

448295

公告本

申請日期	85.04.17.
案 號	85104571
類 別	G01N 33/48

A4
C4Int.-Cl⁶

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	利用白血球之內過氧化酶的表現新鮮及陳化之全血樣的白血球差式計數的改良方法與試劑組合物
	英 文	IMPROVED METHOD AND REAGENT COMPOSITION FOR PERFORMING LEUKOCYTE DIFFERENTIAL COUNTS ON FRESH AND AGED WHOLE BLOOD SAMPLES, BASED ON INTRINSIC PEROXIDASE ACTIVITY OF LEUKOCYTES
二、發明 人	姓 名	1. 麥克·J·瑪林 2. 菲里斯·夏普羅 3. 約翰·F·克瑞敏
	國 籍	1-3均美國
住、居所	住、居所	1. 美國新澤西州派克瑞吉市特瑞斯街14號 2. 美國康乃狄克州史丹佛市菲史東路51號 3. 美國康乃狄克州華特布瑞市普迪路199號
	代 表 人 姓 名	肯尼斯·F·伍伯凱德
三、申請人	姓 名 (名稱)	美商拜耳公司
	國 籍	美國
住、居所 (事務所)	住、居所 (事務所)	美國紐約州泰瑞唐市班尼迪克特街511號

裝

訂

線

448295

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6
B6

本案已向：

美國(地區) 申請專利，申請日期：1995.5.16 案號：08/442,491 有 無主張優先權

有關微生物已寄存於：

，寄存日期：

，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

發明範圍

本發明關於全血樣本之改良白血球(即白血球細胞)差式方法及用於此方法中之試劑組合物。本發明差式方法和試劑組合物的基礎為白血球內過氧化酶活性之測定。無論是對新鮮血樣，或已貯存在室溫下約48小時或冷藏之陳化血樣，當樣本供光學掃描和吸收流動式細胞分析法作電子光學分析時，本發明方法和組合物都可以保持準確性和精密性。

發明背景

通常在全血樣中可發現之五類白血球細胞或白血球為嗜中性球、淋巴球、單核球、嗜酸性球和嗜鹼性球。為測定這五類正常白血球之相對比例，及偵測全血樣中任何不正常細胞之存在和濃度，傳統的醫學診斷步驟是檢測顯微玻片上經乾燥和染色的血液抹片。此種步驟稱為差式白血球計數，描述於 Miale, J. B., "Laboratory Medicine-Hematology"; (1967), C.V. Mosby Company, St. Louis, Missouri, pp. 822-830, 1126, 1127 and 1130。除了前述五類血樣中的白血球以外，差式白血球計數亦偵測和計算大型未染色細胞("LUCs")。LUCs代表正常血樣中的白血球的一小部份，並包括一些細胞種類，如大型淋巴球、經活化之淋巴球、漿細胞、芽細胞和過氧化酶陰性之單核球、嗜中性球和嗜酸性球。

因此發展出了半-和全-自動化血液學方法和自動化流動式系統裝置以減輕差式白血球計數和血樣分析之負擔，如

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

冰

五、發明說明(2)

Ansley等人之美國專利第3,741,875;Kim的美國專利第4,099,917號和Cremins等人之美國專利第4,801,549和4,978,624號中所描述。此種方法和系統使用電子光學和細胞化學程序去特異地偵測、鑑定、定量和標記各細胞種類。此外，此技藝中已知有測定白血球差式計數之手控程序，如Miale, J.B., "Laboratory Medicine-Hematology", (1967), C.V. Mosby Company, St. Louis, Missouri。

Hamaguchi等人之美國專利第5,389,549號描述分類白血球之方法和試劑，其中該方法涉及偵測高頻下之電阻改變或粒子和液體介質導電度之差異，且該試劑需一或二種成份溶液，其含有特定種類之陰離子性和非離子性以聚氧乙烯為基礎之界面活性劑，每分子含有18-30個重覆的氧乙烯單位，其中亦含有高-或低-滲透性試劑及安定劑。此二成份試劑同時需要第一液體稀釋液及第二溶血試劑液。

如Kim之美國專利第4,099,917號中所描述，先前用以製備供用於此系統中之細胞懸浮液之方法包括以界面活性劑處理未凝集血樣約1.5分鐘以使紅血球預設至待溶解狀態；再加入固定劑至細胞約1分鐘，並同時保持中性pH；然後培養該混合物於約58°C至60°C歷約2分鐘以溶解紅血球並固定白血球。

Cremins等人之美國專利第4,801,549和4,978,624號描述差式白血球計數測定之較快速方法和試劑，其可在全血樣中溶解紅血球而不破壞白血球，且其造成最小的額外細胞沉澱或細胞集結。此種沉澱或細胞集結導致程序中細胞偵測

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

水

五、發明說明(3)

和辨識階段之模糊。所述方法(或"過氧化酶方法")涉及一種混合物，其包括過氧化物(如過氧化氫)和一種適當的色原體以染色和區辨白血球類別中之特定細胞種類。

在該等方法中之任何一種中，都必需把紅血球盡量溶解掉，因為在正常血液中，紅血球數目超過白血球約1000倍。因此，即使紅血球僅殘留百分之一未被溶解，仍很難精密而準確地進行白血球細胞差式計數。

在美國專利第4,801,549和4,978,624號所描述之過氧化酶方法中，在全血樣與一個溶液混合後，紅血球被溶解而白血球被交聯或"固定"，該溶液包括僅一種界面活性劑，一種固定劑如三聚甲醛或甲醛、一種糖或糖醇及一種緩衝劑以保持約中性pH。位在一些特定白血球即嗜中性球、嗜酸性球和單核球細胞質中的過氧化酶陽性顆粒中，過氧化氫和一種供電子色原體(如4-氯-1-萘酚)形成深紫色沉澱。此沉澱是一種不溶性反應產物，其是受細胞內顆粒中之過氧化酶催化而形成。區辨細胞種類是藉電子光學分析來進行，以逐個細胞的方式來測定細胞大小和染色程度(即正角散射對吸收)，並點記在細胞圖中，然後進行分析以得到白血球總數和樣本中不同種類白血球的差式計數。此外，白血球總數可與差式計數分開獲取。

在本發明提供改良和優點前，已描述有一種鹼性過氧化酶稀釋劑，特別可用於白血球分類用之鹼性過氧化酶方法中，該方法是在Technicon H6000™自動化分析系統上進行。先前之鹼性過氧化酶稀釋劑有些主要缺點，如試劑成份

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

以

五、發明說明(4)

的不安定性和所造成的短暫擱置和貯存壽命。此外，使用者必需製備鹼性過氧化酶稀釋劑之均勻工作溶液，以進行鹼性過氧化酶方法。使用者需要混合一種含高量(即4.5%)硫酸十二酯鈉之溶液和一種含高量(即30%)Brij® 35之溶液，造成工作用鹼性過氧化酶稀釋劑含高濃度的二種界面活性劑。此種使用者製備程序不僅涉及刺激性稀釋劑試劑成份，亦造成費力，且必需進行多次，因為所得均勻工作用鹼性過氧化酶稀釋劑只安定一週。下文將會清楚說明，鹼性過氧化酶稀釋劑之不安定性、短暫貯存能力和使用者操作問題以及相關之缺點，都可被本發明大幅改善和克服。

在本發明之前，另有一項阻礙細胞分離和定量方法精密性和可信度之主要缺點，特別是對白血球差式計數之過氧化酶而言，該缺點是方法中之易變潤洗攜移(carryover)。已知潤洗攜移隨不同系統和分析而有不同。特別是基於過氧化酶反應方法之白血球差式分析的精密性和準確性常受到方法中所進行此種易變潤洗攜移的影響。熟習是項技藝之人士假設潤洗攜移只對方法有體積稀釋作用，及假設潤洗攜移在方法的反應步驟中未扮演活性或功能性角色。事實上，在本發明之發現以前，熟練之操作者並未發現潤洗攜移對血樣分析不只是單純的體積效應，且尚無本發明所提出和描述之解決方式。

再者，此技藝中需要改良的試劑和方法，以自新鮮(即取出後少於或等於8小時)血樣和已在室溫下貯存高達約48小時之陳化血樣中分析和汲取有用的臨床資料。亦需要發展

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(5)

適當的試劑溶液和組合物，其包括可減少由易變潤洗攜移所引起的前述問題和可產生精密又可信賴的結果之成份，特別是但不限於此)用於各種不同血樣種類之電子光學分析中，血樣種類如以各種不同方式(如冷藏或室溫下貯藏)保存之新鮮全血樣、陳化全血樣、異常全血樣(如醫院或病患來源)及正常全血樣(如非醫院或"健康"提供者之來源)。此技藝尚需要試劑組合物，其非常安定、具長久擱置和貯存壽命(如大於一週)，且在用來進行白血球差式計數方法及由此方去中獲得資料之前，無需使用者或消費者之製備或操作。在用自動化分析儀進行室溫貯存或陳化血樣之差式計數時，必需能使所得細胞圖原點處之雜訊達到及/或保持可接受的程度。

