

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY 142 043

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 84 08 31 (P. 249427)

Pierwszeństwo: 83 09 02 Węgry

Zgłoszenie ogłoszono: 85 07 30

Opis patentowy opublikowano: 88 07 30



Int. Cl.⁴ G01N 33/52

Twórcy wynalazku: László Muszbek, Róza Ádány, Ilona Harsányi,
Gabriella Zajka

Uprawniony z patentu: Reanal Finomvegyszergyár, Budapeszt (Węgry)

ŚRODEK DO RÓWNOCZESNEGO OZNACZANIA LICZBY TROMBOCYTÓW I LEUKOCYTÓW

Przedmiotem wynalazku jest środek do równoczesnego oznaczania liczby trombocytów i leukocytów w krwi całkowitej, za pomocą zwykłego mikroskopu optycznego.

Wiadomo, że oznaczanie liczby trombocytów i leukocytów należy do metod stosowanych zwykle w laboratoriach klinicznych. Liczbę trombocytów można oznaczać różnymi metodami, takimi jak niżej opisane. Elektroniczne obliczanie cząstek za pomocą automatów, opracowanych dla liczenia trombocytów. Metoda ta jest wprawdzie szybka i prosta, ale do jej stosowania są niezbędne bardzo kosztowne przyrządy i nie zawsze można nią zastąpić liczenie mikroskopowe. Powtarzalność tej metody jest także gorsza od powtarzalności liczenia mikroskopowego.

Liczenie trombocytów za pomocą mikroskopu z kontrastem fazowym, przy użyciu roztworu zawierającego kokainę lub nowokainę albo innego roztworu umożliwiającego takie liczenie. Do stosowania tej metody niezbędny jest mikroskop z kontrastem fazowym, a inną istotną wadą tej metody jest to, że jest ona bardzo męcząca, wyczerpująca i szkodliwa dla oczu osób prowadzących obliczanie, zwłaszcza jeżeli tych obliczeń jest wiele.

Liczenie trombocytów metodą barwienia. Ta metoda jest najprostsza i może być prowadzona za pomocą mikroskopu. W znanych metodach tego typu jako barwnik stosuje się fiolet krystaliczny (fiolet gencjanowy), będący chlorowodorkiem sześciometylo-p-rozaniliny. Metodom tym stawia się uzasadniony zarzut, że w porównaniu z metodą oznaczania przy użyciu kontrastu fazowego dają wyniki zniekształcone, ponieważ nie wszystkie trombocyty ulegają dobrze widocznemu zabarwieniu.

Obliczanie leukocytów stanowi najszerzej stosowaną metodę w diagnostyce hematologicznej. Do tego celu ogólnie nadaje się i daje dobre wyniki roztwór Turka, opisany w farmakopei węgierskiej (Ph. Hg. VI.), ale roztwór ten nie nadaje się do określania liczby trombocytów, co stanowi poważną wadę, ponieważ bardzo często konieczne jest wspólne prowadzenie obu tych szeroko stosowanych prób laboratoryjnych.

Do oznaczania liczby trombocytów i leukocytów w całkowitej krwi za pomocą zwykłego mikroskopu świetlnego niezbędny jest roztwór barwnika, który (a) powoduje całkowitą hemolizę erytrocytów bez zmniejszania liczby trombocytów i leukocytów, (b) utrzuca zarówno trombocyty jak i leukocyty i (c) zawiera taki barwnik, który wiąże się silnie z oboma tymi ciałami i w ten sposób utrzuca je w zwykłym świetle.

Roztwór, który odpowiada dwóm pierwszym z tych wymagań jest wprawdzie znany /Scand. J. Clin. Invest. 33, 121 (1974)/, ale przy jego użyciu trzeba obliczanie trombocytów prowadzić z zastosowaniem mikroskopu z kontrastem fazowym.

Wynalazek ma na celu wytworzenie takiego roztworu barwnika, za pomocą którego można oznaczać liczbę trombocytów i leukocytów w pełnej krwi przy użyciu zwykłego mikroskopu optycznego, z uniknięciem opisanych wyżej wad znanych odczynników.

