

433929

Int. Cl. G01N 33/16

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: COULTER DIAGNOSTICS INC.

RESIDENCIA: 740 West 83rd, Street, HIALEAH, Florida

33014 Estados Unidos.

ENUNCIADO: PERFECCIONAMIENTOS INTRODUCIDOS EN UN
METODO DE DETERMINACION DE LEUCOCITOS
Y HEMOGLOBINA EN LA SANGRE.

Prioridad: Patente estadounidense n.º 485.931 del 5-7-74

l.a.

1 REACTIVO Y METODO PARA LA DETERMINACION DE LEUCOCITOS
 Y HEMOGLOBINA EN LA SANGRE
 EXTRACTO DE LA INVENCION

5 Los leucocitos y la hemoglobina en la sangre se de-
terminan in vitro con un reactivo que consta de una disolu-
ción acuosa libre de iones ferricianuro que contiene un ion
amonio cuaternario y ion cianuro en cantidades suficientes
para la estromatolisis de células de eritrocitos y plaquetas
y para convertir la hemoglobina a un cromógeno para las de-
10 terminaciones.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

 Esta invención se refiere a un reactivo y un método
para la determinación de leucocitos y hemoglobina en la san-
gre. Mas particularmente, la invención se refiere a un reac-
15 tivo de diagnosis in vitro para estromatolisis de eritro-
citos a gran velocidad con transformación rápida de hemo-
globina en un cromógeno, para utilizarlo en la determinación
de leucocitos y hemoglobina en la sangre.

 La introducción de instrumentos de hematología de gran
20 velocidad automatizados tales como el Coulter Counter Mode-
lo "S" ha dado lugar a la necesidad de reactivos de estro-
matolisis de eritrocitos de gran velocidad y formadores de
cromógenos que den una disolución transparente, estable, re-
producible cuya densidad óptica sea directamente proporcio-
25 nal a la concentración de hemoglobina. En un instrumento de
este tipo, la sangre se mezcla con un diluyente convencio-
nal, para conseguir una primera dilución, y luego se mezcla
con un agente de lisis para lograr una segunda dilución. Las
diluciones primera y segunda pueden ser respectivamente, por
30 ejemplo, 224:1 y 250:1. La mezcla permanece en la cámara de

1 lisis durante un periodo de tiempo corto pero suficiente pa-
ra que los eritrocitos o células rojas de la sangre se des-
compongan y liberen su hemoglobina. La suspensión que resul-
ta se transfiere a tubos en un baño de recuento por abertu-
5 ra de leucocitos, donde los leucocitos o células blancas de
la sangre se cuentan electrónicamente. Con la hemoglobina
liberada contenida en la suspensión de recuento de leucoci-
tos se determina espectrofotométricamente en el mismo baño
la concentración de hemoglobina. Puesto que la relación de
10 eritrocitos a leucocitos en la sangre normal está en la pro-
ximidad de 1.000:1, los eritrocitos tienen que ser rapidamen-
te reducidos a fragmentos muy pequeños para evitar interfe-
rencias en el recuento de leucocitos. Al mismo tiempo, no
han de ser destruidos los leucocitos, y es necesario trans-
15 formar la hemoglobina en una forma adecuada para la determi-
nación fotométrica exacta.

Hasta ahora, los reactivos de lisis y de formación de
cromógenos de cianometahemoglobina se han utilizado en equi-
pos de hematología de alta velocidad automatizados. No obs-
20 tante, se han encontrado que estos reactivos no son satis-
factorios respecto de su estabilidad.

También se ha sabido que una sal de amonio cuaternario
se emplea ventajosamente como agente de estromatolisis, con
la destrucción virtualmente instantánea de eritrocitos a un
25 nivel que evita las interferencias en la determinación de leu-
cocitos, y suministrando un reactivo relativamente estable
(ver, por ejemplo, The American Journal of Clinical Pathology,
Vol. 36, Nº 3, Páginas 220-223. Sept. 1961). El ión de amo-
nio cuaternario en la sal es del tipo que tiene tres radica-
30 les alquilo de cadena corta y un radical alquilo de cadena

1 larga unidos al nitrógeno.

El método patrón de determinación de hemoglobina incorpora el uso del reactivo de Drabkin, que contiene ferricianuro potásico, cianuro potásico y bicarbonato sódico.