發明要點

本發明提供用於定量和區辨新鮮和陳化全血樣中的白血球之改良試劑組合物和方法，係使用電子光學程序和流動式細胞計數分析。

本發明之目的在於提供用於半-和全-自動化系統中之最適化、改良試劑組合物和方法，以避免將所不欲之反應成份由一方法步驟攜移至另一方法步驟的問題，如此使得細胞種類得以乾淨地分開和定量，而不致在用於白血球差式計數的方法所得的細胞圖中產生無法接受之原點雜訊程度和細胞污染。

本發明進一步的目的在於提供一種潤洗試劑溶液，其在白血球差式方法的反應步驟不扮演任何功能性角色，且不

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明(6)

參與此方法的反應化學，特別是對過氧化酶方法而言。

本發明另一目的在於提供自動化過氧化酶方法和試劑組合物，其可對各種不同血樣種類得到準確和精密的結果，如陳化和新鮮血樣，異常和正常血樣，及冷藏和室溫下貯藏之樣本。

本發明尚有一目的在於提供一種改良的試劑組合物，其可用於過氧化酶方法中以計數和區辨全血樣中的不同白血球種類，係使用吸收流動式細胞計數法。

本發明還有一目的在於提供最適化且改良的方法和試劑組合物，用來快速並有效地定量測定全血樣中之白血球數目和亞群基式計數，係使用內過氧化酶染色，運用使用自動化血液學分析和流動式細胞計數法。

本發明另一目的在於提供一種試劑製品，其可改良白血球樣本中嗜酸性球亞群之分離。

本發明另一目的在於提供平衡及安定之試劑組合物，用於在涉及陳化全血樣過氧化酶染色之白血球差式計數方法中，將反應步驟最適化，及用於避免此方法中潤洗攜移的負面效果。

本發明還有一目的在於提供安全又安定之試劑製品和方法，其中該試劑組合物係方便且立即可用的，不需要由使用者或消費者在使用前作額外的製備和混合。本發明試劑組合物在室溫下是安定的，且可維持長久的貯存和擱置壽命(如大於一週且至少約一年)。另一目的在於使白血球差式計數方法合理化，及減少進行此方法的步驟時所需的試

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(7)

劑數目。

本發明的目的和優點將於下列詳述中更為清楚說明。

縮寫及術語

下列縮寫和術語之定義或解釋係為方便熟習此項技術之人士，而絕非欲限制本發明之範圍：

在所例示之自動化分析儀上所進行的過氧化酶方法中，紅血球溶解定義為打破細胞膜而造成大部份或全部血紅素自細胞中流出。所得紅血球虛體(ghost)能被存在過氧化酶方法所用組合物中之固定劑作化學交聯或固定。紅血球虛體在細胞圖原點區域中被偵測為雜訊，其係用流動式細胞計數法由樣本中以電子光學偵測細胞而得。

過氧化酶在本案中全縮寫為"Px"。

在本文中，所用的術語水性試劑組合物、試劑溶液和稀釋劑係相當的。

R1是白血球細胞差式計數Px方法中的第一反應相。如本文中所述，在Px方法之R1相中，白血球樣本是與根據本發明所調配的第一水性試劑組合物("Px R1試劑組合物"或"過氧化酶R1試劑組合物")相混合。在Px方法之R1相中，經由R1試劑組合物中所存在的固定劑，樣本中所有或大部份紅血球被溶解，且白血球被化學交聯或固定。

新鮮血樣是指血樣在取出後少於或等於8小時時即用於分析。術語"新鮮血樣"與本文中所用"第一天樣本"是同義詞。

陳化血樣是取出後已在室溫下貯存高達約48小時之血樣。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

詠

五、發明說明(8)

。術語"陳化血樣"涵蓋本文中所用的"第二天血樣"一詞。

圖示說明

附圖可進一步描述本發明，並經由澄清其各種不同方面而有助於了解本發明，圖示乃呈現一些細胞圖，這些細胞圖在用自動化血液學分析儀電子光學偵測裝置來進行差式白血球計數之過氧化酶方法時，使用根據本發明所製得之各種水性試劑組合物或稀釋劑或其改良試劑所得到。圖1中之數字標記是為標示細胞圖中之不同區域，且在各圖中是相同的。如所示，數字1表示淋巴球族群區域；數字2表示單核球族群區域；數字3表示嗜中性球族群區域；數字4表示嗜酸性球族群區域；數字5表示由血小板和紅血球虛體造成之原點雜訊區域；及數字6表示LUC族群區域。

圖1A-1D的實驗結果係為測試當使用只含離子性界面活性劑之過氧化酶R1試劑組合物進行白血球差式計數之Px方法時，是否能得到可接受的結果。Px方法進一步包括一個潤洗循環，其中潤洗是調配成不含非離子性界面活性劑，或含有非溶血性界面活性劑Pluronic。圖1A細胞圖是以第一天血樣進行Px方法所得之結果。圖1A中所用的R1試劑組合物含0.105克/升SDS(硫酸十二酯鈉)；圖1A中所用的潤洗試劑溶液含3.0克/升Brij® 35和2.0克/升SDS。圖1B細胞圖是以第二天血樣進行Px方法所得之結果。圖1B中所用的R1試劑組合物含0.105克/升SDS；圖1B中所用的潤洗試劑溶液含3.0克/升Brij® 35和2.0克/升SDS。圖1C細胞圖顯示以第二天血樣進行Px方法之結果。圖1C中所用之R1試劑組合

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

人

五、發明說明(9)

物含0.105克/升SDS。相對於圖1A和1B，圖1C中所用之潤洗試劑溶液含1.0克/升非溶血性界面活性劑Pluronic 105，其存在於磷酸鹽緩衝食鹽水中(見表2)。圖1D細胞圖顯示以第二天血樣進行Px方法所得之結果。如同圖1C，圖1D中所用之Px R1試劑組合物含SDS，但具較高濃度，即0.17克/升SDS。潤洗試劑溶液和圖1C中所述者相同。圖1A-1D結果圖示，相較於第一天血樣分析結果(圖1A)，其係用只含SDS之R1試劑組合物和含離子性界面活性劑SDS和非離子性界面活性劑Brij® 35二者之潤洗試劑來進行，第二天血樣分析是用只含SDS之R1試劑組合物和與圖1A相同的潤洗循環來進行，可得到可接受的原點雜訊。相對地，若潤洗液只含Pluronic P105界面活性劑(圖1C和1D)，則細胞圖顯示無法接受程度之原點雜訊。圖1C和1D顯示，當潤洗液不含非離子性界面活性劑如Brij® 35時，Px試劑組合物中只含離子性界面活性劑是不足以由Px方法中得到可接受的和有用的結果。如本案發明人所測定，圖1C和1D之第二天血樣分析結果無法接受是因R1試劑組合物中缺乏非離子性界面活性劑。

圖2A-2J的實驗結果係為測試當使用只含不同濃度非離子性界面活性劑之Px R1試劑組合物來進行Px方法時，是否能得到可接受的數據和結果。如所示，圖2A-2E細胞圖是以第一天血樣進行Px方法所得之結果，圖2F-2J細胞圖是以第二天血樣進行Px方法所得之結果。圖2A和2F中所用之Px R1試劑組合物含0.12克/升Brij® 35和2.0克/升

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

水

五、發明說明 (10)

SDS，係作為第一天和第二天血樣分析之對照組。圖2B-2E和圖2G-2J中所用Px R1試驗試劑組合物不含離子性界面活性劑(即0.0克/升SDS)。試驗試劑組合物含下列含量之非離子性界面活性劑Brij® 35:圖2B和2G含0.0克/升Brij® 35;圖2C和2H含0.14克/升Brij® 35;圖2D和2I含0.28克/升Brij® 35;及圖2E和2J含0.42克/升Brij® 35。如圖2A-2J所示，Px R1試劑組合物中只含非離子性界面活性劑時，Px方法所得細胞圖的結果係無法接受的。因此，只有非離子性界面活性劑是不足以自Px方法得到可接受的結果的。

圖3A-3D的實驗結果係為測試當Px方法包括一個樣本潤洗循環且使用兼含非離子性界面活性和離子性界面活性劑之Px R1試劑組合物時，是否能提供可接受之數據和結果，特別是用第二天血樣進行分析時。如所示，圖3A和3B細胞圖是用第一天血樣進行Px方法之結果，所用Px R1試劑組合物含0.0克/升Brij® 35和0.105克/升SDS。圖3A分析中所用之潤洗溶液含3.0克/升Brij® 35和2.0克/升SDS。圖3B分析中所用之潤洗溶液含0.0克/升Brij® 35和2.0克/升SDS。圖3C細胞圖是以第二天血樣進行Px方法之結果，所用Px R1試劑組合物含0.0克/升Brij® 35和2.0克/升SDS，及潤洗循環試劑含0.0克/升Brij® 35和2.0克/升SDS。圖3D細胞圖是以第二天血樣進行Px方法之結果，Px R1試劑組合物兼含0.12克/升Brij® 35和2.0克/升SDS，及新揭示之潤洗試劑溶液含非溶血性界面活性劑Pluronic

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

水

五、發明說明 (11)

P105而無SDS或Brij® 35。圖3A-3D之結果顯示，以第二天血樣作分析時，若欲得細胞圖之完整性，R1試劑組合物中，除了離子性界面活性劑以外，需要包括非離子性界面活性劑(如Brij® 35)，而潤洗溶液不含Brij® 35。