Nieoczekiwanie stwierdzono, że przez połączenie roztworu hemolizującego i utrzucającego z zasadowym barwnikiem o dużym powinowactwie, uzyskuje się roztwór środka, który umożliwia wspólne określanie liczby trombocytów i leukocytów przy użyciu zwykłego mikroskopu optycznego. Oba warunki mogą być spełnione w przypadku, gdy roztwór działający hemolizująco i utrzucająco jest zgodny z barwnikiem, tzn. nie tworzy żadnego osadu. Powstawania mikroskopijnych osadów należy unikać, gdyż mogą one mieć charakter trombocytów i tym samym powodować błąd w obliczaniu.

Stosowane dotychczas roztwory barwników typu fioleto krezyłowego spełniają te warunki tylko częściowo. Roztwory do obliczania zawierające składniki barwnika fioleto krezyłowego mają bowiem odczyn słabo zasadowy, toteż trombocyty ulegają tylko blademu zabarwieniu i nie są uwidocznione jednoznacznie.

Wynalazek jest oparty na stwierdzeniu, że barwniki zwane tiazynowymi nadają się do tego celu bardzo dobrze. Cechą barwników tiazynowych jest obecność dwóch grup chromoforowych. Związki tiazynowe są w praktyce lekarskiej stosowane w różnych dziedzinach, np. do barwienia bakterii i w histochemii, ale ani fachowa ani patentowa literatura nie daje żadnej wskazówki, że mogą one być użyteczne do wytwarzania środka będącego przedmiotem wynalazku. Najważniejszymi przedstawicielami tej grupy związków są: błękit toluidynowy o wzorze 1, tionina o wzorze 2 i błękit metylenowy o wzorze 3.

Środek według wynalazku zawiera 0,1-5 części wagowych acetonu, 0,05-2,0 części wagowych aldehydu mrówkowego i/albo aldehydu glutarowego, 0,001-0,1 części wagowych barwnika tiazynowego, korzystnie błękitu toluidynowego, 0,1-2,0 części wagowych soli mineralnej, korzystnie chlorku sodowego, zaś resztę do 100 części wagowych stanowi woda.

Korzystnie środek według wynalazku zawiera w stosunku wagowym 0,1-5,0 części acetonu, 0,05-2,0 części aldehydu mrówkowego, 0,001-0,1 części błękitu toluidynowego i 0,1-2 części chlorku sodowego.

Szczególną zaletą barwników stosowanych zgodnie z wynalazkiem jest to, że mają one bardzo duże powinowactwo także i w stosunku do kwaśnych makrocząsteczek trombocytów i leukocytów, dzięki czemu uzyskuje się bardzo silną i wyraźną widoczność.

Najważniejszą zaletą środków według wynalazku jest to, że są one znacznie bardziej czułe od znanych odczynników. Fakt ten potwierdzają niżej opisane próby.

Z próbek o nieznannej liczbie trombocytów i leukocytów ustala się w 20 kolejno prowadzonych obliczeniach liczbę trombocytów i leukocytów. Dokładność obliczania komórek jest wtedy zadowalająca, gdy normalne odchylenie jest mniejsze niż 10%. Wyniki takich prób prowadzonych przy użyciu środka według wynalazku oraz przy użyciu znanych odczynników podano na rysunku w postaci wykresów, na których liczby trombocytów i leukocytów określono zgodnie z systemem SI jako wartości G/litr, to jest giga(liczba komórek)/litr, co równa się liczbie komórek pomnożonej przez 10^9 w 1 litrze.

Figura 1 przedstawia wyniki określania liczby trombocytów przy użyciu środka według wynalazku. Liczba trombocytów jako średnia z 20 pomiarów wynosi: $\bar{x} = 218,8$ G/litr, przy standardowej dewiacji $SD = \pm 5,0$, co odpowiada współczynnikowi dewiacji, wyrażonemu jako standardowa dewiacja w procentach: $CV = 2,28\%$.

Figura 3 przedstawia wyniki określania liczby leukocytów przy użyciu środka według wynalazku. Liczba leukocytów jako średnia z 20 pomiarów wynosi: $\bar{x} = 5,08$ G/litr, przy standardowej dewiacji $SD = \pm 0,042$, co odpowiada współczynnikowi dewiacji: $CV = 0,8\%$.

