

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

294 599

(13) Druh dokumentu:

B6

(51) Int. Cl. :⁷

G 01 N 33/72

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1998-1461**
(22) Přihlášeno: **12.05.1998**
(30) Právo přednosti: **13.05.1997 US 1997/854914**
(40) Zveřejněno: **16.12.1998**
(Věstník č. 12/1998)
(47) Uděleno: **08.12.04**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **16.02.2005**
(Věstník č. 2/2005)

(73) Majitel patentu:

BAYER CORPORATION, Tarrytown, NY, US

(72) Původce:

Malin Michael J., New Jersey, NJ, US

(74) Zástupce:

JUDr. Ivan Koreček, Na baště sv. Jiří 9, Praha 6, 16041

(54) Název vynálezu:

**Reagenční směs pro stanovení hemoglobinu v
krevním vzorku a způsob stanovení
hemoglobinu ve vzorku celé krve**

(57) Anotace:

Je popsána reagenční směs pro stanovení hemoglobinu v krevním vzorku, která obsahuje vodnou příměs nejméně jednoho povrchově aktivního činidla v množství, které je účinné pro hemolýzu buněk červených krvinek ve zmíněném vzorku a vznik micel; rozpustnou anorganickou kyanidovou sůl v množství, které je účinné pro vázání se na hemové molekuly, pocházející ze zmíněné hemolýzy krevních buněk; a pufr pH, schopný zachovat pH zmíněné směsi na hodnotě 10,0 až 11,2; kde zmíněná reagenční směs v příměsi se zmíněným krevním vzorkem nevyvolává interferenci způsobenou buňkami bílých krvinek v automatických způsobech stanovení hemoglobinu. Způsob stanovení hemoglobinu ve vzorku celé krve, zahrnuje smíšení alikvotního množství zmíněného krevního vzorku s reagenční směsí na reakční směs a analyzování této reakční směsi na automatickém hematologickém analyzačním přístroji za účelem stanovení hemoglobinu, při kterém se použije reagenční směs uvedená výše.

CZ 294599 B6

Reagenční směs pro stanovení hemoglobinu v krevním vzorku a způsob stanovení hemoglobinu ve vzorku celé krve

5 Oblast vynálezu

Tento vynález se týká reagenční směsi pro stanovení hemoglobinu v krevním vzorku a způsobu stanovení hemoglobinu ve vzorku celé krve, při analyzování této reakční směsi na automatickém hematologickém analyzačním přístroji za účelem stanovení hemoglobinu.

10

Dosavadní stav techniky

Měření hemoglobinu (dále též Hb) v celé krvi (dále též úplné krvi) se často provádí pomocí manuálních spektrofotometrických způsobů (metod) nebo poloautomatických a automatických
15 a hematologických analyzátorů a s nimi používaných způsobů a reagenčních látek. Poslední vývoj vysoce výkonných hematologických analyzátorů (např. až 100 vzorků za hodinu), např. řady TECHNICON H*TM, včetně systémů TECHNICON H*1TM, H*2TM a H*3TM, na které však výčet není omezen, vedl k potřebě způsobu stanovení hemoglobinu, které jsou ukončeny za asi
20 30 sekund nebo méně.

Kyanidové a bezkyanidové metody stanovení hemoglobinu a reagenční látky se používají v automatických analyzátoch hemoglobinu, jako je řada měřicích přístrojů TECHNICON H*TM, k rychlé a kvantitativní přeměně karboxyhemoglobinu (Hbco) v krevních vzorcích na
25 kvantifikovatelný reakční produkt, na příklad za méně než asi 24 sekund. Bylo zjištěno, že hemoglobinové kvantitativní rozborů, prováděné za použití jakéhokoliv automatického analyzátoru, nejsou ovlivněny přítomností až 100 % HbCO jako procenta celkového hemoglobinu v krvi. Vedle toho bylo zjištěno, že kyanidová i benzkyanidová metoda za použití automatických analyzátorů TECHNICON H*TM jsou srovnatelné, pokud se týká výkonových parametrů
30 linearity, přesnosti a převodu (carryover). Tyto metody byly dále v dobré korelaci s referenční manuální metodou stanovení hemoglobinu v normálních i abnormálních krevních vzorcích podle Mezinárodního výboru pro standardizaci v hematologii (ICSH – International Committee for Standardization of Hematology), což ukazuje na přijatelnou přesnost (M. J. Malin a kol., 1989, Am. J. Clin. Path., 92:286 – 294), M. J. Malin a kol. 1992, Analyt. Chim. Acta,
35 262–67–77).

Pokud se týká analýzy abnormálních krevních vzorků, které mohou obsahovat výjimečně vysoké hladiny buněk, zvláště bílých krvinek, může být obtížné u stávajících metod stanovení Hb a v nich použitých reagenčních látek dávat přesné hodnoty. Podle Wintrobe a kol. (1981, Clinical
40 Hematology, Lea and Febiger, Philadelphia, Pa. str. 208) je normální počet bílých krvinek řádu 3 až 10 x 10³ buněk/μl krve. Za středně vysoký normální počet lze považovat např. 8 x 10³/μl a za abnormálně vysoký počet bílých krvinek lze považovat asi 10 x 10³ buněk/μl a více.

Americký patent US 3 874 852 T.E. Hammilla obsahuje reagenční látku ke stanovení leukocytů a hemoglobinu v krvi, obsahující beziontový kyanoželezitý roztok s obsahem kvartérního amonného iontového povrchově aktivního činidla a anorganické kyanidové soli, kde pH reagenční látky je přibližně 9 a pH konečného ústrojného roztoku (pufu), použitého k analýze, je 7,6 při použití s komerčním pufrovaným krevním ředidlem Isoton.

Hemoglobinové reagenční látky s obsahem kyanidu, mající pH v rozmezí 11,2 až 11,5 nebo 11,6, jsou komerčně dostupné od nabyvatele tohoto patentu. Jak je v něm popsáno, neočekávané problémy při stanovení Hb pomocí dostupných hemoglobinových reagenčních látek se zvláštními hodnotami pH nebyly vyřešeny až do současného vynálezceva objevu příčin těchto problémů a vývoje reagenčních směsí a metod podle tohoto vynálezu.

55

V důsledku toho jsou v oboru potřebné metody a reagenční látky, které by eliminovaly interferenci, způsobenou středním až vysokým počtem bílých krvinek a měly přijatelnou nepřesnost při stanovení hemoglobinu. Potřebné jsou také metody a reagenční látky, které netrpí mezi-systémovými rozdíly a které jsou schopné přesně kvantifikovat obsah Hb v situaci jak středního, tak i vysokého počtu bílých krvinek v normálních a abnormálních krevních vzorcích.

Další problém v tomto oboru vzniká, když krevní vzorek zůstává určitou dobu smíšen s reagenční látkou Hb v reakční směsi před analýzou Hb. Rozdíly reakčních rychlostí metod Hb mohou záviset na mechanických aspektech krve v reakční směsi s reagens Hb. Na příklad velké zvýšení reakční rychlosti u automatické metody ve srovnání s metodou ICSH může záviset na narušení molekuly Hb a extrakci vázaného heminového derivátu micelami povrchově aktivního činidla u první z výše uvedených metod. Na rozdíl od toho je u metody ICSH integrita molekulární struktury Hb zachována a oxidace krevního železa a následující vázání kyanidem nastávají v nedotčené struktuře hemoglobinu (M.J. Malin a kol., 1989, Am. J. Clin. path. 92: 286-294; M. J. Malin a kol., 1992, Analyt. Chim. Acta, 262: 67 – 77). Z těchto a ještě dalších důvodů nemusí současné reagenční látky a metody ke stanovení Hb, používané pro určité automatické měření přístroje, na příklad analyzátorovou řadu TECHNICON H*, pracovat vždy optimálně za podmínek vysokého počtu bílých krvinek. V takových případech je nutné vyvinout nové reagenční látky a tyto v oboru použít tam, kde je třeba se vyhnout nepřesnému řešení a kolísání výsledků mezi odlišnými měřicími přístroji nebo různými měřicími přístroji stejné řady, jako je řada analyzátorů TECHNICON H*.

Z hlediska oblíbeného klinického použití měření Hb úplné krve a z důvodů uvedených výše, jsou znalci v oboru naladěni jak k zachování přesnosti těchto zkoušek na spektrofotometrické bázi, tak i ke zlepšování podmínek analýzy a složení reagenčních směsí, používaných při metodách stanovení Hb. Pokud se týká složení reagenčních směsí pro měření a analýzu Hb, iontový kyanid používají stále pravidelně znalci v oboru, jako reagenční látku ke stanovení Hb, která má efektivní a přesné výsledky. V oboru jsou potřebné metody a reagenční směsi k měření a analýze Hb, které se mohou použít s přijatelnou přesností ve všech typech hematologických analyzátorů, na příklad kyanidová metoda Hb a reagenční směs, mající vynikající funkční vlastnosti v každém z analyzátorů řady TECHNICON H* s malou nebo žádnou mezisystémovou odchylkou.