圖4A-4F細胞圖是在全血樣上之實驗結果，為測試本發明過氧化酶方法中易變潤洗攜移之影響(見實例5)。圖4A-4F所示實驗中所用之Px R1試劑組合物含0.105克/升SDS。潤洗循環中所用潤洗溶液之組成有所不同，潤洗液含2.0克/升SDS(圖4A、4C和4E)或2.0克/升SDS+3.0克/升Brij® 35(圖4B、4D和4F)。圖4A和4B是Px方法中所用潤洗循環有約7.9微升潤洗攜移體積時所得之細胞圖結果；圖4C和4D是Px方法中所用潤洗循環有約10.1微升潤洗攜移體積時所得之細胞圖結果；及圖4E和4F是Px方法中所用潤洗循環有13.3微升潤洗攜移體積時所得之細胞圖結果。細胞圖顯示，若攜移體積超過約8.0微升，則潤洗溶液中存在有非離子性界面活性劑Brij® 35會產生無法接受之結果。

發明詳述

本發明大致是關於用過氧化酶(Px)方法來測定和定量白血球差式計數的改良方法和試劑組合物，其依據特定種類白血球之內過氧化酶活性的測定。本發明特定是關於半自動化和自動化流動式細胞計數分析儀，及關於白血球測量和亞群測定用之過氧化酶方法之改良。

為助了解本發明，乃摘要說明測定白血球差式計數之自動化過氧化酶方法中所發生之細胞和分子事件。在過氧化

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (12)

酶方法之第一或R1相中，血樣是和水性第一試劑(R1)組合物(即R1溶液或稀釋劑)混合，混合物加熱至約70°C約15-20秒。在此期間，紅血球溶解，其血紅素流出，所得紅血球虛體被固定。白血球被固定劑(如甲醛)化合物化學交聯或"固定"，以對抗在其餘反應中溶解。一般而言，紅血球較白血球和血小板易於溶解，然而，在此程序所用之條件下，紅血球虛體和血小板被交聯並非不尋常，因溶解和交聯是發生在相同樣本反應混合物中之競爭過程。因此，在血樣中，過氧化酶方法需要在紅血球溶解和白血球固定間達到精密平衡。若Px R1試劑組合物之溶解力太強，紅血球和白血球都被破壞。相反的，若固定劑濃度太高，在紅血球溶解前，所有細胞都被固定。因此，白血球差式計數可達高精密度；及準確測定細胞種類和細胞數目，特別是根據本發明發展出之改良過氧化酶方法的速度和最適反應條件和試劑配方，用半-和全-自動化血液學系統中進行快速樣本分析。

全血中紅血球對白血球之比例為約1000:1。因此，為使全血樣分析用之自動化過氧化酶方法達最佳功效，顯然樣本中之所有紅血球必需在分析前期即被溶解。結果在用R1稀釋劑於第一反應中時，紅血球溶解和白血球交聯間有競爭。若紅血球在溶解步驟中存活，帶有血紅素，則很可能會干擾差式計數，因其會被誤認為淋巴球，在所得細胞圖中之淋巴球區域佔據位置。然而，在過氧化酶方法R1相中，血樣中的白血球不被溶液攻擊或分解亦很重要。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

水

五、發明說明 (13)

接著過氧化酶 R1 相後是第二反應相 (亦稱為 "反應 2" 或 "R2")，將過氧化氫基質溶液和電子提供者 (如 4-氯-1-萘酚) 加至 R1 反應混合物中。該等化合物為內部細胞性過氧化酶之基質，在這些白血球種類中差異地存在，可 "染色" 包括單核球、嗜中性球和嗜酸性球。淋巴球和大型未染色細胞 (LUCs) 不含內過氧化酶，因此在此方法中不被染色。紅血球和血小板的組合，其亦不含內過氧化酶，不被染色，但可能造成原點雜訊。在幾乎所有涉及全面細胞分析的方法都會遭遇此現象。不完全溶解的紅血球，含一些或所用的血紅素，可在 Px 方法所得之細胞圖的淋巴球區域被偵測到，並干擾此方法。血小板和血小板凝集團亦可在淋巴球區域被偵測到，此乃另一干擾來源。

在過氧化酶方法中，"染色" 是複雜化學反應之結果，其中電子提供者基質如 4-氯-1-萘酚被氧化和聚合成深紫色反應產物，被束縛在細胞中。細胞內顆粒被染成紫色，因此，若在顯微鏡下可觀察到過氧化酶反應混合物 ("沖提液") 中之細胞 (用顯微鏡肉眼檢視時，染色細胞看似黑色)。在自動化血液學分析系統中，如以 H●™ 系統為例，其可以商品名 TECHNICON H●1™, H●2™, H●3™ 等購得，由本案受讓人出售，可藉測定吸光 (基於紫色反應產物) 和光散射 (根據細胞大小) 來作電子光學偵測。

本發明提供一種新穎的試劑組合物，可用於過氧化酶方法中之 R1 相，以改良和最適化過氧化酶方法之整體功效，此乃因新加入一個成份至試劑組合物中；該成份為溶血性

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

水

五、發明說明(14)

、非離子性界面活性劑，如 Brij® 35。在新穎試劑組合物中同時存在有此種非離子性界面活性劑和離子性界面活性劑，乃提供了一種新穎 PxI 試劑或稀釋劑，其可成功地和其他試劑一同用於上述過氧化酶方法之接續反應相中。熟習此項技藝者知道 Px 方法之 R1 相中，界面活性劑之量和濃量是很重要的-即太多界面活性劑會造成樣本中之白血球被侵襲，而太少界面活性劑則無法適當溶解紅血球，因而造成所得細胞圖中有過高之原點雜訊。

在本發明具體實施例中，當在過氧化酶方法中亦用水性潤洗試劑進行潤洗循環時，本發明新穎 R1 試劑組合物亦可成功地使用，限制條件為潤洗溶液不亦含溶血性非離子性界面活性劑，如 Brij® 35。特別是，本發明 R1 試劑組合物可和一種新穎潤洗試劑組合物共同使用，該潤洗試劑組合物被調配成只含 Pluronic 類界面活性劑，完全沒有其他種類界面活性劑(即無離子性界面活性劑，如 SDS，亦無非離子性界面活性劑，如 Brij® 35)。

本發明試劑組合物解決了下列問題，在下列說明和實例中將更為清楚。本案發明人測定了目前以自動化分析系統進行過氧化酶反應時，如上述所例示之 H●™ 系統，在過氧化酶方法一個樣本循環終了時留在反應室中之潤洗溶液體積通常為約 8 微升。似乎少量潤洗攜移會成為下一樣本循環的一部份；進行此方法之人士單純地假設此體積不具影響此方法之功能。

然而，現發現當此潤洗攜移體積超過約 10 微升時，過氣

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (15)

化酶方法之功效劣化。本案發明人亦意外發現，潤洗溶液(並攜移至R1試劑中)中存在有非離子性界面活性劑如Brij® 35的確造成此方法之劣化，離子性界面活性劑如SDS則無此作用。簡言之，下文中亦將描述，本發明發現習用於過氧化酶方法中之含Brij® 35潤洗液會"輸送"非離子性溶血性界面活性劑至此方法R1相中，因此造成Brij® 35以功能性但非所欲的方式參與此方法。基於這些了解，本案發明人發現，用於過氧化酶方法中之潤洗液的確提供所需成份(即非離子性界面活性劑如Brij® 35)至Px方法之R1相中，且當潤洗攜移體積隨系統而變時，過氧化酶方法之功效和結果受到不良影響。根據本發明之發展，本案發明人首度了解到潤洗攜移不只是對過氧化酶方法功效無害之現象。

這些知識導致本案發明人設計出上述改良之R1試劑組合物，其兼含非離子性界面活性劑和離子性界面活性劑，供用於過氧化酶方法之R1相中。此外，本案發明人進一步改良此方法，自潤洗溶液中移除非離子性界面活性劑如Brij® 35，此潤洗溶液亦可經由潤洗循環而用於此方法中。再者，頃發現含非溶血性、非離子性界面活性劑如Pluronic之新穎潤洗溶液最適合和新穎R1試劑組合物一同用於Px方法中。藉除去潤洗溶液中之溶解性非離子性界面活性劑(或藉使用非溶血性Pluronic作為潤洗液中唯一的界面活性劑)，及藉調配新穎PxI試劑組合物為兼含適當非離子性界面活性劑和離子性界面活性劑，R1試劑中之非離子性界面活性劑可在Px方法中以經控制的速率最佳地輸送。潤洗攜移體積之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

水

五、發明說明 (16)

變動亦不會影響此新方法所得之結果。結果在改良R1試劑和過氧化酶方法中，活性非離子性界面活性劑成份只存在用於此方法R1相中之試劑組合物中，其功能性活性為紅血球溶解所必需。此外，當此方法中使用潤洗液時，不含Brij[®] 35之潤洗組合物(或只含非溶血性Pluronic作為界面活性劑)最好不含任何會活性地參與過氧化酶方法之界面活性劑，因而避免潤洗溶液中之有害成份造成無法接受或無用之結果。