5 Cuando se añade hemoglobina a este reactivo, el ferricianuro potásico se reduce a ferrocianuro potásico y la hemoglobina se oxida a metahemoglobina. La última reacciona con el ion cianuro para producir el cromógeno estable, cianometahemoglobina, que se puede medir fotométricamente. El reactivo de Drabkin no es estable por exposición a temperaturas
10 de congelación.

El ion ferricianuro tiene tendencia a formar complejos insolubles con compuestos de amonio cuaternario. De este modo, una mezcla de reactivo compuesto de amonio cuaternario anterior con el reactivo de Drabkin puede ser no digna
15 de confianza, puesto que en el caso de precipitación, el precipitado, no importa cuan limitado, falsearía por exceso el recuento de leucocitos.

Sería deseable proporcionar un reactivo de estromatolisis de alta velocidad y formador de cromógenos exacto, estable, para utilizar en instrumentos de hematología automatizados de alta velocidad. Sería preferible proporcionar un reactivo que además no sea desfavorablemente afectado por exposición a temperaturas de congelación.
20

25

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

El reactivo de la invención consta de una disolución acuosa libre de ion ferricianuro que contiene un ion amonio cuaternario y ion cianuro teniendo el ion amonio cuaternario unidos al nitrógeno tres radicales alquilo de cadena corta y un radical alquilo de cadena larga, y estando presentes
30

1 dichos iones en cantidad suficiente para estromatolizar las
células de eritrocitos y plaquetas en la sangre y transfor-
mar la hemoglobina en un cromógeno para determinaciones de
leucocitos y hemoglobina. En el método de la invención el
5 reactivo anterior se hace reaccionar con una muestra de san-
gre para la determinación de leucocitos y hemoglobina en la
sangre.

El reactivo de la invención es una composición esta-
ble que permite determinaciones de leucocitos y hemoglobina
10 con la exactitud de diagnosis necesaria. Mas particularmente,
el reactivo reduce los eritrocitos a fragmentos muy peque-
ños en un corto periodo de tiempo, sin destruir los leucoci-
tos. El reactivo no forma precipitado que pueda interferir
en la determinación de leucocitos.

15 El reactivo transforma la hemoglobina en un cromó-
geno estable que tiene características espectrales que seme-
jan la cianometahemoglobina que es adecuado para análisis fo-
tométrico con un gran grado de exactitud: se proporciona una
disolución transparente, estable y reproducible para análi-
20 sis, la densidad óptica de la cual es directamente proporcio-
nal a la concentración de hemoglobina.

La invención representa el descubrimiento de que no
es necesario emplear el ión ferricianuro, y solo se necesita
emplear el ión cianuro junto con un ión de smonio cuaterna-
25 rio para transformar la hemoglobina en un cromógeno estable
adecuado para análisis. Consecuentemente, no hay peligro de
formación de complejos causado por la presencia de ión ferri-
cianuro. El reactivo es una disolución incolora.

30 DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

El reactivo de la invención es una disolución acuosa

1 libre de ión ferricianuro y que contiene como iones activos
un ión de amonio cuaternario y ión cianuro. Cada uno de los
respectivos iones se puede suministrar en forma de una sal
adecuada con un ión de signo opuesto. El ión de amonio cua-
5 ternario se suministra preferentemente en forma de una sal
con un anión inorgánico, especialmente como un haluro, tal
como cloruro o bromuro, un sulfato, un fosfato, o un nitra-
to. El ión cianuro se suministra preferentemente en forma
de una sal con un catión inorgánico especialmente un catión
10 de metal alcalino, tal como sodio o potasio. La disolución
puede constar esencialmente de dichas sales disueltas en
agua.

En general, el ión de amonio cuaternario es del tipo
de los empleados anteriormente en la técnica como agente de
15 estromatolisis es decir que tiene unidos al nitrógeno tres
radicales alquilo de cadena corta y un radical alquilo de
cadena larga. Por comodidad, los radicales alquilo de cade-
na corta se indicarán en adelante a veces por los símbolos
 R_1 , R_2 , y R_3 , y el radical alquilo de cadena larga se repre-
20 sentará por R_4 . En general, R_1 , R_2 , y/o R_3 pueden tener de
1 a 4 átomos de carbono, representados por los radicales
metilo, etilo, propilo y butilo. R_4 puede variar en el inter-
valo de unos 10 a 20 átomos de carbono, que van desde decil
a eicosil.

25 El ión amonio cuaternario se proporciona mediante una
sal de amonio cuaternario que se incorpora a la disolución
acuosa en una concentración en todo el intervalo de un 0,5
a un 10%, preferentemente alrededor de 1-5%, en peso de la
disolución.