Reagenční směsi musí být optimálně formulovány tak, aby všechny specifické vlastnosti a složky těchto reagenčních látek, včetně specifikace pH, kyanidu, celkové alkality, koncentrace povrchově aktivního činidla, osmolality a povrchového napětí dávaly přesné výsledky analýzy pro normální i abnormální vzorky krve, které mohou obsahovat normální i neobvykle vysokou hladinu buněk bílých krvinek.

40 Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je reagenční směs pro stanovení hemoglobinu v krevním vzorku, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje vodnou příměs nejméně jednoho povrchově aktivního činidla v množství, které je účinné pro hemolýzu buněk červených krvinek ve zmíněném vzorku a vznik micel; rozpustnou anorganickou kyanidovou sůl v množství, které je účinné pro vázání se na hemové molekuly, pocházející ze zmíněné hemolýzy krevních buněk; a pufr pH, schopný zachovat pH zmíněné směsi na hodnotě 10,0 až 11,2; kde zmíněná reagenční směs v příměsi se zmíněným krevním vzorkem nevyvolává interferenci od buněk bílých krvinek v automatických způsobech stanovení hemoglobinu.

Předmětem tohoto vynálezu je také způsob stanovení hemoglobinu ve vzorku celé krve, zahrnující smísení alikvotního množství zmíněného krevního vzorku s reagenční směsí na reakční směsi a analyzování této reakční směsi na automatickém hematologickém analyzačním přístroji za účelem stanovení hemoglobinu, jehož podstata spočívá v tom, že se jako reagenční směs použije reagenční směs popsaná výše.

Dále se uvádějí výhodná provedení tohoto vynálezu.

5 Výhodné provedení tohoto vynálezu spočívá ve směsi, jejíž pH je 10,4 až méně než 11,2 zvláště výhodně 10,8 až 11,1 a účelně 11,0.

10 Jiné výhodné provedení tohoto vynálezu spočívá ve směsi, kde povrchově aktivní činidlo je povrchově aktivní činidlo obsahující zwitterion (neboli obojetné (dále též obojetně) povrchově aktivní činidlo), zvolené ze souboru sestávajícího z C_8 – C_{18} alkylbetainů, alkylsulfobetainů, alkylamidobetainů a alkylamidossulfobetainů.

Zvláště výhodně směs obsahuje obojetné povrchově aktivní činidlo, které je zvoleno ze souboru sestávajícího z

15 n-alkyldimethylaminiomethankarboxylátu (DAMC),
n-alkyldimethylaminioethankarboxylátu (DAEC),
n-alkyldimethylaminiopropankarboxylátu (DAPC),
n-alkyldimethylaminiomethansulfonátu (DAMS),
n-alkyldimethylaminioethansulfonátu (DAES),
20 n-alkyldimethylaminioprepansulfonátu (DAPS),
n-tetradecyldimethylaminiopropansulfonátu (TDABS),
n-tetradecyldimethylaminiopropansulfonátu (DDAPS),
n-hexadecyldimethylaminiopropansulfonátu,
n-alkyldimethylamonibutansulfonátu (DABS),
25 n-alkylamidomethandimethylamoniomethankarboxylátu,
n-alkylamidomethandimethylamonioethankarboxylátu,
kokoamidopropylbetainu (CAPB),
kokoamidossulfobetainu (CASB),
laurylamidopropylbetainu (LAB),
30 n-alkylamidomethandimethylamoniomethansulfonátu,
n-alkylamidoethandimethylamonioethansulfonátu a
n-alkylamidopropandimethylamonioethansulfonátu.

35 Jiné výhodné provedení tohoto vynálezu spočívá ve směsi, která obsahuje obojetné povrchově aktivní činidlo, které je zvoleno ze souboru sestávajícího z

N,N-dimethylaurylamin-N-oxidu (DMLAO),
N,N-dimethylmyristylamin-N-oxidu,
N,N-dimethylcetylamin-N-oxidu,
40 N,N-dimethylstearylamin-N-oxidu,
3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-1-propansulfonátu (CHAPS) a
3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-2-hydroxy-1-propansulfonátu (CHAPSO),

45 jakož i ve směsi, která obsahuje povrchově aktivní činidlo zvolené ze souboru sestávajícího z alkyltrimethylamoniumhydroxidů s dlouhým řetězcem, kationtových kvartérních amoniových halogenidů a solí C_{12} – C_{18} alkylsulfátů s alkalickými kovy.

Výhodné provedení tohoto vynálezu spočívá se směsi, kde povrchově aktivní činidlo je přítomno v koncentraci 10 až 40 gramů na litr.

50 Jiné výhodné provedení tohoto vynálezu spočívá se směsi, kde pufr pH je zvolen ze souboru sestávající z kyseliny 3-(cyklohexylamino)-1-propansulfonové (CAPS), tetraburátu sodného, uhličitanu draselného, uhličitanu vápenatého a uhličitanu sodného.

Výhodné provedení tohoto vynálezu spočívá ve směsi, kde pufr pH je přítomen v koncentraci 0,05 až 0,15 M.

5 Jiné výhodné provedení tohoto vynálezu spočívá ve směsi, jež obsahuje dále zásadu, kterou je hydroxid alkalického kovu nebo tetraalkylamoniumhydroxid, kde alkylová skupina obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku.

10 Při výhodném provedení tohoto vynálezu směs obsahuje anorganickou kyanidovou sůl, která je zvolena ze souboru sestávajícího z kyanidu hořečnatého, kyanidu sodného, kyanidu lithného a kyanidu amonného. Zvláště výhodně ve směsi je zásada přítomna v koncentraci 0,05 až 0,5 mol na litr a kyanidová sůl je přítomna v koncentraci 0,5 až 5 gramů na litr.

15 Výhodné provedení tohoto vynálezu spočívá v reagenční směsi pro stanovení hemoglobinu v krevním vzorku, která obsahuje vodnou příměs nejméně jednoho obojetného povrchově aktivního činidla v množství, které je účinné pro hemolýzu krevních buněk ve zmíněném vzorku a vznik micel; rozpustnou anorganickou kyanidovou sůl v množství, které je účinné pro vázání se na hemové molekuly, pocházející ze zmíněné hemolýzy krevních buněk; alkalickou zásadu a pufr pH, schopné zachovat pH této reagenční směsi na hodnotě 10,4 až méně než 11,2; přičemž 20 zmíněná reagenční směs v příměsi se zmíněným krevním vzorkem nevyvolává interferenci od buněk bílých krvinek v automatických metodách stanovení hemoglobinu.

Při výhodných provedeních způsobu stanovení hemoglobinu ve vzorku celé krve, zahrnujícím smíšení alikvotního množství zmíněného krevního vzorku s reagenční směsí na reakční směs a 25 analyzování této reakční směsi na automatickém hematologickém analyzačním přístroji za účelem stanovení hemoglobinu, se výhodně, zvláště výhodně a účelně používají provedení uvedená výše.

30 Z výše uvedeného je zřejmé, že cílem tohoto vynálezu je zlepšený způsob a stabilní reagenční směs pro měření hemoglobinu a stanovení v celé krvi. Způsob a směs podle tohoto vynálezu zahrnující reagens s obsahem kyanidu, který se může univerzálně použít v různých typech analyzátorů hemoglobinu, zvláště automatizovaných systémech řady TECHNICOL H*TM, pro spektrofotometrické stanovení hemoglobulinu v normálních i abnormálních krevních vzorcích.

35 Dalším cílem předloženého vynálezu je poskytnutí způsobu a reagenční směsi, které slouží k dosažení přesného stanovení hemoglobulinu za použití vzorků celé krve s normální hladinou buněk bílých krvinek, jakož i vzorků krve se zvýšenou a abnormálně vysokou hladinou buněk bílých krvinek, řádově alespoň přibližně 8×10^3 buněk bílých krvinek na mikrolitr nebo více. Směs a způsob podle předloženého vynálezu skutečně mohou poskytnout přesné hodnoty hemo- 40 globulinu u krevních vzorků s obsahem nejméně asi 60×10^3 buněk bílých krvinek na mikrolitr.

Ještě dalším cílem předloženého vynálezu je poskytnout reagenční směs pro hemoglobin s obsahem kyanidu, která zahrnuje výše popsané zvláštní znaky reakčních činidel a reagenční pH, které brání nepřipustné nepřesnosti výsledků, zvláště u analýzy krevních vzorků s vysokou 45 hladinou buněk bílých krvinek. Zvláště reagenční směsi podle tohoto vynálezu mají pH v rozmezí kolem 10,0 až 11,2, lépe v rozmezí kolem 10,4 až 11,2 a nejlépe v rozmezí 10,8 až 11,2. Tyto reagenční látky poskytují přesná měření hemoglobulinu ve všech analyzovaných krevních vzorcích a zmírňují problémy s mezisystémovým odchylkami při provádění těchto měření. Při 50 způsobech podle tohoto vynálezu reaguje výše popsaná reagenční látka s krevním vzorkem na vodnou reakční směs pro stanovení hemoglobinu v krvi.