在自動化血液學方法中之潤洗攜移的發生及其相關問題進一步討論如下：用自動化血液學分析儀分析全血樣時，所有待分析之血樣和試劑溶液混合，並流過共用之水道(即通道)中。在每次樣本循環間，藉引入定量潤洗液來清潔或潤洗通道。在此過程中，通道從無法完全除去潤洗溶液或使其乾燥。此潤洗過程結果造成部份潤洗溶液留滯，並進入下一樣本循環。此描述了潤洗攜移現象。

在一些用於進行過氧化酶方法之系統中，已知潤洗攜移將造成不定量反應成份由一樣本循環進入下一樣本循環中。當比較不同系統時，這更為明顯。潤洗攜移體積之系統變異會對自動化分析儀上所進行之方法結果造成負面影響，其程度可能很細微，也可能更為明顯。例如，在後者的情況中，更大量潤洗攜移(如大於約10微升)造成此方法有不良結果。在前者的情況中，潤洗體積更細微的系統變異(例如在不同系統中有7.5微升，8.0微升，8.3微升體積)會造成系統進行得些微不同。直到本發明才描述，此二種潤

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

號

五、發明說明 (17)

洗攜移體積之變異均對既存之過氧化酶差式計數方法有負面影響並造成問題。

如前文所述，在本發明以前，熟習此項技藝之人士接受一項說法，即易變之潤洗攜移僅為進行此方法中所發生的輕微體積攜移效應。然而，如本文進一步描述，本案發明人經由定量攜移體積及分析反應成份和方法步驟，發現在白血球鑑定和定量用之過氧化酶方法中，潤洗攜移(無論其發生是較細微而潛藏，隨系統而有有限但不同之體積，或無論其發生是隨系統而有更劇烈之體積改變)對此方法不只是體積稀釋作用，造成既存方法之偏差和瑕疵，並惡化此方法之功效，乃扮演一活性之角色，而非不活性之角色。

在一特例中，發現在此方法R1相中，活性界面活性劑之量超過特定程度時會造成所得細胞圖偏差，其特徵為受損嗜酸性球集結和升入細胞圖之嗜中性球區域中(圖4A-4F)，且嗜中性球染色不佳且族群不規則。實例5說明潤洗溶液攜移使可變量之非離子性界面活性劑Brij® 35進入Px方法之R1相中(涉及紅血球溶解和白血球交聯)。

因此，本發明成功地藉除去潤洗液中之界面活性劑成份而減少潤洗溶液中界面活性劑成份對Px方法之活性參與，亦使此方法免受易變潤洗攜移之影響。此藉由調製新穎Px R1試劑組合物而進一步達成，最後結果是"活性"界面活性劑成份只存在Px R1試劑組合物中(其輸送在Px方法R1相中是經控制且固定的)，而不存在潤洗溶液中(其中經由樣本潤洗循環而造成的潤洗試劑成份輸送是可變動的，且不

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

冰

五、發明說明 (18)

易控制良好)。因此在整體方法中，本發明產生精確的結果，及適當種類非離子性界面活性劑(如 Brij® 35)之濃度保持固定。

本發明發展試劑組合物和過氧化酶改良方法之另一目標是簡化自動化分析系統的設計，方式為減少目前用於進行過氧化酶方法和其他自動化血液學分析方法之不同種類潤洗液的數目。若能發展和發現一種潤洗試劑可和許多不同血液分析方法和自動化系統相容，則系統設計終將更為簡單和經濟。

雖然最簡單的潤洗組合物可調配成不含溶血性、非離子性界面活性劑，如 Brij® 35，但是亦發現任何"不含 Brij® 35"之潤洗溶液在用於過氧化酶方法中時，仍為無法接受的。例如，只含 SDS 之水性潤洗溶液在用於此方法中時，被測試為無法接受的，因為 SDS 在低溫下會結晶。此種 SDS 之現象阻礙其於水性潤洗組合物中之用途和適當性，水性潤洗組合物必須能貯存長期，而對其成份或於潤洗試劑組合物或此方法潤洗循環中之操作性無不良影響。因此，必需發現和發明可接受的潤洗試劑配方。所以本發明的一方面是一種水性潤洗組合物配方，其只含非溶血性界面活性劑 Pluronic，供 Px 方法中之新穎用途。

如下文和實例所詳述，使用改良、含雙重界面活性劑之 Px R1 試劑組合物，以及進行潤洗循環時所用的適當潤洗溶液，造成改良的過氧化酶方法，其對所分析的新鮮和陳化血樣都能提供可接受的結果。相對地，用習知 R1 試劑組

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (19)

合物(即其配方不含非離子性界面活性劑，如Brij[®] 35)所進行的現行Px方法，當分析陳化血樣時，造成無法接受的結果，其有高度的原點雜訊。已注意到的是，用於新穎Px R1試劑組合物中之非離子性界面活性劑的濃度1和現行過氧化酶方法中所發現因潤洗攜移而帶入R1相中之非離子性界面活性劑Brij[®] 35的濃度，相當接近。

根據本發明之改良Px方法，頃發現陳化血樣細胞圖原點雜訊可接受程度為Px R1反應混合物中所含適當非離子性界面活性劑如Brij[®] 35之函數(圖1A-1D和3A-3D)。亦發現當潤洗溶液不含溶解性界面活性劑(或含適當非溶血性界面活性劑如Pluronic)時，可在白血球差式計數之過氧化酶方法中，由陳化血樣得到有用之結果，並有助於使原點雜訊在可接受的程度。

新穎R1試劑組合物有多項優點，利於使過氧化酶方法產生成功的功效和結果。例如先前所述，水性R1試劑組合物係調配成兼含非離子性界面活性劑和離子性界面活性劑，其濃度足以溶解紅血球，但對樣本中白血球族群之分析無不良影響。用於改良的白血球差式方法中之潤洗溶液最好含有一種非溶血性界面活性劑，其不同於過氧化酶改良方法中用來增進新穎R1稀釋劑的操作性之界面活性劑。合併使用R1稀釋試劑和上述潤洗試劑於過氧化酶方法中，可使其不受潤洗攜移所造成的活性界面活性劑轉移效應之影響。因此，雖然無法完全除去或減輕潤洗攜移，但使用不含非離子性溶血性界面活性劑(如Brij[®] 35)之潤洗液可除去此

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(20)

方法進行中潤洗攜移造成的負面或不良影響，並避免潤洗攜移造成的系統內變異。再者，本發明新穎試劑溶液，如前述係調配成含二種界面活性劑，可成功地保持差式分析之精確性，且當分析貯存在室溫和低溫下至少約48小時之陳化血樣時，亦可達到可接受程度之原點雜訊。

根據本發明，改良和新穎之R1試劑組合物最好是水性的，含有二種溶解性成份，其為不同類的界面活性劑：至少一種非離子性界面活性劑，如長鏈烷基醚聚乙氧酸酯，如聚氧乙烯(2-20)十二基、十六基、十四基、十八基和十八烯基醚，如Brij[®] 35，調製為和至少一種離子性界面活性劑合併，最好的一類是具約10至約16碳原子之硫酸烷酯之鹼金屬鹽，如硫酸十二酯鈉(SDS)。可用於Px R1試劑組合物中之適當離子性界面活性劑亦包括兩性磺基甜菜鹼一類，具有約10至約16碳原子之直鏈烷基，如十四烷基二甲基胺基丙基磺酸酯或TDAPS及癸基二甲基胺基丙烷磺酸酯或DDAPS。本發明Px R1試劑混合物中所含界面活性劑之組合作用和適當濃度，造成本文所述之適當紅血球溶解，及被溶解紅血球之血紅素內容物流出和喪失。

改良之Px試劑組合物亦包括固定劑或交聯成份(如甲醛或三聚甲醛)、糖或糖醇、緩衝劑或緩衝劑混合物以保持試劑在中性或近中性pH範圍、一種或多種無機鹽及視需要加入多價金屬離子之嵌合劑。改良試劑組合物和方法的所有成份，包括反應R1溶解相之溫度和反應時間，均被平衡和最適化以達到此方法之改良結果。本發明所造成之改良可提

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (21)

高此方法結果之臨床實用性。

用於過氧化酶方法 R1 (相中之新穎、含雙重界面活性劑之試劑組合物為穩定的，且具有長久之擱置壽命，例如，為測試試劑組合物之長期耐久性，乃在 60°C 下製備新穎 R1 試劑組合物，並貯存 30 天 (即在加速安定性試驗之條件下，對熟習此項技藝者而言，此試劑終將在室溫 (即約 22-30°C) 下安定歷一年或更久)。當使用此 "長期" 保存之試劑於過氧化酶方法中時，所得結果仍為可接受而有用的。

在發展和調製本發明試劑組合物時，製備試驗試劑，及用第一天和第二天血樣來測試，特別是該等在室溫下陳化的血樣。

用來評估本發明 R1 試劑組合物中非離子性界面活性劑 (特別是聚乙氧酸酯) 之適當性的化學參數已知為親水性親脂性平衡或 HLB 值 (HLB 值和化學式，參見 Encyclopedia of Surfactants, compiled by Michael and Irene Ash, Chemical Publishing Company, New York, New York, 1980; 及 McCutcheon's Emulsifiers and Detergents, McCutcheon Division, MC Publishing Company, Glen Rock, New Jersey, 1987)。界面活性劑之性質和 HLB 值相關。因此，根據本發明，特定界面活性劑之 HLB 值可作為該界面活性劑是否適合作為本發明試劑組合物成份之有用指標。特定言之，下列所述之適當 HLB 值表示該界面活性劑可用來改良在室溫下貯存至少二天之全血樣的分析和差式計數結果。