W celach porównawczych obliczono trombocyty przy użyciu odczynnika THROMBOFIX^R produkcji firmy Gödecke, a leukocyty obliczano przy użyciu odczynnika znanego pod nazwą roztwór Turk'a. Próby prowadzono z krwią pobraną od 41 pacjentów i równolegle liczono trombocyty i leukocyty. Wyniki w układzie współrzędnych kartezjańskich podano odpowiednio na fig. 2 i fig. 4. Korelację pomiędzy obiema metodami oraz standardowe współczynniki (a, b) funkcji opisującej te korelacje, mianowicie $y = ax + b$, określano za pomocą maszyny do liczenia Hewlett-Packard HP-90. Na obu tych wykresach y przedstawia wyniki uzyskane przy liczeniu w roztworze środka według wynalazku, zaś x oznacza wyniki otrzymane przy użyciu znanych roztworów.

Przy liczeniu trombocytów korelacja r wynosiła 0,927. Funkcjonalny związek liniowy pomiędzy obiema metodami można ująć równaniem: $y = 1,05x - 0,94$, w którym y oznacza wynik obliczania trombocytów uzyskany przy użyciu środka według wynalazku, zaś x oznacza wynik uzyskany przy użyciu odczynnika THROMBOFIX^R w próbie, której wyniki podano na fig. 2. Należy stwierdzić, że liczba trombocytów **oznaczona** przy użyciu środka według wynalazku jest o około 5% wyższa od tej, którą w tej samej próbce krwi określono przy użyciu THROMBOFIX^R. Uwzględniając charakter sposobu oznaczania, uzyskanie wyniku zbyt wysokiego nie wchodzi w rachubę. Stwierdzoną różnicę można przypisać temu, że składnik barwnika stosowanego w środku według wynalazku ma znacznie większe powinowactwo do kwaśnych grup makrocząsteczek trombocytów, toteż obraz wykazuje silniejszy kontrast i może być lepiej odczytany. Stosując środek według wynalazku można więc uniknąć systematycznie zbyt niskich wyników, otrzymywanych przy stosowaniu znanych roztworów barwników. Należy też nadmienić, że THROMBOFIX^R również i przy stosowaniu mikroskopu z kontrastem fazowym daje wyniki zbyt niskie.

W obliczeniach leukocytów przy użyciu środka według wynalazku i przy użyciu roztworu Turk'a korelacja wynosi: $r = 0,959$ i związek pomiędzy tymi obiema metodami można przedstawić jako funkcję liniową: $y = 0,97x + 0,23$. Wskazuje to, że pomiędzy obiema tymi metodami nie ma znacznej różnicy.

Wynalazek zilustrowano poniżej w przykładach, nie ograniczając tym jego zakresu.

P r z y k ł a d I. Roztwór do liczenia 200 ml 0,9% roztworu chlorku sodowego w destylowanej wodzie miesza się z 5 ml 35% aldehydu mrówkowego i 770 ml destylowanej wody, podanej działaniu wymiennicza jonów. Po silnym wymieszaniu roztworu rozpuszcza się w nim 100 mg barwnika będącego błękitem toluidynowym. Otrzymany roztwór przesącza się przez szklany filtr G-4. Po dodaniu 25 ml acetonu otrzymany roztwór powinien być klarowny i pozbawiony cząstek.

P r z y k ł a d II. Określenie liczby trombocytów i leukocytów w krwi żyłnej, po-traktowanej środkiem przeciw krzepnieniu. Celowe jest traktowanie krwi kwasem etylenodwuami-noczerooctowym jako środkiem przeciw krzepnieniu, ponieważ w obecności tego środka nie zachodzi nawet minimalne **osadzanie** się trombocytów. Po pobraniu krwi z kwasem etylenodu-

aminoczerooctowym nastawia się stężenie tego kwasu na 2 mg/ml przez uprzednie wysuszenie macierzystego roztworu wodnego soli dwusodowej kwasu etylenodwuaminoczerooctowego w rurce z sztucznego tworzywa. Krzepnieniu krwi można też zapobiegać stosując 3,3% roztwór cytrynianu trójsodowego w destylowanej wodzie, przy czym przy pobieraniu krwi do kaniuli z sztucznego tworzywa bierze się 9 części krwi na 1 część cytrynianu.

Do 25 μ l krwi żyłnej, poddanej zabiegowi zapobiegającemu krzepnieniu, w próbówce z sztucznego tworzywa dodaje się 475 μ l opisanego wyżej roztworu do liczenia i mieszanie pozostawia nie mieszając w temperaturze pokojowej na okres 15 minut. Liczenie trombocytów i leukocytów należy przeprowadzić w ciągu 6 godzin. Przed liczeniem roztwór miesza się ponownie, wkrapla do komory Bürker'a i pozostawia do osadzania się na okres 10 minut.