Podrobný popis vynálezu

55 Předložený vynález přináší zlepšení ve způsobech a reagenčních látkách, používaných k provádění přesného stanovení hemoglobulinu v normálních i abnormálních vzorcích celé krve. Zvláštní

- způsob a reagenční látka podle tohoto vynálezu jsou vhodné k použití na poloautomatických plně automatických spektrofotometrických analyzátoch. Zvláště výhodně pro použití jsou analyzátorové systémy pro stanovení hemoglobulinu dostupné u nabyvatele tohoto patentu, včetně hematologických analyzátorů řady TECHNICON H*TM, na které výčet však není omezen. Vzor
- 5 kapalin, na kterých se tato měření provádí, zahrnují čerstvou celou krev, starou nebo skladovanou krev (např. po dobu asi 54 hodin), upravené zkušební vzorky a speciálně připravené kontroly a kalibrátory, odvozené od celé krve, používané k provozování a/nebo kalibraci hematologických analyzátorů.
- 10 Vývoj zlepšeného způsobu stanovení hemoglobulinu a reagenční směsi podle tohoto vynálezu vznikl z nečekaného nedostatku přesnosti výsledků, získaných pomocí běžně dostupných reagen
- 15 cií pro stanovení hemoglobulinu s obsahem kyanidu u automatizovaných způsobů při analýze krevních vzorků s mírným až mimořádně vysokým počtem buněk bílých krvinek. Nesprávné údaje a nepříjemné nepřesnosti byly zvláště a nečekaně zaznamenány při provádění měřicích
- 20 analýz hemoglobulinu na krevních vzorcích s minimálním počtem buněk bílých krvinek, minimálně asi 8×10^3 buněk na mikrolitr, při použití komerčních kyanidových reagenčních látek pro hemoglobin s reagenčním pH asi 11,5 až 11,6.
- 25 Nepřesnost byla pozorována také při použití automatizovaných analyzátorů, např. hematologických přístrojů řady TECHNICON H*TM, kde se krevní vzorek mísí s reagenční látkou pro hemoglobin po určité době (např. asi 30 sekund) k vytvoření reakční směsi před vlastní analýzou hemoglobulinu v automatickém systému. Bylo zjištěno, že výsledná nepříjemná nepřesnost byla důsledkem interference buněk bílých krvinek v krevním vzorku, a nebyla způsobena komponentou krevních destiček. Příklad 4 ukazuje, že buňky bílých krvinek a nikoli krevní
- 30 destičky jsou příčinou interference při měření hemoglobulinu.
- Původce tohoto vynálezu zjistil, že přítomnost vysokého počtu buněk bílých krvinek v krevním vzorku vedla k interferenci v hemoglobinovém kanálu měřicího přístroje, a tím byly výsledky stanovení hemoglobulinu zkreslené. Tabulky 1 a 2 představují údaje, ilustrující náhodné a chybné
- 35 výsledky získané u jednoho analyzovaného krevního vzorku hemoglobulinu (vždy s 10 opakovanými měřeními) při použití reagenční látky pro hemoglobin, obsahující kyanid, s pH 11,6 (tabulka 1) v porovnání se stejným krevním vzorkem, analyzovaným s reagenční látkou pro hemoglobin po úpravě pH na 11,2 přidáním kyseliny chlorovodíkové (tabulka 2).

Tabulka 1

Deset opakovaných analýz jednoho krevního vzorku, reagens Hb s pH 11,6

Číslo opakovaného měření	WBCP ¹	RBC	Hb	MCV ²	PLT	MPV ³	WBCB ⁴	HCT ⁵
1	26,9	5,69	15,4	81,7	772	8,6	26,59	46,5
2	27,07	5,69	15,2	81,4	764	8,6	26,90	46,3
3	27,28	5,77	16,0	81,5	765	8,5	27,46	47,1
4	26,82	5,68	15,1	81,3	786	8,5	27,76	46,2
5	26,09	5,73	16,4	81,3	778	8,4	27,73	46,6
6	26,35	5,77	15,0	81,5	782	8,6	28,42	47,0
7	27,11	5,61	15,1	81,4	786	8,6	27,30	45,7
8	26,20	5,66	15,4	81,2	764	8,5	27,74	45,9
9	26,74	5,66	15,8	81,5	773	8,5	28,64	46,2
10	26,23	5,77	15,7	81,5	775	8,4	28,79	47,0
průměr	26,76	5,70	15,5	81,4	775	8,5	27,73	46,5
S.D.	0,379	0,055	0,46*	0,14	8,5	0,08	0,721	0,48
C.V.	1,4	1,0	2,9*	0,2	1,1	0,9	2,6	1,0

- *: hodnoty překračující specifikaci
 1: WBCP: počet bílých krvinek z peroxidázového kanálu
 2: MCV: střední objem červených krvinek
 3: MPV: střední objem destiček
 4: WBCB: počet bílých krvinek z bazofilového kanálu
 5: HCT: hematokrit

Tabulka 2

Deset opakovaných analýz jednoho krevního vzorku; reagens Hb s pH 11,2

Číslo opakovaného měření	WBCP ¹	RBC	Hb	MCV ²	PLT	MPV ³	WBCB ⁴	HCT ⁵
1	26,79	5,72	15,1	81,5	755	8,4	27,47	46,6
2	26,51	5,73	15,1	81,3	733	8,4	27,67	46,6
3	26,53	5,70	14,8	81,1	752	8,4	27,62	46,3
4	26,70	5,70	15,1	80,9	745	8,4	27,65	46,2
5	26,44	5,75	14,9	80,8	782	8,3	27,66	46,4
6	26,67	5,76	15,0	80,6	751	8,3	27,27	46,4
7	26,62	5,72	15,3	80,5	765	8,3	28,06	46,1
8	26,40	5,79	15,0	80,6	749	8,3	27,62	46,7
9	27,05	5,84	15,2	81,0	777	8,4	28,79	47,3
10	27,9	5,77	15,0	80,9	764	8,3	28,27	46,7
průměr	26,69	5,75	15,1	80,9	757	8,4	27,81	46,5
S.D.	0,232	0,044	0,14	0,32	14,9	0,05	0,445	0,34
C.V.	0,9	0,8	1,0	0,4	2,0	0,6	1,6	0,7

- 1: počet bílých krvinek z peroxidázového kanálu
 2: počet bílých krvinek z bazofilním kanálu

Jak je vidět z tabulky 1, existuje nepříjemný rozptyl hodnot opakovaných měření Hb. Na příklad měření 3 a 5 jsou daleko od průměrné hodnoty. Dvě nebo tři takové hodnoty s velkou odchylkou byly typicky získány na krevním vzorku s obsahem $> 8 \times 10^3$ bílých krvinek/ μ l a s pH 11,6 reagenční látky Hb. Na rozdíl od toho mají hodnoty v tabulce 2 přijatelnou nepřesnost. Výskyt hodnot s velkou odchylkou byl vyloučen snížením pH reagens Hb na 11,2.

Konkrétněji byla u několika zkoušených analyzátorových systémů TECHNICON H* zjištěna přítomnost „částec“ v reakční směsi reagenční látky Hb a krve v bazofilním kanálu přímé cytometrie (Baso DC) v důsledku diferenciálního rozptylu světla, způsobeného přítomností částec, ve srovnání s celkovou reakční směsí. Bazofilní kanál byl použit v režimu DC k detekci a na pomoc při popisu podstaty interferenčního problému u metody stanovení Hb. Protože bazofilní kanál registruje jádra všech leukocytů zbavená cytoplazma (s výjimkou bazofilů), pozorování zjistitelných událostí za použití bazofilního kanálu DC ukazuje, že interference, kterou způsobují bílé krvinky u metody Hb, má souvislost s jejich jádry. Jak znalci v oboru vědí, mezi populacemi krevních buněk mají bílé krvinky jádra (a DNA), zatímco červené krvinky a destičky nikoliv.

Se zvláštním ohledem na přímou cytometrii Baso obsahují systémy hematologických analyzátorů H* kanál Baso, ve kterém jsou analyzovány bílé krvinky (viz patent US 5 518 928, autor J. F. Cremins a kol.). V kanálu Baso jsou krevní buňky smíchány s reagenční látkou, která lýzuje červené krvinky a zbavuje cytoplazmy všechny bílé krvinky s výjimkou bazofilů. Většina bílých krvinek se tedy zjistí jako buněčná jádra. V předložené analýze byly krevní vzorky manuálně ředěny přibližně 60–krát v reagenční směsi Hb a pak smíšený. Výsledná reakční směs byla zavedena do kanálu Baso přes aspirační režim přímé cytometrie (DC). Každá reakční směs byla

nasáta tímto způsobem celkem čtyřikrát po asi 30 sekundách. Pak byla tabelována střední hodnota $\pm$ SD s platných počtů buněk.

5 Aniž bychom si přáli se vázat jakoukoliv speciální teorií, znečišťující částčky by mohly být agregáty na bázi DNA, které absorbují nebo rozptylují světlo rozdílné od celkového vzorku a tím způsobují interferenci. Protože tyto agregáty nejsou pravděpodobně homogenně rozptýleny v reakční směsi Hb, jejich poloha v průtokové komoře vůči dráze světla je u každé reakční směsi jiná. V kanál Hb je proto v sérii deseti nasátí často pouze velmi malý počet (např. 2 až 4) hodnot s velkou odchylkou (viz tabulka 1, měření 3 a 5), které představují velký rozptyl v uvedené datové řadě. Na rozdíl od toho u kanálu Baso DC umožnil účinek proudění snímat detektorem mnohem větší objem reakční směsi tak, že každá reakční směs obsahující reagenční směs s pH kolem 11,6 a počet bílých krvinek $\approx 8 \times 10^3$ buněk/ μ l krve (tzn. s vysokým BC dávaly platný počet 1250 „událostí“ (tabulka 7). U reagenční směsi Hb s pH méně než asi 11,5 nebo 11,6, nebo s pH 11,6 u vzorku s nízkým BC byl platný počet 23 až 129 událostí BC v použití zde se vztahuje na bílé krvinky a destičky.