根據本發明之另一方面，一試劑組合物所含非離子性界

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(22)

面活性劑具有HLB大於約17.3至17.5，表示其親水性太大，不適合改良此方法之功效。適用於本發明試劑組合物中之界面活性劑的HLB值在約8.9至約17.5之範圍內，較佳約9.3至約17.3，及更佳約9.5或9.6至約16.9。理想上，本發明試劑組合物中之界面活性劑需能應用在油於水中之乳化作用上，其中水不溶性油(即來自細胞膜之脂肪)係被存在於水性溶劑中之界面活性劑微粒體(Micelles)"溶解"。在水溶液中，微粒體是橢圓形或球形，為界面活性劑分子群(如含約100個分子)，其中極性基團面向水溶劑，而疏水性核心則位在內部(M. J. Rosen, 1978, "Surfactant and Interfacial Phenomena", Wiley and Sons Interscience Publications, New York, New York)。HLB值為約9.5至約17.5表示於此種油在水中之乳化作用中之實用性。如前述，HLB值高於約17.3至17.5，更特定言之，為17.3時，不能改良此方法之功效。表9和10呈現本發明白血球差式方法之結果，其係用各種不同之非離子性界面活性劑於自動化分析儀上進行(見實例7)。同樣地，HLB值小於約9.3之界面活性劑通常亦不適用於此方法。

就具約10至約16碳原子之硫酸烷酯之鹼金屬鹽一類的離子性界面活性劑而言，本發明R1試劑組合物之較佳鹼金屬離子為鈉、鉀和鋰。更佳者為硫酸十二酯鹼金屬鹽，最佳者為硫酸十二酯鈉。陰離子性界面活性劑之適用濃度範圍之例子為約0.030克/升至約0.150克/升，較佳為約0.050克/升至約0.125克/升，及更佳為約0.085克/升至約0.105克/

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (23)

升。具約10至約18碳原子之陰離子烷基苯磺酸鈉亦適用。亦適用於本發明中之其他陰離子界面活性劑實例為N-鹽基-正-烷基牛胺磺酸酯(例如 $R-C(O)N(R')CH_2CH_2SO_3^-M^+$ ，其中 $R=C_{10}H_{23}-C_{14}H_{29}$ ； $R'=CH_3$ 或 H ；及 $M^+=Li^+$ ， Na^+ 或 K^+)。再者，兩性離子性界面活性劑適合用於本發明，如磺基甜菜鹼族之成員，其亦包括同源 C_{16} 和 C_{12} 成員，如TDAPS(十四基二甲基胺基丙烷磺酸酯)。其他可用於本發明中之兩性離子性界面活性劑的例子有膽酸衍生物，如CHAPSO(3-[(3-氯鹽胺丙基)二甲基胺基]-2-羥基-1-丙烷磺酸酯，及具有約12至16碳原子之烷基-N，N-二甲基N-氧化物，亦稱為N-氧化物。N-氧化物之一個特例(但非限於此)為十二基二甲基胺N-氧化物(LO)等。和TDAPS相似但具有較少碳原子之界面活性劑，例如 C_{12} 者如DDAPS(N-十二基-N，N-二甲基-3-胺基-1-丙烷磺酸酯)亦可用於本發明過氧化酶方法和試劑中。

適合用於本發明試劑組合物之非離子性界面活性劑家族為(1)聚氧乙烯烷基或芳基醚(亦稱為聚乙氧酸酯)，包括直鏈脂族疏水性經醚化為聚乙二醇或聚氧乙烯醇，如Brij[®]35；(2)支鏈脂族/芳族(如辛基苯酚)疏水物經醚化為聚乙二醇，如Triton X[®]-100；(3)直鏈脂族/芳族(如正-壬基苯酚)疏水物經醚化為聚乙二醇，如Igepal[®]C0897；及(4)直鏈脂族(如羧酸)疏水物經酯化為聚乙二醇，如Myrj[®]53。在此四家族中，酯類在水溶液中會水解，且預期比醚類界面活性劑不穩定一些。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(24)

第一族非離子性界面活性劑之例子包括(但不限於此):(聚氧乙烯(4)十二基醚(Brij®30);聚氧乙烯(23)十二基醚(Brij®35);聚氧乙烯(2)十六基醚(Brij®52);聚氧乙烯(20)十六基醚(Brij®58);聚氧乙烯(2)十八基醚(Brij®72);聚氧乙烯(10)十八基醚(Brij®76);聚氧乙烯(20)十八基醚(Brij®78);聚氧乙烯(2)十八烯基醚(Brij®92);聚氧乙烯(10)十八烯基醚(Brij®96);及聚氧乙烯(20)十八烯基醚(Brij®98);聚氧乙烯(21)十八基醚(Brij®721);聚氧乙烯(1000)十八基醚(Brij®700))。在Brij®界面活性劑中,最佳者為Brij®35。需注意的是,雖然聚氧乙烯十八烯基醚可用於本發明組合物中,其在長期貯存中可能較不穩定,因其分子結構中存在有雙鍵,使其易氧化。熟習此項技術者亦知,最適合的非離子性界面活性劑為HLB值在本發明所述範圍中者。第二族非離子性界面活性劑之其他非限制性例子包括Triton X®-100(非還原或還原的), Triton X®-114(非還原或還原的), Triton X®-165及Triton X®-305(非還原或還原的)。非離子性界面活性劑存在本發明試劑組合物中之濃度必須為由約0.10克/升至約0.20克/升;更佳之濃度範圍為由約0.10克/升至約0.16克/升;及最佳之濃度範圍為由約0.12克/升至約0.14克/升。

組合物中之糖或糖醇包括蔗糖、果糖、葡萄糖、葡萄糖醇和甘露糖醇。本發明試劑組合物中所用之較佳糖類為葡萄糖。然而,更佳者為糖醇,如葡萄糖醇。糖醇提供長時間中更穩定的試劑溶液,因為糖醇不會在空氣中被氧化。理想上,糖和糖醇存在於試劑組合物中之濃度為約110.0

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (25)

克/升至約120.0克/升，更佳為113.0克/升。若使用葡萄糖以外之糖或葡萄糖醇以外的糖醇，用量必須調整到使替代性糖或糖醇之存在濃度(克/升)約與葡萄糖或葡萄糖醇相同。試劑溶液中存在有糖或糖醇可增加淋巴球在雜訊(即紅血球虛體和血小板)以上之可偵測性。可使用糖或糖醇，視分析之本質和需要而定。

本發明試劑溶液中所用之甲醛或三聚甲醛是做為白血球固定劑(化學交聯化合物)。若使用甲醛，其在溶液中之存在量為約50克/升至約60克/升。更佳地，甲醛的存在濃度為約52克/升至約58克/升。

當使用糖醇時，與使用還原糖如葡萄糖相較，試劑溶液具有增高的穩定性，此乃關於葡萄糖(但糖醇則無)會隨時間而在空氣中氧化或葡萄糖酸。參見例如 Nishikido et al., Jap. Kokai Tokyo Koho 80 40, 606, Chem. Abs., 93:22120d, (1950)和美國專利第4,801,549號。葡糖酸之存在會降低溶液之pH值。當pH降至本發明範圍以外時，如本發明中所論及，本發明將受到樣本中未溶解之紅血球所干擾。此外，無法在空氣中氧化之糖醇，可和甲醛化學結合以形成聚縮醛，因而阻止甲醛氧化成甲酸，其若產生，亦會降低試劑溶液之pH(美國專利第4,801,549號)。

試劑溶液中亦可加入無機鹽。適用於本發明之鹽可為鹼金屬氯化鹽類，如NaCl, KCl和LiCl。氯化鈉NaCl是較佳的鹽。此等鹽類可選擇性地存在，因其有助於區辨嗜中性球和嗜酸性球，係利用光掃描/吸收光學來造成過氧化酶染色

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (26)

強度之差異而達成。其他鹵鹽(即氟化物、溴化物和碘化物)過度抑制嗜中性球之過氧化酶活性，因而阻礙了嗜中性球和其他未染色白血球(WBCs)之區辨。當使用鹽類(如NaCl)時，其存在量較佳為約6.8 mM至約10.3 mM(或約0.4克/升至約0.6克/升)。

可用於本發明之緩衝劑或緩衝劑混合物必須能維持試劑溶液pH在約6.8至約8.0，較佳為約6.9至約7.6，更佳為約7.0至約7.3。當pH太低，即低於約6.8時，細胞圖中可觀察到紅血球之干擾。適當的緩衝劑包括磷酸鈉或鉀鹽，丙二酸二乙酯，3-(N-嗎啉基)丙烷磺酸，(MOPS)，N-2-乙醯胺-2-胺基乙烷磺酸(ACES)和4-(2-羥乙基)-1-六氫吡啶-乙烷磺酸(HEPES)。較佳者為 Na_2HPO_4 (磷酸鈉，單鹼基)和 NaH_2PO_4 (磷酸鈉，二鹼基)之混合物。如所示，緩衝劑存在本發明試劑溶液中之量需適合維持溶液pH在大約中性。例如，當使用 Na_2HPO_4 和 NaH_2PO_4 之混合物時，該混合物須含有 Na_2HPO_4 對 NaH_2PO_4 莫耳比例在約2.04:1至約0.81:1，以產生pH範圍在約6.9至約7.6之一系列溶液，較佳由約7.0至7.3。本發明試劑溶液中之此種混合物的緩衝劑濃度係由約75 mM至約125 mM。高於約125 mM可能會造成所得細胞圖中之紅血球干擾。

