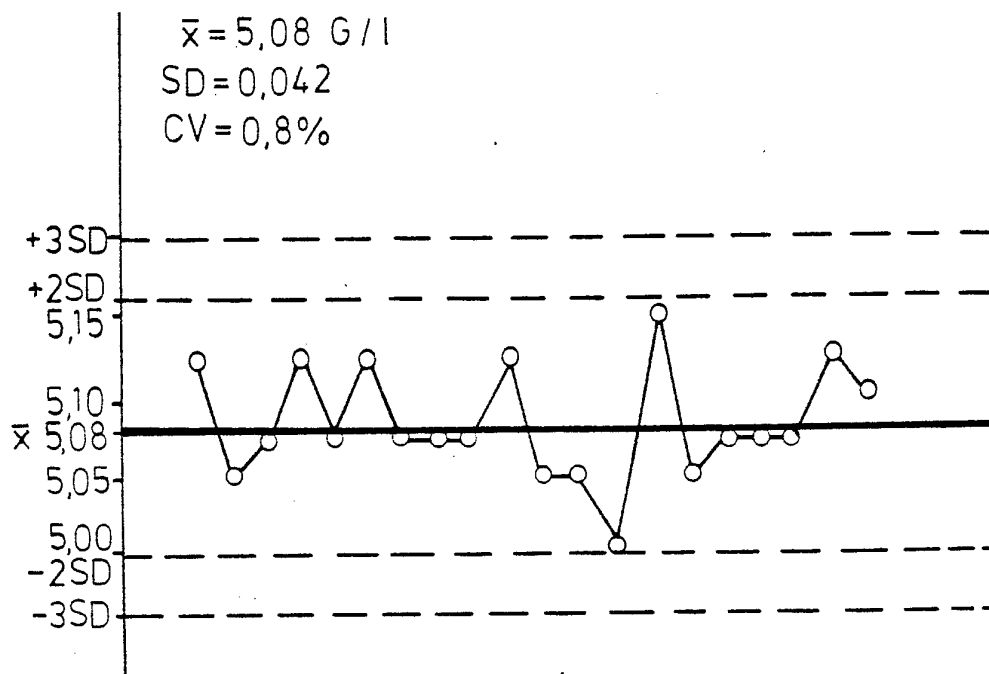


Fig. 3

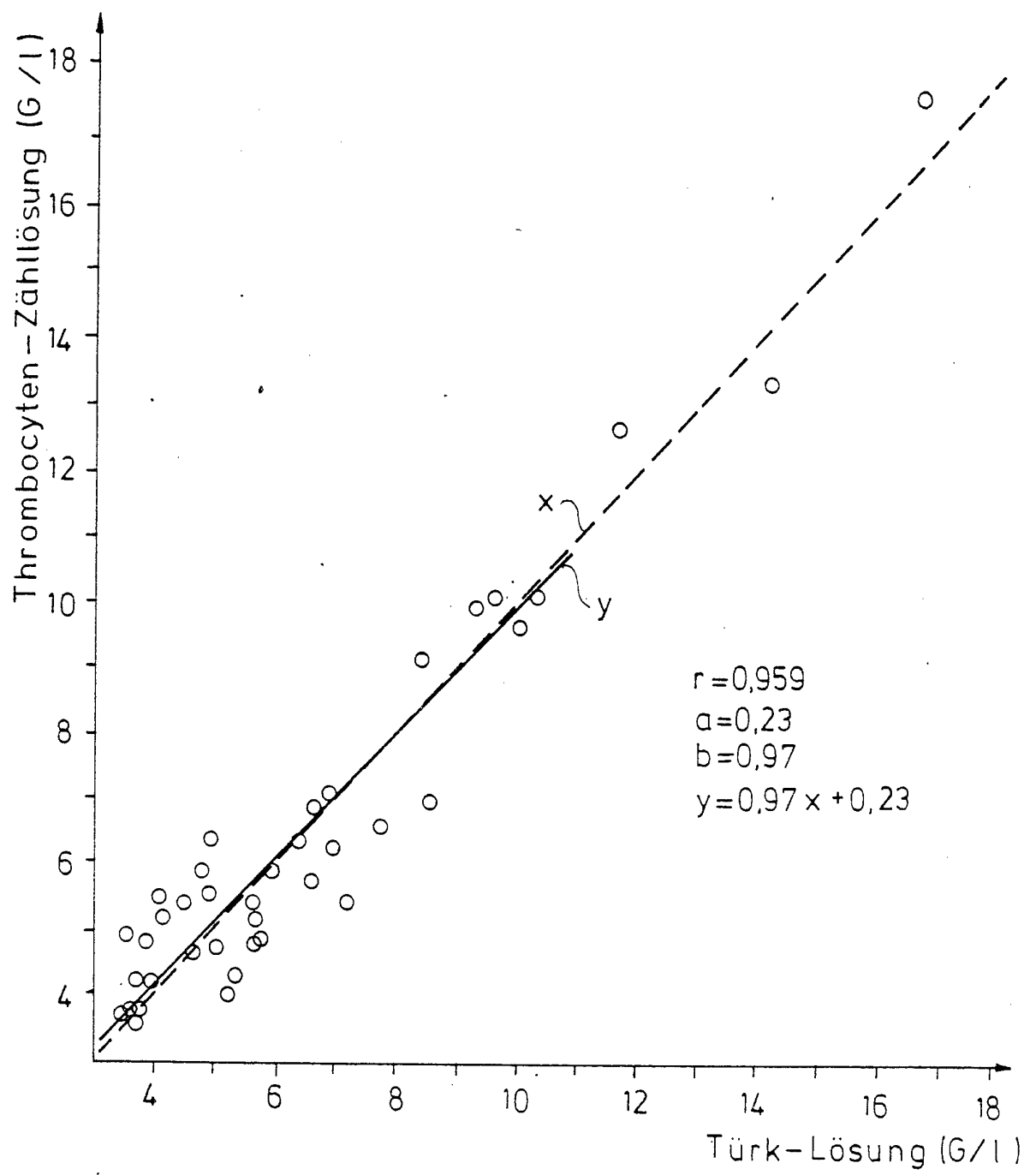


Fig. 4