K dosažení přijatelných hodnot nepřesnosti (tzn. v mezích statistické specifikace) při stanovení Hb v krevních vzorcích všech typů, včetně vzorků s počtem bílých krvinek od asi 8 až 35 $\times 10^3$ buněk/ μ l s vyšším, byla vyvinuta zlepšená reagenční směs, která byla použita v metodách stanovení Hb. Reagens podle tohoto vynálezu je vodný roztok, obsahující anorganickou kyanidovou sůl, a s reagenčním Hp v rozmezí 10,0 až 11,2, lépe 10,4 až asi 11,2 a nejlépe asi 10,8 až 11,2. Doporučené pH reagenční směsi je asi 10,9 až 11,1. Optimální rozsah pH reagenční směsi podle tohoto vynálezu je nad 10,8 a pod 11,2. Zvláště vhodné pH reagenční směsi je, na příklad, 11,0. Při přípravě a zkouškách reagenčních látek s reagenčním pH v rozmezí 10,8 až 11,2 dávaly tyto reagens v celém rozsahu pH v odstupňovaných zkouškách po 0,2 pH na automatickém hematologickém analyzátoru TECHNICON H* přijatelnou nepřesnost (viz příklad 6).

Zlepšená reagenční směs s obsahem kyanidu s výrazným a odlišným optimem pH od reagenčních směsí Hb, v současné době používaných při metodách Hb na měřicích přístrojích řady TECHNICON H*, zmírnila nepřijatelné hodnoty nepřesnosti u krve s vysokým Bc a dávala stabilní reagenční látku pro stanovení Hb. Předpokládaná doba skladovatelnosti reagenční směsi podle tohoto vynálezu bude delší v důsledku snížení reagenční hodnoty pH (tzn. z asi 11,4 a vyšší na asi 11,2 až 10,4, nejlépe 11,2 až asi 10,8). Důvodem je to, že se kyanid odbourává hydroxidovými ionty, které se vyskytují v reagenční látce s pH 11,6 (Weigand a Tremilling, 1972, J. Org. Chem. 37:914). Příklady 5 a 6 popisují zkoušky, provedené k vyhodnocení vlivu reagenčního pH na výsledné hodnoty Hb u celkových krevních vzorků.

Reagenční směs Hb s obsahem kyanidu podle tohoto vynálezu obsahuje následující složky ve vodné příměsi: iontové povrchově aktivní činidlo, včetně kationaktivního, anionaktivního a obojetně aktivního činidla, nebo jejich směsí a kombinací; iontovou kyanidovou sloučeninu nebo kyanidovou sůl k zajištění kyanidových iontů, a vhodný pufr k dosažení a zachování vhodné alkalické reagenční pH podle tohoto vynálezu.

V reagenční směsi podle tohoto vynálezu způsobuje povrchově aktivní činidlo hemolýzu červených krvinek ve vzorku. Paralelně s tím se očekává také rozpouštění buněčných úlomků a plazmových lipidů a tvoření micel v důsledku působení povrchově aktivní složky. Při alkalickém pH ztrácí struktura Hb většinu ze svých solných můstků. Proteinová struktura Hb se dále narušuje vystavením hemových molekul složkám reagenční směsi.

50 Aniž bychom si přáli se vázat jakoukoliv teorií, jmenovitě působení povrchově aktivní činidla a alkalické pH uvolňují hemy z jejich vazby s globinem na směs železitých a železnatých hemů. Tyto hemy oxidují na vzduchu na železitou formu. Dále nastává axiální vázání a micelizace železitých hemů a vznikají specifické konečné produkty, vyznačující se charakteristickým absorpčním spektrem. Oxidace hemového železa a vázání hemového železa kyanidem nastávají po uvolnění hemů z globinových molekul. U kyanidové reakce se kyanidy (2) vážou na hemy

jako axiální ligandy. Železitý dikyanoporfyrin se extrahuje do dispergované micelární fáze a zaujímá polohu uvnitř micely (tzn. micelizovaný železitý dikyanoporfyrin), kde vytváří zabarvený (červenohnědý) produkt. Další popis biochemických mechanismů a funkcí složek reagens Hb s obsahem kyanidů lze najít v M. Malin a kol., 1992, Anal. Chim. Acta, 262: 77.

5 Znalci v oboru vědí, že kyanidový ion po zavedení do krevního vzorku smíšením s reagenční směsí je optimálně volně k dispozici k chemickému slučování s hemovým železem a není proto příliš pevně vázán na svůj přidružený ion kovu. Podle tohoto vynálezu se kyanidový ion dodává
10 nejlépe ve formě soli s anorganickým kationtem, zvláště kationtem alkalického kovu, nejlépe monovalentním kationtem, jako je sodík, lithium, draslík nebo amonium. Pro použití lze uvažovat kyanidové soli polyvalentních kovových kationtů, např. divalentních a trivalentních kovových kationtů, tyto polyvalentní ionty však nemusí dovolit optimální vázání kyanidu na hemové železo v reakční směsi v důsledku silné vazby polyvalentního kovového iontu na kyanid. O divalentních a trivalentních kationtech je dále známo, že tvoří nerozpustné hydroxidové precipitáty, které
15 nejsou vhodné pro předložený vynález. Anorganická kyanidová sůl je přítomná ve směsi v koncentraci asi 0,5 až 5 g/l, nejlépe asi 1 až 2 g/l.

Vodný roztok reagenční směsi podle tohoto vynálezu zahrnuje výše popsané složky, rozpuštěné ve vodě a má konečné reagenční pH od 10,0 do asi 11,2, lépe od asi 10,4 do asi 11,0, ještě lépe
20 asi od 10,8 do maximálně 11,2, nejlépe asi od 10,9 do 11,1. Optimální pH reagenční směsi je asi 11,0 v souladu s tímto vynálezem. Jedna nebo více pufrovacích složek v příměsi dává vhodné pH reagenční směsi. Předložená reagenční směs neobsahuje železitokyanidový ion. Osmolalita reagenční směsi Hb je asi 450 až 490 mosm/kg. Povrchové napětí reagenční směsi podle tohoto vynálezu je asi 31 – 32 dynů/cm.

25 Příklady iontových povrchově aktivních činidel, vhodných pro použití podle tohoto vynálezu, ale neomezených pouze na tyto, zahrnují obojetně aktivní, anionaktivní a kationaktivní činidla. Se zvláštním ohledem na obojetně aktivní povrchová činidla lze pro použití podle tohoto vynálezu uvažovat několik obecných tříd těchto povrchově aktivních činidel. Příklady vhodných tříd
30 obojetně povrchově aktivních činidel jsou betainy, včetně karboxybetainů, sulfobetainů (známé také jako sultainy), amidobetainů a sulfoamidobetainů. Zvláště zajímavé jsou C_8 – C_{18} , nejlépe C_{10} – C_{18} – alkylbetainy, sulfobetainy, amidobetainy a sulfoamidobetainy, na příklad lauryl-amidopropylbetainového (LAB) typu. Směsi a kombinace povrchově aktivních činidel se mohou také použít ve směsi a metodě podle tohoto vynálezu.

35 Některé příklady vhodných obojetně povrchově aktivních činidel v betainové třídě zahrnují

n – alkyldimethylamonioetankarboxylát (DAMC),
n – alkyldimethylamonioetankarboxylát (DAEC)
40 a n – alkyldimethylamonioetankarboxylát (DAPC).

Některé příklady sulfobetainové třídy obojetně povrchově aktivních činidel zahrnují n – alkyl-sultainy nebo n – alkyldimeethylamonioalkylsulfonáty, jako je

45 n – alkyldimethylamonioetansulfonát (DAMS),
n – alkyldimethylamonioetansulfonát (DAES),
n – alkyldimethylamonioetansulfonát (DAPS)
a n – alkyldimethylamonioetansulfonát (DABS).

50 Z obojetně povrchově aktivních činidel DAPS jsou zvláště vhodné TDAPS, kde „T“ je n – tetradecyl DDAPS, kde „D“ je dodecyl, a hexadecyldimethylamonioetansulfonát.

Amidobetainy zahrnují mj.

n – alkylamidometandimetylamoniometankarboxylát nebo
n – alkylamidometandimetylamonioetankarboxylát.

5

Preferovaný amidobetain je laurylamidopropylbetain (LAB). Vhodné jsou také analogické amidobutainsulfonáty, jako

n – alkylamidometandimetylamoniometansulfonát,
10 n – alkylamidoetandimetylamonioetansulfonát
a n – alkylamidopropandimetylamoniopropansulfonát.