Liczenie trombocytów. Sumę obliczonych trombocytów w 10 kątach prostych komory Bürker'a mnoży się przez 2 w przypadku stosowania kwasu etylenodwuaminoczerooctowego, względnie przez 2,2 w przypadku stosowania cytrynianu jako środka zapobiegającego krzepnieniu i uzyskuje się liczbę trombocytów w G/litr.

Liczenie leukocytów. Liczbę leukocytów znalezionych w 4 kwadratach ograniczonych 3 liniami dzieli się przez 18 (lub mnoży przez 0,055) w przypadku stosowania cytrynianu, albo dzieli się przez 20 (lub mnoży przez 0,05) w przypadku stosowania kwasu etylenodwuaminoczerooctowego jako środka zapobiegającego krzepnieniu i uzyskuje się liczbę leukocytów w G/litr.

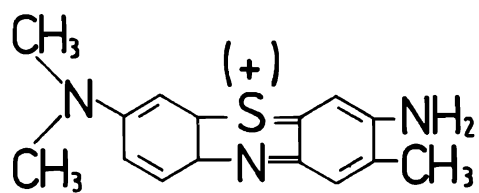
P r z y k ł a d III. Określenie liczby trombocytów i liczby leukocytów w krwi włóśniczkowej. Nakłuwa się zdezynfekowany koniec palca lub piętę, odgarnia pierwsze krople krwi i zasysa pipetą ze strzykawką z sztucznego tworzywa (np. pipetą Finna, Gilsona lub Eppendorfa) 25 μ l krwi. Krew tę poddaje się kołysaniu w rurce z sztucznego tworzywa, zawierającej 25 μ l roztworu kwasu etylenodwuaminoczerooctowego i miesza dobrze z tym środkiem zapobiegającym krzepnięciu. Po dodaniu 450 μ l roztworu do liczenia i dokładnym wytrząsieniu roztwór pozostawia się w pokojowej temperaturze na okres co najmniej 15 minut i po ponownym zmieszaniu podaje do komory Bürker'a i pozostawia w wilgotnej komorze na okres 10 minut do osadzenia się.

Liczbę trombocytów i liczbę leukocytów określa się w sposób podobny do opisanego wyżej w odniesieniu do krwi potraktowanej środkiem zapobiegającym krzepnięciu. Przy obliczaniu trombocytów mnoży się przez współczynnik 2, a przy obliczaniu leukocytów trzeba dzielić przez 20.

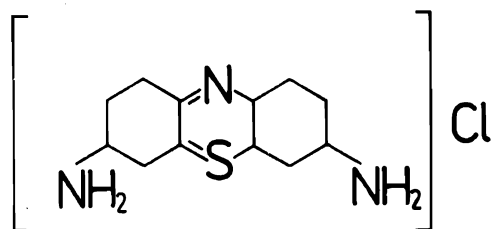
P r z y k ł a d IV. Postępuje się w sposób podany w przykładzie I, ale zamiast aldehydu mrówkowego stosuje się 80 g 25% aldehydu glutarowego.

Z a s t r z e ż e n i e p a t e n t o w e

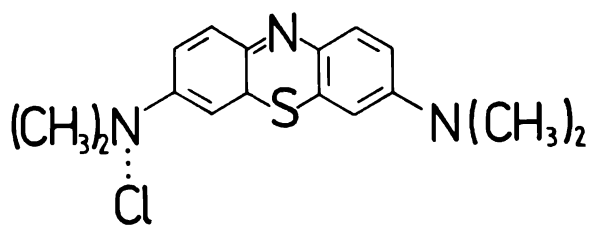
Środek do równoczesnego oznaczania liczby trombocytów i leukocytów za pomocą zwykłego mikroskopu optycznego, z n a m i e n n y t y m, że zawiera 0,1-5 części wagowych acetonu, 0,05-2,0 części wagowych aldehydu mrówkowego i/albo aldehydu glutarowego, 0,001-0,1 części wagowych barwnika tiazynowego, korzystnie błękitu toluidynowego, 0,1-2,0 części wagowych soli mineralnej, korzystnie chlorku sodowego, zaś resztę do 100 części wagowych stanowi woda.