30 Se emplea como agente de lisis una disolución de tal

1 concentraci3n y se mezcla con sangre previamente diluida
con diluyente patr3n en una proporci3n de 1:8,5, agente de
lisis a muestra diluida, como se describe anteriormente. Se
comprender3 que agentes de lisis de fuerza diferente se pue-
5 den emplear cuando la diluci3n inicial de la muestra de
sangre difiere de la descrita antes, con el fin de proporci-
onar la misma concentraci3n final de i3n reactivo.

El ion de amonio cuaternario espec3fico y su concen-
traci3n se eligen de modo que proporcionen la necesaria ac-
10 tividad hemol3tica y solubilidad del compuesto de amonio
cuaternario. En general, la solubilidad del compuesto dis-
minuye con n3mero creciente de 3tomos de carbono y con n3-
mero creciente de 3tomos de carbono del R₄ la actividad he-
mol3tica aumenta. As3, por ejemplo, cuando R₁, R₂, y R₃ son
15 metilos, R₄ puede contener de 10 a 20 3tomos de carbono
(C₁₀ a C₂₀) para proporcionar suficiente actividad hemol3ti-
ca a una concentraci3n de 5 % cuando se utiliza en el m3to-
do anal3tico anteriormente descrito. A una concentraci3n de
aproximadamente 0,5 % y cuando R₁, R₂ y R₃ son metilos, R₄
20 debe tener al menos unos 14 3tomos de carbono para propor-
cionar la necesaria actividad hemol3tica. A una concentra-
ci3n de aproximadamente 10 % y cuando R₁, R₂ y R₃ son meti-
los, R₄ debe tener un m3ximo de unos 16 3tomos de carbono
para proporcionar la necesaria solubilidad al compuesto. Co-
25 mo ejemplos adicionales, cuando R₄ es tetradecilo, R₁, R₂
y R₃ pueden ser radicales metilo, etilo o propilo a una con-
centraci3n de 0,5 a 10 %, proporcionando suficiente activi-
dad hemol3tica y una completa disoluci3n. Cuando R₄ es te-
tradecilo y R₁ es metilo, R₂ es metilo o etilo, y R₃ es bu-
30 tilo, la actividad hemol3tica es suficiente y el compuesto

1 es soluble al 0,5 a 5 %, pero el compuesto no es totalmen-
te soluble a una concentración del 10 %.

Es una nota destacada de la invención que el reactivo
se puede combinar de modo que se permita la congelación y
5 deshielo de la disolución sin formación de excesiva materia
especial, es decir, tal que pudiese superar la exactitud
del instrumento e interfiriese en un recuento exacto de leu-
cocitos. El instrumento antes identificado tiene un límite
de exactitud de 200 células. Por ejemplo, si R_4 es decil,
10 dodecil o tetradecil, y R_1 , R_2 , y R_3 son metilos, se puede
congelar y deshelar una disolución del 5 % de concentración
sin que se produzca la formación de menos que 200 particu-
las en 0,5 ml, según se determinó utilizando el Coulter
Counter F_N en preparaciones de umbral en células rojas de
15 la sangre. Si R_4 es tetradecilo y R_1 , R_2 , y R_3 son de meti-
lo a propilo, se puede congelar y deshelar una disolución
al 5% de concentración sin que resulte un recuento de par-
tículas menor que 200. Por otra parte, si R_4 es de C_{16} a
 C_{20} , y R_1 , R_2 y R_3 son metilos, el recuento de partículas
20 sobrepasa las 200 después de congelar y deshelar una disolu-
ción del 5 % de concentración. Asimismo, si R_4 es tetradeci-
lo, R_1 es metilo, R_2 es metilo o etilo y R_3 es butilo, el
recuento de partículas excede de 200 después de congelar y
deshelar una disolución del 5 % de concentración. Por consi-
25 guiente, es preferible que R_1 , R_2 y R_3 tengan cada uno de
1 a 3 átomos de carbono, y que R_4 tenga de 10 a 14 átomos
de carbono.

La concentración de ion cianuro se elige preferible-
mente de modo que proporcione al menos un 89% de transfor-
30 mación de hemoglobina en un cromógeno. Así, por ejemplo, pre-

1 viendo una disolución para utilizar de la manera anterior-
mente descrita, el ion cianuro está presente en una concen-
tración en el intervalo de aproximadamente 0,0006 a 0,005
molar, y preferiblemente en exceso de aproximadamente 0,001
5 molar. Se emplea una sal que cede el ión cianuro en una
molaridad para tener la concentración de ion cianuro desea-
da, siendo la misma molaridad en el caso de una sal de un
catión monovalente tal como un metal alcalino. Se pueden
obtener transformaciones al cromógeno de hasta un 96 % de
10 la hemoglobina. El cromógeno se analiza espectrofotométri-
camente a 540 nanómetros.