Vedle toho lze uvažovat o použití amidobetainů, které mají jako zdroj mastné kyseliny kokosový olej, např. kokoamidopropylbetain (CAPB) a kkoamidosulfobetain (CASB). Další popis betainů, sulfobetainů, amidobetainů a amidosulfobetainů je možné nalézt v příslušné literatuře, na příklad S. Takano a kol. 1977, J. Amer. Oil Chem. Soc., 54:139 – 143 a 484 – 486; Z. El. Rossi Cs Horvath, 1982, Chromatographia, 15: 75 – 82; Kaminski a linfield, 1979, J. Amer. Oil Chem. Soc., 56: 771 – 773.

20 Další obojetně povrchově aktivní činidla, vhodná pro použití podle tohoto vynálezu, zahrnují N,

N – dimethylaurylamin N – oxid (známý také jako DMLAO nebo LO), N,N – dimetylmyristylamin N – oxid, N, N – dimethylcetylamin N – oxid a N, N – dimetylstearylamin N – oxid. Vhodná pro použití jsou také obojetně povrchově aktivní činidla, která zahrnují 3 – [3 – cholamidopropyl] dimetylamonio] – 1 – propansulfonát (CHAPS) a 3 – [3 – cholamidopropyl] dimetylamonio] – 2 – hydroxy – 1 – propansulfonát (CHAPSO).

Některá anionaktivní povrchová činidla, která lze zahrnout do použití, jsou soli alkalických kovů C₁₂ – C₁₈ – alkylsulfonátů, na příklad laurylsulfát sodný, laurylsulfát lithný a myristylsulfát sodný. Obecně má iontové povrchově aktivní činidlo uhlovodíkový řetězec s asi 12 až 18 atomy uhlíku, obvykle nerozvětvený, s jednou iontovou hlavní skupinou. Hlavní skupina může být kationaktivní, anionaktivní nebo obojetně aktivní.

Jiné třídy iontových povrchově aktivních činidel, které lze uvažovat pro použití podle tohoto vynálezu, zahrnují alkyltrimetylamoniumhydridy, zvláště alkyltrimetylamoniumhydridy s dlouhým řetězcem, jako

stearyltrimetylamoniumhydrid,
lauryltrimetylamoniumhydrid,
40 myristiltrimetylamoniumhydrid
a cetyltrimetylamoniumhydrid.

Další třída iontových povrchově aktivních činidel zahrnuje kationaktivní kvartérní amonné halidy, nejlépe C₁₂ – C₁₈ alkyltrimetylamoniumhalidy. Na příklad alkyl C₁₂ – C₁₈ může být cetyl, stearyl, myristil nebo lauryl; halidy mohou být chloridy nebo bromidy nebo fluoridy. CTAB neboli cetyltrimetylamoniumbromid je příklad. Obecně je povrchově aktivní činidlo přítomno ve směsi v koncentraci asi 10 až 40 g na litr (g/l), lépe asi 15 až 25 g/l, a ještě lépe asi 20 g/l. Přednostní použití podle tohoto vynálezu mají obojetně povrchově aktivní činidla.

50 Pufrovací systémy (nebo pufrý) pro použití v této reagenční směsi Hb a metodě mají odolnost vůči změně pH reagenčního roztoku. V oboru konvenčně používané pufru s odpovídajícími hodnotami pK pro zachování reagenčního pH v rozmezí 10,0 až asi 11,2, lépe asi 10,8 až asi 11,1, a nejlépe asi 10,9 až 11,1 se mohou obecně použít v reagenční směsi Hb podle tohoto vynálezu. Optimální pH reagenční směsi je kolem 11,0. Příklady vhodných pufrů jsou mj.

55 kyselina 3 – [cyklohexylamino] – 1 – propansulfonová (CAPS); borax (tzn. tetraborát sodný);

karbonáty, jako uhličitan draselný, vápenatý nebo sodný a TRIS. Pufry se používají ve směsi podle tohoto vynálezu v koncentraci kolem 0,05 M až 0,15 M, lépe asi 0,075 M až 0,125 M a nejlépe asi 0,10 M. Přednostní je pufrovací systém pH, obsahující borax (0,05 M) a NaOH (0,1 M), ve kterém se krevní vzorek ředí 250 x tak, aby konečné pH reakční směsi krev – reagenční látka bylo v přijatelném rozsahu pH pro tento vynález.

Reagenční směs podle tohoto vynálezu může zahrnovat alkalická činidla (zásady), podle potřeby a přiměřeně s vhodnými pufry. Vhodné zásady zahrnují mj. hydroxidy alkalických kovů, jako hydroxid sodný nebo hydroxid draselný. Také vhodné pro použití jsou zásady, jako tetraalkylamoniumhydrid, kde alkylová skupina může obsahovat 1 až 4 uhlíkové atomy, na příklad tetra-butylamoniumhydrid. Tato zásady je přednostně přítomná ve směsi v množství asi 0,05 až 0,5 mol/l, lépe asi 0,05 až 0,2 mol/l, ještě lépe kolem 0,1 mol/l.

Obecně metoda podle tohoto vynálezu zahrnuje smíšení krevního vzorku s reagenční směsí podle tohoto vynálezu na reakční směs. Z reakce komponent reagenční směsi vzniklý reakční produkt s přirozeně se vyskytujícími hemoglobinovými druhy v krevním vzorku (celková krev nebo kalibrátor nebo kontrolní materiál) se zjišťuje spektrofotometricky na 546 nm. Mezi přirozeně se vyskytujícími hemoglobinovými druhy, které lze měřit pomocí metody a reagenční směsí podle tohoto vynálezu jsou deoxyhemoglobin, oxyhemoglobin, methemoglobin, fetální hemoglobin, karboxyhemoglobin a srpkovitý hemoglobin. Krevní vzorek se zředí asi 250 krát (přesněji 251 – krát: 250 objemových jednotek reagenční směsi plus 1 objemová jednotka krevního vzorku) s reagenční látkou a výsledný reakční produkt má reprodukovatelné absorpční spektrum a maximální absorpci na 549,5 nm (M. Malin a kol., 1992, Anal. Chim. Acta, 262 : 67).

25 Příklady

Následující příklady, jak jsou zde uvedeny, mají za účel ilustrovat na příkladech různá hlediska realizace vynálezu a nemají za cíl vymezit vynález žádným způsobem.

V příkladech dále jsou použity následující zkratky: BC : bufry coat; % CV: koeficient variace; df: stupeň volnosti; DC: přímá cytometrie; Hb: hemoglobin; PLT: destičky; počet PLT: $PLT \times 10^3/\mu l$; RBC: červené krvinky; počet RBC: $RBC \times 10^6/\mu l$; SD: standardní odchylka; WBC: bílé krvinky; počet WBC $\times 10^3/\mu l$; WBCB: počet bílých krvinek, získaný z bazofilního kanálu hematologického systému H*; WBCP: počet bílých krvinek, získaný z peroxidázového kanálu hematologického systému H*.

40 Příklad 1

Příprava normálních a speciálně manipulovaných krevních vzorků

V experimentech, sestavených k testování funkce různých reagenčních látek Hb a k měření a stanovení Hb a počtu krvinek v různých typech krevních vzorků, byla odebrána úplná krev dobrovolníkům v Bayer Corporation („normální“ krevní vzorky) do zkumavek Vacutainer, anti-koagulovaný pomocí EDTA (nejlépe K_3EDTA) a uložena při normální teplotě. Tyto normální krevní vzorky byly rutinně použity do 8 hodin po odběru. Úplná krev byla odstředěna při 25 000 ot/min (700 x g) 30 minut k oddělení BC (definovaného jako bílé krvinky a destičky) od červených krvinek. Krevní vzorky byly rovněž upraveny k dosažení zkušebních vzorků s určitými vlastnostmi. Na příklad, úprava počtu bílých krvinek na asi $15 \text{ až } 20 \times 10^3$ buněk/ μl krve, BC ze dvou až tří zkumavek se zkombinoval do jedné zkumavky od stejného dárce krevního vzorku.

Při přípravě upraveného krevního vzorku na nízký WBC, vysoký PLT a normální RBC bylo osm zkumavek od jednoho dárce odstředováno při 2500 ot/min po dobu 25 minut. Plazmy byly převedeny do čistých zkumavek. BC byly převedeny do dvou hematokritových zkumavek

Wantrobe a tyto zkumavky byly odstředovány jako výše. Plazmová vrstva a většina vrstvy PLT byla převedena ze zkumavky Wintrobe do malé čisté zkumavky. Byl přidán 1 ml plazmy a zkumavka byla odstředována při 1000 ot/min po dobu 10 minut. Kapalína nad usazeninou pak byla dekantována do zkumavky, obsahující pouze RBC; plazma byla doplněna na původní objem a smíšená.

K přípravě upraveného krevního vzorku s vysokým WBC, nízkým PLT a normálním RBC byla vrstva WBC převedena ze zkumavky Wintrobe do zkumavky, obsahující pouze RBC. Plazma byla doplněna na původní objem a smíšená.