可用於實施本發明之試劑溶液是一種水溶液，較佳是用去離子水。溶液製法是將成份與水合併。需密切注意溶液pH以確保其維持在所欲範圍內。若需要，熟習此項技術者亦可於試劑溶液中加入其他添加物。特別是金屬螯合劑，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(27)

例如伸乙二胺四乙酸(EDTA)和伸乙基雙-(氧伸乙基次氣基)-四乙酸(EGTA)二鈉或三鈉鹽(EDTA)可包括於試劑組合物中，濃度為約1 mM至約5 mM，以保護組合物中其他成份免於多價金屬離子催化性之自動氧化作用。除EDTA以外，EDTA或EGTA之二鈉、三鈉和四鈉可用於組合物中，較佳為EDTA二鈉之二水合物。例如，甲醛、葡萄糖醇、SDS和Brij® 35均對自動氧化作用敏感。多價金屬離子催化劑，如 Cu^{+2} 和 Fe^{+3} ，常以ppb濃度存在於水中，水是用作為調配用溶劑("Polymer Stabilization", 1972, Ed., W.L. Hawkins, Wiley-Interscience, New York, New York)。

不適用於過氧化酶方法R1相之試劑組合物的共同模式特徵實例如下：原點雜訊百分比高於33；人為提高白血球計數；及扭曲之嗜中性球百分比和淋巴球百分比。基於對許多含各種不同界面活性劑之試劑配方的測試，以及評估其對新鮮和陳化血樣之功效，乃決定出了本發明改良試劑組合物和方法之適當成份。

表1提供了本發明含雙重界面活性劑之水性試劑組合物中之較佳成份和最適濃度和濃度範圍的一個例子。熟習此項技術者需知，所列各試劑成份之濃度和範圍可有約±5%至10%之偏差，而不會對組合物或其於方法中之用途有不利影響。此外，對表1所列之新穎Px R1試劑組合物之各成份而言，每升之較佳含量示於括弧中，但不限制其範圍。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(28)

表1

成份	含量/升
非離子性界面活性劑(如 Brij®35)	0.10克-0.20克 (0.12-0.14克)
離子性界面活性劑(如硫酸十二 酯鈉, SDS或TDAPS)	0.085克-0.115克 (0.105克)
糖或糖醇(如葡萄糖醇)	110克-120克 (113.0克)
磷酸鈉, 單鹼基	1.98克-2.18克 (2.08克)
磷酸鈉, 雙鹼基	11.30克-12.5克 (11.89克)
無機鹽(如, NaCl, KCl, LiCl)	0.4克-0.6克 (0.488克)
金屬離子螯合劑(如EDTA; EFTA; 或 EDTA或EGTA之二、三或四鈉鹽)	0.675克-0.825克 (0.750克)
固定劑(如甲醛37 g/dL)	50克-60克 (150毫升)
去離子水, 調至pH	100升 6.9-7.6 (7.0-7.5)

本發明另一方面關於過氧化酶方法分析結果之進一步改良, 其乃併入一個潤洗循環及使用適當水性潤洗試劑組合物於該方法中之結果。用於改良方法潤洗循環中之潤洗試

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明(29)

劑對半-和全-自動化系統特別有利和有用，特別是 TECHNICON H●1TM，H●2TM和H●3TM系統等，其可快速進行白血球差式計數之過氧化酶方法。本發明潤洗試劑描述於同在申請中之美國專利申請序號08/442,363中，於1995年5月16日提出申請，名稱爲"可用於全血樣血液學分析之通用潤洗試劑組合物"，讓與給本發明之受讓人。

可用於改良白血球差式計數方法中之潤洗試劑組合物包括一或多種緩衝劑或化合物或其混合物，例如，單鹼基磷酸鈉和雙鹼基磷酸鈉，以使pH和滲透性接近生理值，例如，pH爲約6.9至約7.6，較佳pH爲約7.0至約7.3，及滲透性值約300 mOsmol/kg;抗菌化合物以阻滯微生物生長；非溶血性界面活性劑，如Pluronics，如P84, P85, P104, P104, P105和P123 (P105爲較佳，因在潤洗溶液中之用量時爲非溶解性，其分子量約6500，及包括以重量計約50%聚氧乙烯)；鹼金屬氯化鹽類，如NaCl, KCl, LiCl等。適當抗菌劑之非限制性例子有Proclin 150 (2-甲基-4-異噻唑啉-3-酮)和Proclin 300 (5-氯-2-甲基-4-異噻唑啉-3-酮)(Rohm & Haas); Germall 115 (N, N'-亞甲基雙[N'-(1-羥甲基)-2, 5-二氧-4-四氫咪唑基]脲)(Sutton Laboratories); Dowacil 200 (1-(3-氯丙烯基)-3, 5, 7-三氯-1-氮鎗金鋼烷氯化物)(Dow Chemical); 及Bronopol (Angus Chemical Company)。Proclin 150是用於潤洗組合物中之較佳者。

亦可使用水溶性抗氧化劑化合物以穩定潤洗試劑組合物中之非溶血性界面活性劑，抗氧化劑化合物的例子有3，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (30)

3'-硫二丙酸; 3, 3'-二硫乙酸; Trolox[®] (即水溶性維生素 E, 赫夫孟拉羅); BHT, 丁基化羥甲苯或(2, 6-二第三丁基-4-甲基苯酚); BHA, 丁基化羥基苯甲醚或(2-第三丁基-4-甲氧基苯酚); 及MEHQ(ρ -甲氧基苯酚); 或其混合物。3, 3'-硫二丙酸為用於組合物中之較佳者。潤洗溶液之最終滲透性為約285 mOsm/kg至約305 mOsm/kg。

在最簡單的配方中, 潤洗試劑可包括磷酸緩衝劑(如磷酸緩衝食鹽水, pH為約6.8至7.8)及Pluronic族或類之非離子性和非溶血性界面活性劑。Pluronic為聚氧乙烯和聚氧丙烯之嵌段共聚物, 其結構為(EO)_x-(PO)_y-(EO)_x(見 Pluronic & Tetronic Surfactants, BASF Corporation, Parsippany, New Jersey, 1987), 其係用環氧丙烷之控制聚合作用合成聚丙二醇單元而形成。由於Pluronic之分子量可由約950至約14600克/莫耳, 及(PO)可包括以重量計約20至90%, 所以"y"可在約3至62單元之範圍內。接著, EO聚合鏈在聚(PO)單元之二邊形成, 產生Pluronic共聚物。此技術領域中之人士知道, EO聚合作用可對稱控制, 所以"x"在Pluronic分子之各邊或各端大致相等。可用於通用潤洗組合物中之適當Pluronic的"x"和"y"非限制性例子如下:"x"為約1至36單元, 更佳為約7至27, 及"y"較佳約14至48單元。

適用於潤洗試劑中之Pluronic具有%EO值以重量計為約20至80%, 分子量為約2000至約8000克/莫耳。更佳地, %EO以重量計在約30至70%範圍內, 分子量在約3000至約7000範圍內。例如, Pluronic P105和P85具有%EO值以重量計為約50%, 及Pluronic P104和P84具有%EO值以重

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (31)

量計為約50%，及Pluronic P104和P84具有%EO值以重量計為約40%。

表2列出潤洗試劑之實例配方，可用於進一步改良過氧化酶方法，其包括較佳量之各成份，以使最終試劑溶液有適當且可操作的pH和滲透性。熟習此項技術者可知，所列各潤洗溶液成份之濃度和範圍可有約5%至10%之偏差，而對組合物或其於改良方法中之用途無不良影響。此外，如前述，對表2所列潤洗試劑組合物之各成份而言，每升之較佳含量列於括弧中，但非欲限制其範圍。

表2

成份	含量/升
抗菌化合物 (如 Proclin 150)	0.25 毫升-0.60 毫升 (0.40 毫升)
非溶血性非離子性界面活性劑 (如 Pluronic P105)	0.50 克-1.5 克 (1.00 克)
磷酸鈉，單鹼基	0.285 克-0.315 克 (0.300 克)
磷酸鈉，雙鹼基	2.28 克-2.52 克 (2.40 克)
無機鹽 (如 NaCl, KCl, 或 LiCl)	7.40 克-8.0 克 (7.70 克)
如抗氧化劑化合物 (如 3, 3'-硫二丙酸)	0.050 克-0.150 克 (0.100 克)
去離子水調至	1.00 升
pH	6.9-7.5 (7.0-7.3)
滲透性(mOsmol/kg)	≈285-305 mOsm (300 mOsm)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (32)