El siguiente es un ejemplo específico de un reactivo
de acuerdo con la invención. Se debe comprender que el e-
jemplo es solo ilustrativo, y que se pueden emplear otros
15 varios ingredientes y proporciones de acuerdo con la expo-
sición precedente.

EJEMPLO

La composición siguiente se puede emplear como un
reactivo de lisis y formador de cromógeno en el Coulter
20 Counter Modelo "S", siguiendo el procedimiento descrito an-
teriormente:

	<u>Ingrediente</u>	<u>Proporción</u>
	Agua	1 litro
	Cianuro potásico	0,25 g(0,00385%)
25	Cloruro de trimetil tetra- decil amonio	35 g (3,38 %)

La composición tiene un pH de aproximadamente 9. Cuando se
emplea para análisis con el diluyente de la sangre tampona-
do comercial Isoton y siguiendo dicho procedimiento, el pH
30 de la disolución final es aproximadamente 7,6.

1 En resumen, la Patente de invención que se solicita
deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

5 1. Perfeccionamientos introducidos en un método de
determinación de leucocitos y hemoglobina en la sangre, caracte-
rizándose dichos perfeccionamientos porque se hace reaccio-
nar un reactivo que comprende una solución acuosa exenta de
iones ferricianuros que contiene un ión de amonio cuaterna-
rio y un ión de cianuro, teniendo dicho ión de amonio cuater-
10 nario unidos al nitrógeno tres grupos alquilo de cadena cor-
ta y un grupo alquilo de cadena larga, con una muestra de san-
gre con el fin de efectuar la estromatolisis de las células
de eritrocitos y plaquetas y de convertir la hemoglobina en
un cromógeno para permitir las citadas determinaciones.

15 2. Perfeccionamientos de acuerdo con la reivindica-
ción 1 donde dicho ión de amonio cuaternario es suministrado
por una sal de amonio cuaternario incorporada a dicha solu-
ción en una concentración en el intervalo de aproximadamente
0,5 a 10% en peso de dicha disolución, y dicho ión cianuro
20 está presente en una concentración en el intervalo de apro-
ximadamente 0,0006 a 0,005 molar.

25 3. Perfeccionamientos de acuerdo con la reivindi-
cación 2 donde dicha sal es un haluro, sulfato, fosfato o ni-
trato, y dicho ión cianuro es suministrado por un cianuro
de metal alcalino incorporado a dicha disolución.

30 4. Perfeccionamientos de acuerdo con la reivindica-
ción 1 donde dichos radicales alquilo de cadena corta tienen
cada uno de 1 a 3 átomos de carbono y dicho radical alquilo
de cadena larga tiene de 10 a 14 átomos de carbono.

5. Perfeccionamientos de acuerdo con la reivindica-

1 ción 4 donde dicho ión de amonio cuaternario es suministrado
por una sal de amonio cuaternario incorporada a dicha diso-
lución en una concentración en el intervalo de aproximadamen-
te 0,5 a 10% en peso de dicha disolución, y dicho ión cianu-
5 ro es suministrado por un cianuro de metal alcalino incorpo-
rao a dicha disolución en una concentración de aproximadamen-
te 0,0006 molar.

10 6. Perfeccionamientos de acuerdo con la reivindica-
ción 5 donde dicha sal es un haluro, sulfato, fosfato o ni-
trato.

15 7. Perfeccionamientos de acuerdo con la reivindica-
ción 1, caracterizados porque el reactivo consiste en una compo-
sición compuesta por 1 litro de agua, 0,25 g. de cianuro po-
tásico, y 35 g. de cloruro de trimetil-tetradecil-amonio.

18 8. Se reivindica por último como objeto sobre el
que ha de recaer la patente de invención que se solicita por:
PERFECCIONAMIENTOS INTRODUCIDOS EN UN METODO DE DETERMINACION
DE LEUCOCITOS Y HEMOGLOBINA EN LA SANGRE.

20 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente memoria descriptiva que consta de once páginas me-
canografiadas.

Madrid, 17 de enero del 1.975

BERNARDO UNGRIA

P.E.

25

30