Příklad 2

Statistika: Validace experimentální konstrukce na bázi $N = 10$

Zkoušky za účelem vyhodnocení funkčních vlastností různých dávek zkušebních reagenčních směsí Hb, zvláště dávek s rozdíly v reagenčním pH, pro metodu stanovení Hb obsahovaly obecně tři prvky: negativní kontrola reagenční látky a zkušební reagenční látku, z nichž obě musely projít specifikací prováděné metody na automatickém analyzátoru, a pozitivní kontrolu reagenční látky, která nesměla splnit podmínky specifikace. Všechny datové soubory obsahovaly deset opakovaných měření. Specifikace zahrnovala SD a %CV.

Jako ilustrativní příklad pro účely systému TECHNICON H* byly předepsány dvě hodnoty pro metodu Hb, a to 0,124 pro SD a 0,78 pro %CV. U tohoto přístroje byla předepsána hodnota SD dodržena až do $Hb = 15,9 \text{ g/dL}$, tzn. $[100 (0,124/0,78) = 15,9]$. Při hodnotě SD nad 15,9 g/dl byla rozhodující předepsaná hodnota %CV. To znamená, že nad 15,9 g/dL bylo možné nesplnit předepsanou hodnotu SD, ale splnit předepsanou hodnotu %CV a dosáhnout přijatelnou nepřesnost výsledků Hb.

Byla použita statistika CHI-SQUARE ke stanovení SC vzorku, která se výrazně lišila od specifikace 0,124 pro sadu deseti opakovaných měření na vzorek pro koncentrace Hb ve vzorku až do 15,9 g/dl včetně.

$[s^2 / \sigma^2] > \chi^2_{0,95/df}$, kde s^2 je variace vzorku, σ^2 je variace normální populace, $\chi^2_{0,95/DF}$ je statistika CHI-SQUARE na úrovni signifikace 5 %,

$$[s^2 / (0,124)^2] 1,88$$

$$s^2 > 1,88 (0,0154)$$

$s > 0,170$, kde s je standardní odchylka vzorku.

Tedy pro $N = 10$ (a 9 df), jestliže $SD > 0,17$ pro určitou sadu dat, pak se tato sada významně liší od specifikace, SD % 0,124 (Dixon a Massey, 1983, Introduction to Statistical Analysis, McGraw Hill, str.110). Podle toho v každé zkoušce funkční schopnosti s koncentracemi Hb ve vzorcích do 15,9 g/dl včetně bylo cílem získat $SD > 0,17$ u pozitivní kontrolní reagenční látky. Pozitivní kontrolní reagenční látka ukázala, že systém byl schopen reagovat na problém nepřijatelných hodnot nepřesnosti za podmínek zkoušky.

Pro koncentraci Hb ve vzorku nad 15,9 g/dl byla k výpočtu odpovídající SD použita specifikace %CV použitím vztahu $Hb \text{ v g/dl} = (SD \times 100) / 0,78$. Byla sestavena níže uvedená tabulka 3 a k výpočtu odpovídající SD vzorku, lišící se významně od specifikace, byla použita statistika CHI-SQUARE.

Tabulka 3

Hb, g/dL Specifikace SD SD vzorku, který se významně liší od specifikace s N = 10

16,0	0,125	0,171
17,0	0,133	0,182
18,0	0,140	0,192
19,0	0,148	0,203
20,0	0,156	0,214
21,0	0,164	0,224
22,0	0,172	0,236
23,0	0,179	0,245
24,0	0,187	0,256
25,0	0,195	0,267

5

V těchto vyhodnoceních byla rozhodnutí, týkající se přijatelnosti a nepřijatelnosti zkoušené reagenční látky, založena výhradně na specifikaci SD.

10 Příklad 3

Ilustrativní složení reagenční látky Hb, připravené podle tohoto vynálezu a použité pro stanovení Hb, jak je uvedeno v tabulce 4.

15

Tabulka 4

Složka reagens	Množství/litr
boritan sodný	19,07 g
zásada (hydroxid sodný)	4,0 g
povrchově aktivní činidlo (lauryldimethylaminoxid, 30 g/100 ml ve vodě)	66 mL
kyanid draselný	1,3 až 1,6 g
10 N hydroxid sodný	0,65 mL
3 N kyselina chlorovodíková	podle potřeby
deionizovaná voda, qts.	1

20 Reagenční směs byla po přípravě přefiltrována na polysulfonové nebo nylonové membráně 0,2 mikronu. Konečné pH této ilustrativní reagenční směsi bylo 11,0 při 25 +/- 3°C, celková alkalita nebyla menší než 180 mEq/l, vzhledově čirá bezbarvá kapalina, která podle vizuální kontroly v podstatě neobsahovala žádné tuhé částice.

25 Příklad 4

Určení, že bílé krvinky a nikoliv destičky jsou zdrojem interference v BC vzorku.

30 Byly provedeny experimenty ke stanovení, zda bílé krvinky nebo destičky jsou zdrojem interference v analýzách Hb, prováděných na hematologických analýzách řady TECHNICON H*. Byly připraveny a vyzkoušeny reagenční látky s obsahem kyanidu, které měly stejné přísady a lišily se v reagenčním pH. Pomocí těchto analýz bylo zjištěno, že krevní vzorky s vysokými BC (tzn. se zvýšenými hodnotami WBC a PLT manipulací) byly spojeny s velkou SD při použití s reagenční látkou Hb s pH 11,6 a analyzovaných na systému TECHNICON H*3. Bylo tedy provedeno
35 vyhodnocení ke stanovení vlivu vysokého WBC nebo PLT na nepřesnost za normálního počtu RBC.

Jak uvádí tabulka 5, byly WBC a nikoliv PLT zjištěny jako příčina problému nepřesnosti v těchto analýzách. Na příklad, SD bylo 0,22, když WBCP (vysoké), LT (nízké) byly 26,25 a 71 (tzn. CHI-SQUARE splněna). Obráceně SD byla 0,08, když WBCP (nízké), PLT (vysoké) byly 0,24 a 938. Je třeba poznamenat, že proces frakcionalizace, použitý k přípravě upravených vzorků, způsobil vysoké WBC ve vzorku, který obsahoval 93 % neutrofilních látek, které jsou proto příčinou nepřesnosti při pH 11,6. Je tedy pravděpodobné, že jiné typy WBC vedle neutrofilních látek (tzn. lymfocytů, monocyt, bazofilů a eosinofilů) by přispěly k vysokým úrovním interference ve zkouškách pro stanovení Hb.

10

Tabulka 5 Zkouška na nepřesnost: WBC v závislosti na PLT

Zkušební reagenční látka Hb, pH 11,6

Pokus č.	WBCP	RBC	PLT	Hb, g/dl	Spec. SD vzorku	%CV	CHI-SQ SD
1	0,09	4,99	3	15,8	0,07	0,4	> 0,17
2	24,27	5,78	835	18,3	0,27*	1,5	> 0,203
3	2,79	4,78	836	15,1	0,08	0,5	> 0,17
4	0,24	5,14	938	16,3	0,08	0,5	> 0,182
5	26,25	4,95	71	15,6	0,22	1,4	> 0,17

15

Všechny vzorky byly připraveny jako v příkladu 1.

*: nesplnil specifikaci

20

Příklad 5

Zkoušky, ukazující že reagenční pH je v přímém spojení s nepřesností výsledků zkoušek Hb

K upřesnění, zda pH reagenční látky je nebo není příčinným faktorem snížení hodnot přijatelné nepřesnosti zkoušek Hb, bylo pH reagenčních látek Hb upraveno na hodnotu od 11,42 do 11,66. Byly připraveny další zkušební reagenční látky, u kterých bylo pH sníženo z 11,60 na 10,8 a na 11,2 a 11,3. Jak bylo popsáno výše, bylo zjištěno, že reagenční látky s pH nad asi 11,5 až do 11,6 (a vyšší, např. 11,66) dávaly nepřijatelně vysokou nepřesnost při měření Hb ve vzorcích s vysokým počtem bílých krvinek. Tyto zkoušky byly navrženy za účelem zjištění, zda změna pH dané reagenční látky Hb může tuto reagenční látku přeměnit na reagenční látku, dávající přijatelné hodnoty nepřesnosti v analýzách Hb, prováděných na systému hematologických analyzátorů H*. Různé reagenční látky Hb takto upravené byly zkoušeny na krevních vzorcích v automatickém hematologickém analyzátoru H* a bylo jim přiřazeno hodnocení podle kritéria „splnil“, „nesplnil“ podle toho, zda získaný výsledek měření Hb měl přijatelnou nepřesnost („splnil“) nebo nepřijatelnou nepřesnost („nesplnil“). Použité krevní vzorky pro tyto experimenty obsahovaly vzorek s vysokým BC (tzn. WBCP : RBC : PLT = 19,76 : 6,37 : 704) a vzorek s nízkým BC (tzn. WBCP : RBC : PLT = 0,66 : 4,98 : 14). Výsledky těchto zkoušek jsou uvedeny v tabulce 6.