Wzór 1



Wzór 2



Wzór 3

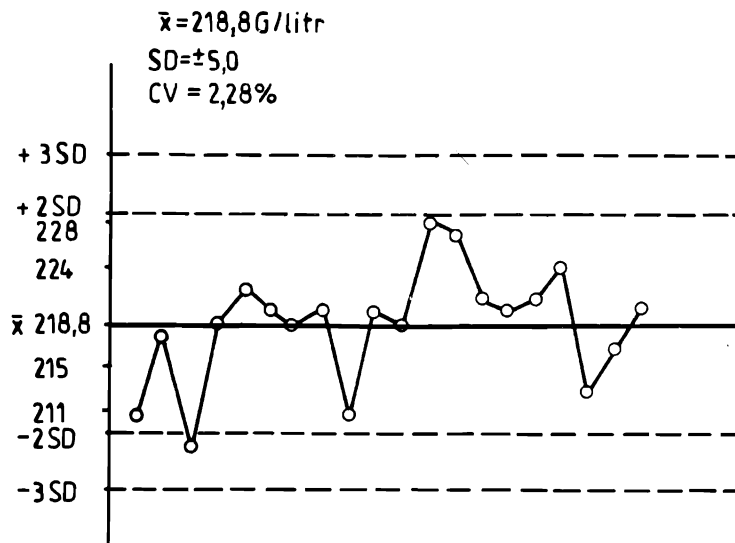


Fig.1

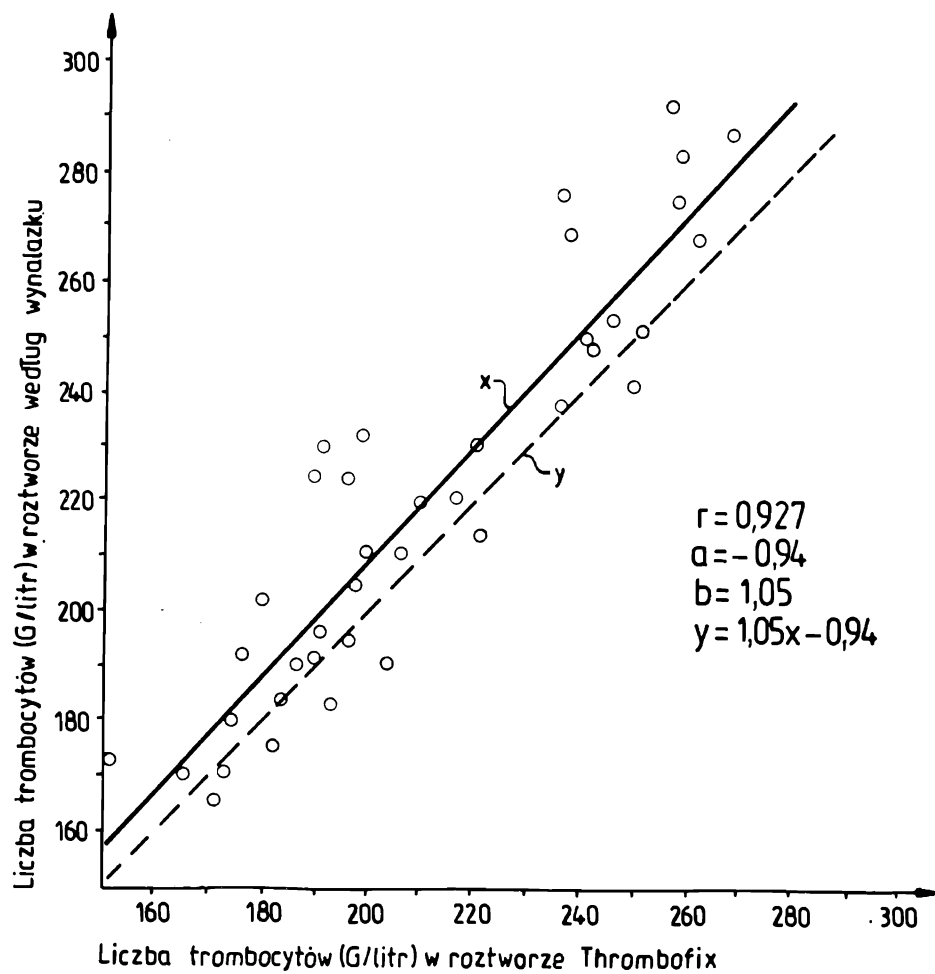