在亦使用潤洗循環之Px方法中，改良試劑之一個顯著優點是本發明試劑組合物經設計和最適化，以除去易變潤洗攜移所造成之不良影響，其中潤洗的界面活性劑成份在此方法中扮演所不欲及無法接受之功能性角色。此試劑配方和方法亦允許用陳化血樣而測定白血球差式計數，其已在室溫下貯存高達2天，並不會因原點雜訊而犧牲結果之精密性、準確性和可信度。此外，使用本發明試劑組合物連同本發明潤洗溶液配方時，該潤洗溶液不參與差式計數方法之過氧化酶化學中。

在實行本發明所涵蓋的方法時，試劑溶液很快地和待分析之樣本混合形成此方法R1相之反應混合物。試劑溶液和血樣互相接觸後之約5秒內，必須產生均勻之混合物。若此二者並未快速和均勻地混合，則會發生紅血球不均勻程度之固定，其會阻礙紅血球溶解，因而大幅影響此方法實行時所得差式WBC計數之精確性。

混合時，試劑溶液和血樣約略高室溫(如約5°C)。然後將反應混合物(包括血樣)快速加熱至約62°C至約76°C，理想約70°C至約75°C，較佳係藉注入溫度維持在適當高溫下之自動化血液學分析儀適當槽室中而加熱。反應混合物之加熱必須在約15秒內發生，較佳約在20秒內，否則會發生紅血球固定；固定的紅血球不會溶解，且會被誤測為淋巴球，因而干擾差式WBC計數之精確性。

隨後立即將染色混合物與該反應混合物相混合，該染色

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(33)

混合物包括過氧化氫和適當色原質，如4-氯-1-萘酚。染色混合物之起始溫度可為室溫，且理想上(但非必要)，染色混合物和反應混合物相混合後，其溫度在約30秒內(較佳由約8至約15秒內)由約62°C增加至約72°C(較佳由約65°C至約70°C)，以染色具過氧化酶活性之嗜中性球、單核球和嗜酸性球。

實務上，反應可以如下方式進行：自動化血液學分析儀反應室保持在溫度約72°C。在室溫下，將12.0微升全血和2.50微升本發明R1試劑組合物同時注入系統中，快速混合二者以形成反應混合物，然後培育最多不超過約30秒，較佳約16秒，在此期間，混合物溫度由約62°C升高至約72°C。在培育期間末了，紅血球以最佳狀況溶解，及白血球被固定(即交聯)。

隨後立即同時注入125微升色原質混合物(例如，70克/升於氧二乙醇中之4-氯-1-萘酚)和250微升含3.0克/升過氧化氫之過氧化氫溶液。二試劑最初為室溫，但因反應室中之溫度，染色混合物之溫度在約30秒內由約63°C升至約69°C，此時，嗜中性球和嗜酸性球之過氧化酶染色完成。以所揭示之潤洗溶液潤洗反應室及系統硬體，以減輕試劑和溶液由一樣本分析循環攜移至下一循環，並避免反應室中污染試劑之存在所造成之偏斜結果。關於自動化反應步驟之進一步詳情描述於實例6。

雖然本發明試劑組合物和步驟係用自動化儀器來說明，熟習此項技術者很明白的是，本發明亦適用於手控方式，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (34)

以及手控制方法和半-自動化或全-自動化方法之結合。再者，本發明試劑組合物和步驟係用全血來作差式WBC計數。熟習此項技術者應知，本發明亦可用於血球的貯存校正劑、對照劑及其他溶液，其乃特別製備的或市售來校正及維持裝置精密度的。"樣本"一詞若未特別修飾，在本文中係包括全血或其他含血球之溶液。

實例

下列實例說明本發明。其係供進一步輔助了解本發明之觀念，而非被解釋為限制本發明。

實例 1

只含離子性界面活性劑不含非離子性界面活性劑(如只含 SDS，不含Brij® 35)之過氧化酶 R1 稀釋劑試劑組合物之調製和測試

設計和進行一些實驗，以測定用於過氧化酶 R1 相中之過氧化酶稀釋溶液的最佳配方。

最初研究可接受和可操作的 R1 組合物或稀釋劑之調製時，乃涉及製備和測試在試劑組合物中只含離子性界面活性劑(即陰離子性界面活性劑 SDS)而無非離子性界面活性劑(即 Brij® 35)之試劑溶液。R1 試劑溶液乃基於將 SDS 濃度由約 0.105 克/升增加至約 0.17 至 0.20 克/升而製備。完成數項研究以分析該等含高量 SDS 之"測試"試劑在自動化系統上之功效，每小時通過 102 和 120 個樣本。

特定言之，使用自動化血液學分析儀，製備含 0.16 至 0.20 克/升 SDS(如 0.16, 0.17, 0.18, 0.19 和 0.20 克/升)之測

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (35)

試R1試劑溶液，以所示方式對第1天和第2天血樣作測試。該SDS測試R1稀釋劑不含Brij® 35(如0.0克/升)。用於此等實驗分析中之血樣乃在K₃EDTA存在下，收集於Vacutainer™管中。此外，在進行該等測試時，用於潤洗循環中之潤洗溶液不含Brij® 35。亦使用含非溶血性界面活性劑Pluronic P105之潤洗溶液。該等分析之結果示於表3中，顯示對第2天血樣而言，所有測試試劑均得無法接受之結果。將%嗜中性球和%淋巴球參數之數據和標準方法比較，標準方法中，潤洗溶液含Brij® 35濃度為3.0克/升，及SDS濃度為2.0克/升。對第2天血樣而言，該2參數之回收接近在0.20克/升SDS之標準。然而，當使用SDS之濃度在0.16-0.19克/升間時，精確度不佳，因為Px方法有無法接受之原點雜訊。有注意到特定樣本重覆測試間有巨大差異。

如圖1A-1D所示，當使用含SDS(0.105克/升)不含Brij® 35之標準過氧化酶試劑溶液於過氧化酶方法中分析第1天血樣，且包括一個潤洗循環，使用含Brij® 35 3.0克/升及SDS 2.0克/升之潤洗溶液，則細胞圖無擴散現象，有清楚分離之細胞族群和最小之原點雜訊(見圖1A)。圖1B顯示使用與圖1A結果所述之相同Px R1試劑溶液和潤洗溶液來分析第2天血樣之結果。然而，相對於圖1A之結果，第2天血樣之細胞圖顯示有細胞族群間之擴散及較高之原點雜訊。圖1C顯示以第2天血樣分析之結果，使用只含離子性界面活性劑(以0.105克/升SDS之形式)之R1測試試劑溶液，且包括一個潤洗循環，所使用之潤洗試劑溶液含有非溶血性界面活

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明 (36)

性劑 Pluronic P105 於磷酸緩衝食鹽水中 (無 Brij[®] 35 , 亦無 SDS) 。圖 1C 細胞圖結果顯示有無法接受之原點雜訊。使用含較高量離子性界面活性劑 (即 0.17 克 / 升 SDS) 和無 Brij[®] 之測試試劑溶液及使用與圖 1C 所述相同之潤洗溶液來分析第 2 天血樣 (見圖 1D) 時 , 亦得到無法接受之原點雜訊的相同問題。因此 , 乃作出結論 , 只含離子性界面活性劑 (如陰離子性界面活性劑 SDS) 之過氧化酶 R1 組合物和 " 無 Brij[®] " 潤洗合併使用於白血球差式方法中時 , 並非最佳狀況。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (37)

樣本 編號	標準方法		參考		第 2 天， 標準		第 2 天， 0.16		第 2 天， 0.17		第 2 天， 0.18		第 2 天， 0.19		第 2 天， 0.20	
	%N	%L	%N	%L	%N	%L	%N	%L	%N	%L	%N	%L	%N	%L	%N	%L
1a	61.0	31.6	58.6	30.8	49.8	41.6	51.3	39.5	54.4	35.0	57.6	32.6	57.9	31.8		
1b	57.1	31.1	58.5	30.5	48.6	43.3	51.1	39.3	52.5	38.7	56.0	34.0	59.8	30.7		
2a	69.0	19.4	68.5	19.1	71.2	20.1	72.0	18.8	73.0	14.8	68.3	22.1	67.9	21.7		
2b	69.3	19.5	69.7	19.3	72.5	18.1	69.1	19.5	73.2	14.2	73.0	17.5	74.6	14.9		
3a	59.4	26.4	61.3	25.2	49.9	40.8	53.9	35.9	59.9	28.5	60.4	28.5	63.8	25.6		
3b	59.8	26.5	62.4	26.2	54.6	35.2	57.2	30.7	59.1	30.0	58.8	29.6	60.7	26.5		
4a	60.8	29.4	60.9	28.6	46.7	43.7	50.7	41.6	50.4	39.2	59.4	33.0	58.4	31.4		
4b	60.2	28.8	60.8	29.1	38.2	53.0	48.1	41.9	53.4	38.1	57.3	34.0	53.8	35.9		
5a	58.8	27.9	60.9	26.8	46.9	43.8	56.0	34.4	52.2	35.8	56.1	34.2	59.3	29.3		
5b	59.5	28.0	61.4	25.5	46.6	43.3	52.5	37.2	54.9	33.9	56.4	33.9	61.2	28.1		
6a	64.1	26.0	64.0	26.1	57.0	34.1	60.5	31.2	61.0	29.0	65.0	24.7	62.3	27.3		
6b	62.0	25.8	64.5	24.8	53.5	39.8	58.8	30.2	59.1	32.5	61.4	29.0	60.0	30.7		
7a	61.4	25.4	61.6	26.0	38.6	51.6	70.9	15.2	44.4	43.7	54.2	35.3	57.4	32.0		