40

Tabulka 6

Vliv úpravy pH na funkci zkušebních reagenčních látek Hb při použití hematologického měřicího přístroje TECHNICON H*

45

Reagenční látka	pH	BC vzorku	HB, g/dL	SD	%CV	Splnil/Nesplnil
1	11,42	vysoký	18,3	0,10	0,50	S
	11,66	vysoký	18,5	0,38*	2,00	N
1	11,66	nízký	14,1	0,11	0,80	S
2	11,60	vysoký	18,3	0,27*	1,50	N
	11,17	vysoký	18,2	0,11	0,60	S
3	11,56	vysoký	18,8	0,44*	2,30	N
	11,29	vysoký	18,3	0,10	0,60	S
2**	10,80	vysoký	18,3	0,07	0,40	S
	11,66	vysoký	18,9	0,68*	3,60	N

Specifikace 11,2 – 11,6

5 *: specifikace nesplněna

SD	Spec. SD vzorku	CH-SQUARE
vysoký BC = WBCP : RBC : PLT = 19,76 : 6,37 : 704	0,148	> 0,203
nízký BC = WBCP : RBC : PLT = 0,66 : 4,98 : 14	0,124	> 0,170

10 **: V tomto případě bylo pH reagenční látky 2 (pH 10,8) sníženo na 10,8 z reagenční látky s vyšším pH (tzn. 11,66) přidáním 5 mM EDTA (tzn. Na₂EDTA). U reagenční látky 2 (pH 11,66) bylo pH vráceno zpět na 11,6 po přidání 5 mM EDTA.

15 Výsledky z těchto studií ukazují, že pH bylo významným faktorem u reagenčních látek s pH 11,6 a vyšším, použitých v automatické metodě stanovení Hb. Na rozdíl od toho reagenční látky Hb s pH od asi 10,8 do 11,4 prošly zkouškou dobře. Doporučený rozsah pH směsi a metoda podle tohoto vynálezu, tzn. asi 10,4 až 11,2 nebo méně, lépe asi 10,8 až asi 11,2 nebo méně, byl zvolen tak, že mezi horní hranicí nové specifikace a pH, při kterém dochází k selhání metody (tzn. pH vyšší nebo rovné 11,6) efektivně vzniká „bezpečná“ zóna (tzn. pH 11,3 až 11,5). Vytvoření této bezpečné zóny bere v úvahu malou chybu při analýze pH.

20 Jak je vidět z výsledků v tabulce 6, hodnoty SD zkušebních reagenčních látek Hb s přijatelnou nepřesností se zlepšily z 0,27 a 0,44 na 0,11 a 0,10 po snížení pH reagenční látky až na pH reagenční látky podle tohoto vynálezu. Naproti tomu u reagenční látky s pH 11,66 se hodnota SD zhoršila, tzn. z 0,10 na 0,38 po zvýšení pH reagenční látky. CHI-SQUARE byla splněna ve všech případech, kdy pH reagenční látky bylo => 11,6 a vzorek obsahoval vysokou koncentraci BC (bílých krvinek a destiček).

Příklad 6

30 Variace pH a přesnost metody Hb

35 Byly provedeny další experimenty pro zjištění vlivů na nepřesnost dat, získaných po změně pH reagenční látky H a metody. Byla připravena řada reagenčních látek Hb, kde pH bylo nastaveno pomocí 6H HCl ve stupních po 0,2 pH tak, aby vznikla řada reagens s hodnotami pH 11,6, 11,4, 11,2, 11,0, 10,8, 10,6 a 10,4. Nepřesnost byla vyhodnocena v rozsahu pH 10,4 až 11,6 aby se zjistilo, zda v tomto intervalu existuje minimální nepřesnost. Všechny reagenční látky v řadě byly zkoušeny na vzorku s vysokým BC, tzn. WBCP RBC : PLT = 26,75 : 5,70 : 775. Reagenční látka s pH 11,6 byla zkoušena také se vzorkem s nízkým BC jako kontrolní. Zda daná reagenční látka dala výsledky s přijatelnou nepřesností (splnil) nebo nepřijatelnou nepřesností (splnil) nebo 40 nepřijatelnou nepřesností (nesplnil) bylo vyhodnoceno za použití statistiky CHI-SQUARE ve

spojení s aktuálními specifikacemi. Ve všech provedených zkouškách bylo jako kritérium splnil / nesplnil použita SD.

5 Data z těchto zkoušek jsou uvedena v tabulce 7. Tato data ukazují, že reagenční látky Hb, připravené podle tohoto vynálezu a mající pH v rozmezí asi 10,4 až 11,4, měly přijatelnou nepřesnost v dané metodě, i u krevního vzorku s vysokým BC. Další zkoušky ukázaly, že pH reagenční látky v rozmezí asi 10,00 až 10,4 také dává přijatelnou nepřesnost v dané metodě Hb. Na rozdíl od toho vykazovala nepřijatelnou nepřesnost reagenční látka s pH 11,6 na vzorku s vysokým BC. Velikost vzorku deset byla příliš malá, aby dovolila statisticky platné rozlišení
10 mezi hodnotami SD v rozsahu pH 10,4 až 11,4 z hlediska zjištění možného minima SC. Vizualní kontrola výsledných hodnot SD však ukazuje, že minimum nepřesnosti je kolem pH 11,0. To dokládají také data z Baso DC, která vykazují minimální platný počet buněk při pH 11,0.

15 V tabulce 7 představují vzorky „N control“ a „H control“ normální kontrolní a vysoký kontrolní materiál. IN – date Test Point Hematology Control Material byl získán od Bayer Corporation, Business Group Diagnostics, Tarrytown, NY. Čísla jsou štítkové rozsahy, očekávané u těchto parametrů.

20 Tyto výsledky ukazují, že přijatelná nepřesnost byla získána u reagenční směsi Hb (tabulka 4) v rozmezí pH asi 10,4 až 11,2. Nepřijatelná nepřesnost byla získána s pH 11,6. Všechny tyto zkoušky byly provedeny s manipulovaným krevním vzorkem, který obsahoval $26,76 \times 10^3$ bílých krvinek/ μ l. Na základě analýz Hb a Baso DC byla nalezena minimální nepřesnost měření Hb u reagenční látky Hb s pH asi 11,0 (v širším pásmu od asi 10,0 do asi 11,2 nebo méně).

25 WBCP : RBC : PLT = 0,6 : 4,98 : 14). Výsledky těchto zkoušek jsou uvedeny v tabulce 6).

Tabulka 7

30 Vliv změny pH z 11,6 na 10,4 na nepřesnost zkušebních reagenčních látek Hb Baso DC

Reagen. látka	pH	Vzorek	Hb, g/dl	SD	%CV	Splnil/ Nesplnil	Platný počet
zkušební reagens 1	11,40	celá krev	14,2	0,7	0,50	S	
		N control	13,5	0,06	0,40	S	
		N control	18,5	0,06	0,30	S	
zkušební reagens 2	11,60	HI buffy	15,5	0,46*	2,90	N	1250 +/-1520
	11,60	LO buffy	14,1	0,11	0,80	S	25 +/-3
	11,40	HI buffy	15,0	0,09	0,60	S	92 +/-122
	11,20	HI buffy	15,0	0,09	0,60	S	29 +/-7
	11,00	HI buffy	15,0	0,05	0,30	S	23 +/-15
	10,80	HI buffy	15,0	0,07	0,50	S	55 +/-38
	10,60	HI buffy	15,1	0,11	0,70	S	77 +/-10
	11,40	HI buffy	15,0	0,09	0,60	S	129 +/-50
průměrná hodnota				+0,12	+0,8		

Specifikace; *: specifikace překročena; všechny N = 10

	WBCP	RBC	PLT	Hb	
N control	7,42 +/- 0,85	4,48 +/- 0,2	212 +/- 30	13,2 +/- 0,5	
H control	18,43 +/- 2,5	5,53 +/- 0,3	450 +/- 60	17,9 +/- 0,7	
				SD CHI-SQUARE	
				SD	
úplná krev	10,90	5,36	327	14,2	0,124 > 0,17
HI buffy c.	26,76	5,70	775	15,5	0,124 > 0,17
LO buffy	0,80	5,35	19	14,1	0,124 > 0,17

Obsah všech patentů, patentových přihlášek, publikovaných článků, knih, odkazů, příruček a abstraktů zde citovaných se tímto zahrnuje odkazem v jejich celém znění do podrobnějšího
5 popisu stavu techniky, kterého se vynález týká.

Protože je možné provést změny ve výše uvedeném tématu bez překročení rozsahu a myšlenky a ducha tohoto vynálezu, je záměrem, aby veškerá látka, obsažená ve výše uvedeném popisu nebo definovaná v připojených nárocích, byla interpretována jako popisná a ilustrativní, a nikoliv
10 ve vymežujícím smyslu. Mnoho úprav a změn předloženého vynálezu je možných ve světle výše uvedených učebních materiálů. Proto je třeba chápat, že v rozsahu připojených nároků lze tento vynález praktikovat i jinak, než specificky uvedeno.

15

PATENTOVÉ NÁROKY

20 1. Reagenční směs pro stanovení hemoglobinu v krevním vzorku, **vyznačující se tím**, že obsahuje vodnou příměs nejméně jednoho povrchově aktivního činidla v množství, které je účinné pro hemolýzu buněk červených krvinek ve zmíněném vzorku a vznikl micel, rozpustnou anorganickou kyanidovou sůl v množství, které je účinné pro vázání se na hemové molekuly, pocházející ze zmíněné hemolýzy krevních buněk, a pufr pH, schopný zachovat pH
25 zmíněné směsi na hodnotě 10,0 až 11,2 kde zmíněná reagenční směs v příměsi se zmíněným krevním vzorkem nevyvolává interferenci způsobenou buňkami bílých krvinek v automatických způsobech stanovení hemoglobinu.