Fig.2

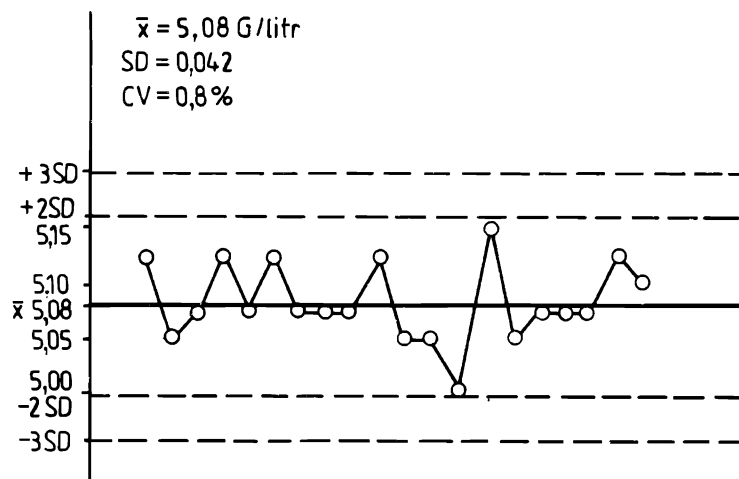


Fig.3

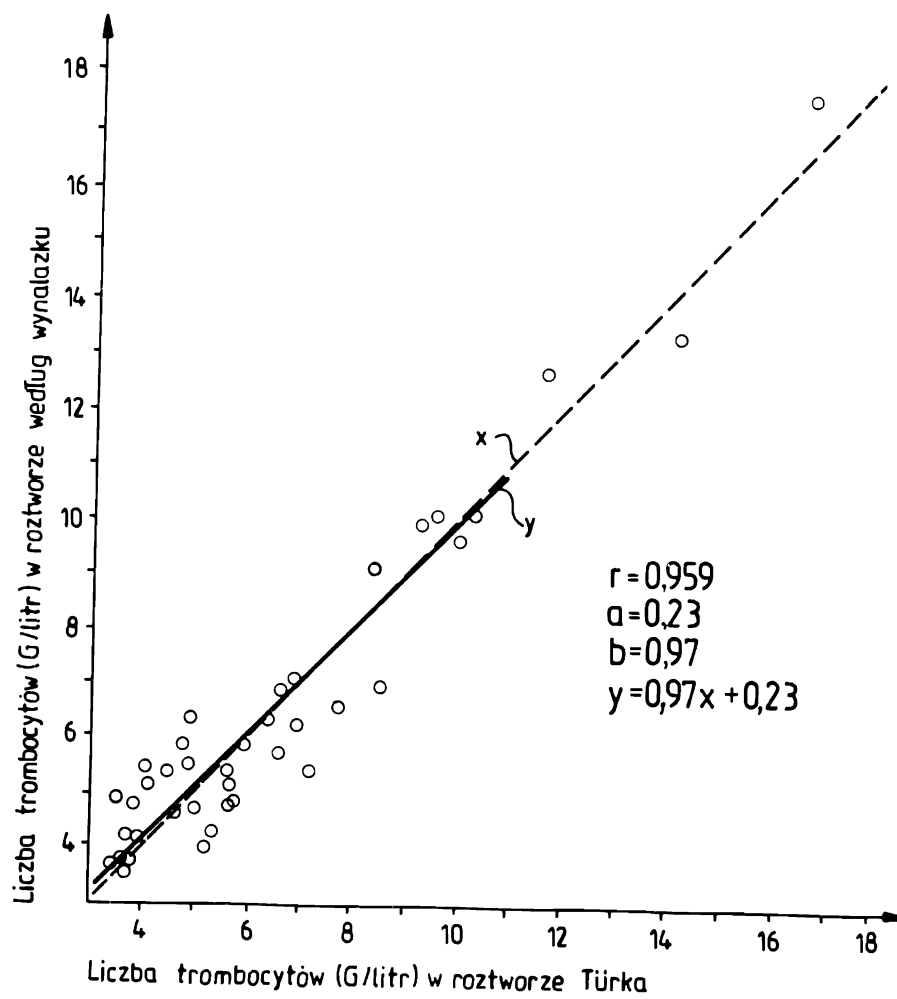


Fig.4