30 2. Směs podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že pH reagenční směsi je od 10,4 do 11,2.

3. Směs podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že pH reagenční směsi je 10,8 až 11,1.

35 4. Směs podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že pH reagenční směsi je 11,0.

5. Směs podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že povrchově aktivní činidlo je obojetné povrchově aktivní činidlo, zvolené ze souboru sestávajícího z C₈ až C₁₈ alkylbetainů, alkylsulfobetainů, alkylamidobutainů a alkylamidossulfobetainů.

40 6. Směs podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že obojetné povrchově aktivní činidlo je zvoleno ze souboru sestávajícího z

n-alkyldimethylaminiomethankarboxylátu (DAMC),
n-alkyldimethylaminioethankarboxylátu (DAEC),
45 n-alkyldimethylaminiopropankarboxylátu (DAPC),
n-alkyldimethylaminiomethansulfonátu (DAMS),
n-alkyldimethylaminioethansulfonátu (DAES),

- n-alkyldimethylaminiopropansulfonátu (DAPS),
 n-tetradecyldimethylaminiopropansulfonátu (TDABS),
 n-tetradecyldimethylaminiopropansulfonátu (DDAPS),
 n-hexadecyldimethylaminiopropansulfonátu,
 5 n-alkyldimethylamoniobutansulfonátu (DABS),
 n-alkylamidomethandimethylamoniomethankarboxylátu,
 n-alkylamidomethandimethylamonioethankarboxylátu,
 kokoamidopropylbetainu (CAPB),
 kokoamidosulfobetainu (CASB),
 10 laurylamidopropylbetainu (LAB),
 n-alkylamidomethandimethylamoniomethansulfonátu,
 n-alkylamidoethandimethylamonioethansulfonátu a
 n-alkylamidopropandimethylamonioopropansulfonátu.
- 15 **7. Směs podle nároku 1, vyznačující se tím, že obojetné povrchově aktivní činidlo je zvoleno ze souboru sestávajícího z**
- N,N-dimethylaurylamin-N-oxidu (DMLAO),
 N,N-dimethylmyristylamin-N-oxidu,
 20 N,N-dimethylcetylamin-N-oxidu,
 N,N-dimethylstearylamin-N-oxidu,
 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-1-propansulfonátu (CHAPS) a
 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-2-hydroxy-1-propansulfonátu (CHAPSO).
- 25 **8. Směs podle nároku 1, vyznačující se tím, že povrchově aktivní činidlo je zvoleno ze souboru sestávajícího z alkyltrimethylamoniumhydroxidů s dlouhými řetězcem, kationtových kvartérních amoniových halogenidů a solí C₁₂ až C₁₈ alkylsulfonátů s alkalickými kovy.**
- 30 **9. Směs podle nároku 1, vyznačující se tím, že povrchově aktivní činidlo je přítomno v koncentraci 10 až 40 gramů na litr.**
- 10. Směs podle nároku 1, vyznačující se tím, že pufr pH je zvolen ze souboru sestávajícího z kyseliny 3-(cyklohexylamino)-1-propansulfonové (CAPS), tetraborátu sodného, uhličitanu draselného, uhličitanu vápenatého a uhličitanu sodného.**
- 35 **11. Směs podle nároku 1, vyznačující se tím, že pufr pH je ve směsi přítomen v koncentraci 0,05 až 0,15 M.**
- 12. Směs podle nároku 1, vyznačující se tím, že obsahuje dále zásadu, kterou je**
 40 **hydroxid alkalického kovu nebo tetraalkylamoniumhydroxid, kde alkylová skupina obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku.**
- 13. Směs podle nároku 1, vyznačující se tím, že anorganická kyanidová sůl je zvolena**
 45 **ze souboru sestávajícího z kyanidu horečnatého, kyanidu sodného, kyanidu lithného a kyanidu amonného.**
- 14. Směs podle nároku 12, vyznačující se tím, že zásada je přítomna v koncentraci**
 0,05 až 0,5 mol na litr a kyanidová sůl je přítomna v koncentraci 0,5 až 5 gramů na litr.
- 50 **15. Reagenční směs pro stanovení hemoglobinu v krevním vzorku podle nároku 1, vyznačující se tím, že obsahuje vodnou příměs nejméně jednoho obojetného povrchově aktivního činidla v množství, které je účinné pro hemolýzu krevního činidla v množství, které je účinné pro hemolýzu krevních buněk ve zmíněném vzorku a vzniku micel, rozpustnou anorganickou kyanidovou sůl v množství, které je účinné pro vázání se na hemové molekuly,**
 55 **pocházející ze zmíněné hemolýzy krevních buněk, alkalickou zásadu a pufr pH, schopné zachovávat**

vat pH této reagenční směs v příměsi se zmíněným krevním vzorkem nevyvolává interferenci způsobenou buňkami bílých krvinek v automatických metodách stanovení hemoglobinu.

16. Způsob stanovení hemoglobinu ve vzorku celé krve, zahrnující smísení alikvotního množství zmíněného krevního vzorku s reagenční směsí na reakční směs a analyzování této reakční směsi na automatickém hematologickém analyzáčním přístroji za účelem stanovení hemoglobinu, **vyznačující se tím**, že se jako reagenční směs použije reagenční směs podle nároku 1.

17. Způsob podle nároku 16, **vyznačující se tím**, že pH reagenční směs je 10,4 až 11,2.

18. Způsob podle nároku 16, **vyznačující se tím**, že pH reagenční směsi je 10,8 až 11,2.

19. Způsob podle nároku 16, **vyznačující se tím**, že povrchově aktivním činidlem v reagenční směsi je obojetné povrchově aktivní činidlo, zvolené ze souboru sestávajícího z C_8 až C_{18} alkylbetainů, alkylsulfobetainů, alkylamidobetainů, alkylamidosulfobetainů nebo jejich kombinace.

20. Způsob podle nároku 19, **vyznačující se tím**, že obojetné povrchově aktivní činidlo se volí ze souboru sestávajícího z

n-alkyldimethylaminiomethankarboxylátu (DAMC),
n-alkyldimethylaminioethankarboxylátu (DAEC),
n-alkyldimethylaminiopropankarboxylátu (DAPC),
n-alkyldimethylaminiomethansulfonátu (DAMS),
n-alkyldimethylaminioethansulfonátu (DAES),
n-alkyldimethylaminioprepansulfonátu (DAPS),
n-tetradecyldimethylaminiopropansulfonátu (TDABS),
n-tetradecyldimethylaminiopropansulfonátu (DDAPS),
n-hexadecyldimethylaminiopropansulfonátu,
n-alkyldimethylamoniobutansulfonátu (DABS),
n-alkylamidomethandimethylamoniomethankarboxylátu,
n-alkylamidomethandimethylaminiomethankarboxylátu,
kokoamidopropylbetainu (CAPB),
kokoamidosulfobetainu (CASB),
laurylamidopropylbetainu (LAB),
n-alkylamidomethandimethylamoniomethansulfonátu,
n-alkylamidoethandimethylaminiomethansulfonátu a
n-alkylamidopropandimethylamoniopropansulfonátu.

21. Způsob podle nároku 16, **vyznačující se tím**, že povrchově aktivní činidlo v reagenční směsi se volí ze souboru sestávajícího z

N,N-dimethylaurylamin-N-oxidu (DMLAO),
N,N-dimethylmyristylamin-N-oxidu,
N,N-dimethylcetylamin-N-oxidu,
N,N-dimethylstearylamin-N-oxidu,
3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-1-propansulfonátu (CHAPS) a
3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-2-hydroxy-1-propansulfonátu (CHAPSO).

22. Způsob podle nároku 16, **vyznačující se tím**, že povrchově aktivní činidlo v reagenční směsi se volí ze souboru sestávajícího z alkyltrimethylamoniumhydroxidů s dlouhým řetězcem, kationtových kvartérních amoniových halogenidů a solí C_{12} až C_{18} alkylsulfátů a alkalickými kovy.

23. Způsob podle nároku 16, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že povrchově aktivní činidlo v reagenční směsi je přítomno v koncentraci 10 až 40 gramů na litr.

5 24. Způsob podle nároku 16, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že pufr pH v reagenční směsi se volí ze souboru sestávajícího z kyseliny 3-(cyklohexylamino)-1-propansulfonové (CAPS), tetra-borátu sodného, uhličitanu draselného, uhličitanu vápenatého a uhličitanu sodného.

10 25. Způsob podle nároku 16, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že pufr pH je v reagenční směsi přítomen v koncentraci 0,05 až 0,15 M.

15 26. Způsob podle nároku 16, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že reagenční směs dále obsahuje zásadu, kterou je hydroxid alkalického kovu nebo tetraalkylamoniumhydroxid, kde alkylová skupina obsahuje od 1 do 4 atomů uhlíku.

20 27. Způsob podle nároku 16, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že anorganická kyanidová sůl v reagenční směsi se volí ze souboru sestávajícího z kyanidu horečnatého, kyanidu sodného, kyanidu lithného a kyanidu amonného.

Konec dokumentu

25