表 3:
以第 1 天和第 2 天血樣(陳化和貯存於室溫下)測得之%嗜中性球(Neut)
和%淋巴球(Lymph)

五、發明說明 (38)

樣本 編號	標準方法		參考		第 2 天, 0.16		第 2 天, 0.17		第 2 天, 0.18		第 2 天, 0.19		第 2 天, 0.20	
	%N	%L	%N	%L	%N	%L	%N	%L	%N	%L	%N	%L	%N	%L
7b	60.2	26.2	61.9	25.0	65.1	15.6	45.7	44.9	67.8	14.4	57.0	31.1	56.6	31.4
8a	59.8	26.5	64.0	24.9	43.2	48.1	48.5	43.2	54.5	35.4	52.1	39.4	58.4	30.9
8b	60.4	26.9	64.6	25.2	41.6	49.8	46.0	44.2	51.1	40.3	53.8	37.2	58.0	30.6
9a	58.2	28.5	59.7	29.6	68.9	18.8	51.6	0.6	62.3	26.0	58.4	31.1	55.3	35.9
9b	60.1	28.4	58.2	29.8	65.6	21.0	52.8	37.6	52.8	35.8	55.6	30.3	58.9	31.0
10a	59.3	27.1	64.7	25.3	54.5	35.8	58.1	33.3	58.5	32.0	63.7	27.2	60.6	30.7
10b	59.0	26.3	61.3	26.7	49.8	41.0	58.5	32.6	60.8	30.8	61.3	28.8	61.6	27.6
平均值	61.0	26.8	62.4	26.2	53.1	36.9	55.7	32.6	57.8	31.4	59.3	30.7	60.3	29.2

以第 1 天和第 2 天血樣(陳化和貯存於室溫下)測得之%嗜中性球 (Neut)和%淋巴球(Lymph)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (39)

%N:樣本中之嗜中性球百分比;%L:樣本中之淋巴球百分比

*標準表示一個標準或對照R1稀釋劑，含0.105克/升SDS且無非離子性界面活性劑，及一個潤洗循環及含3.0克/升Brij® 35和2.0克/升SDS之溶液。

*第2天表示血樣在室溫下約36-48小時後進行分析。

**0.16, 0.17, 0.18, 0.19和0.20為SDS在測試過氧化酶R1試劑溶液中之存在濃度(克/升)。潤洗液含1.0克/升Pluronic P105於磷酸緩衝食鹽水(PBS)中。

樣本組為10個非醫院血液，二重覆分析。來自相同提供者組之管子貯存在室溫下24小時，然後作為第2天樣本加以分析。

實例2

只含非離子性界面活性劑不含離子性界面活性劑(如只含Brij® 35，不含SDS)之過氧化酶R1稀釋試劑組合物之調配和測試

除了測試R1試劑組合物以如實例1所述調配成只含SDS而不含非離子性界面活性劑，亦設計試劑組合物以測試只存在有非離子性界面活性劑(即Brij® 35)而無離子性界面活性劑(如陰離子性界面活性劑SDS)的情形。因此，製備和分析數種測試R1稀釋試劑組合物，其含Brij® 35濃度為0.0克/升，0.14克/升，0.28克/升和0.42克/升。為測試分析只含Brij® 35之R1稀釋溶液，用於潤洗循環之潤洗溶液含非溶血性界面活性劑Pluronic P105，如用於實例1分析中者。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (40)

含Brij® 35之各種不同R1測試溶液調製如下:30.0克/升之Brij® 35貯存溶液製備於蒸餾水中。於50毫升小份之過氧化酶R1組合物(無非離子性界面活性劑)中,加入下列體積之Brij® 35貯存溶液:0.0毫升Brij® 35貯存溶液以製備含Brij® 35最終濃度為0.0克/升之R1稀釋劑;0.233毫升貯存溶液以製備含Brij® 35最終濃度為0.14克/升之R1稀釋劑;0.466毫升貯存溶液以製備含Brij® 35最終濃度為0.28克/升之R1稀釋劑;及0.699毫升貯存溶液以製備含Brij® 35最終濃度為0.42克/升之R1稀釋劑。將溶液混合及貯存在聚丙烯旋蓋試管中。

進行測試運轉時,正常血樣收集於Vacutainer™管中,並以K₃EDTA抗凝集。以開口管模式進行樣本分析。來自相同提供者組之未開口樣本貯存在室溫下過夜,並在第2天(即第2天樣本)作分析。在自動化血液學分析儀上以手控方式收集數據。標準運轉為102樣本/小時;測試運轉為(20樣本/小時。對含5對二重覆的運轉而言,標準偏差SD(多個提供者之合併SD)以下列方程式計算過氧化酶通道參數; $SD = [\text{Sum}(d^2)/2N]^{1/2}$,其中 α 為以特定一個試劑所得二重覆數值間的差異,及N為試驗中之樣本數。

表4列示由該等實驗所得之數字數據摘要。以測試試劑1-4進行過氧化酶方法R1之功效,和用標準R1試劑於過氧化酶方法中之功效(即含SDS濃度為0.105克/升之標準R1試劑)作比較。對第1天血樣分析而言測試試劑一般會產生無法接受之結果。對試劑1(即不含Brij®或SDS之過氧化酶R1

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (41)

試劑)而言，無法得到差式數據，此乃因未溶解紅血球之嚴重干擾。對測試 P_x R1 試劑 2 至 4 (即試劑 2: Brij[®] 35 濃度 = 0.14 而無 SDS; 試劑 3: Brij[®] 35 濃度 = 0.28 而無 SDS; 試劑 4: Brij[®] 35 濃度 = 0.42 克/升而無 SDS) 而言，與方法說明相較，有顯著數目之精密度和不準確性失誤 (以星號表示)。對試劑 1, 2 和 3 而言，雜訊百分比很高 (即 > 34%)。對第 2 天血樣用只含 Brij[®] 35 而無 SDS 之測試試劑，所得數字數據亦無法被接受。因此，數字數據顯示測試試劑組，包括含 Brij[®] 35 (0.14-0.42 克/升及無 SDS) 之過氧化酶方法 R1 試劑，得到無法接受之表現。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(42)

表4

含較高濃度 Brij® 35 且無 SDS 之過氧化酶 R1 試劑組合物分析

第1天樣本

試劑	WBCP	%Neut	%Ly	%M	%Eos	%LUC	%Nois
標準	5.27 0.017	56.9 0.75	28.5 0.34	8 0.74	3.7 0.38	2.1 0.29	23.71 0.6
1: 無 SDS 無 Brij®	15.25 0.545*	ND	ND	ND	ND	ND	89.5 0.43
2: 無 SDS Brij®:0.14 克/升	5.36 0.16	61.9* 1.65*	21.7* 1.45*	9.7* 0.82	3.7 0.4	2.1 0.28	47.7 1.44
3: 無 SDS Brij®:0.26 克/升	5.36 0.154	57.3 1.73*	28.6 1.66*	7.9 0.59	3.6 0.22	1.9 0.55*	34 2.66
4: 無 SDS Brij®:0.42 克/升	4.77 1.569*	53.2* 7.47*	27.3* 6.11*	10.1* 1.83*	3.5 0.57*	5.1* 2.52*	19.2 4.75
精密度說明	0.15	1	0.5	0.5	0.2	0.5	N/A
標準偏差說明	0.16	1.4	1.1	0.9	0.5	0.5	

第2天樣本

標準	5.19 0.081	60.6 1.43	27 0.82	7.2 0.49	2.6 0.61	1.8 0.29	29.8 3.66
1: 無 SDS 無 Brij®	ND	ND	ND	ND	ND	ND	60.1 5.77
2: 無 SDS Brij®:0.14 克/升	6.75 0.509	66.7 3.41	16.4 3.97	12.8 0.86	1.8 0.19	1.2 0.18	44.9 3.82

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (43)

3: 無 SDS	5.4	57.6	29	9.1	1.9	1.7	33.4
Brij®:0.26克/升	0.177	2.76	1.6	1.18	0.76	0.23	2
4: 無 SDS	5.27	55.4	26.7	10.7	1.6	4.6	15.2
Brij®:0.42克/升	0.25	2.57	1.96	1.15	0.28	2.61	2.93
陳化之 精密度說明	0.32	2.8	2.2	1.6	1	1	N/A

在表4中，星號表示數值超過用來進行此方法之自動化分析儀的精密度說明。"ND"表示未得到可接受之有用的數據。"WBCP"表示由過氧化酶方法測得之白血球數目；"%Neut"表示嗜中性球百分比；"%Ly"表示淋巴球百分比；"%M"表示單核球百分比；"%EOS"表示嗜酸性球百分比；"%LUC"表示大型未染色細胞百分比；及"%Nois"表示原點雜訊百分比。得自實例2所描述之第1天和第2天血樣分析之一組代表性細胞圖示於圖2A-2J。圖2A-2E代表第1天血樣分析。圖2F-J代表第2天血樣分析。如所述，血樣係取自含K₃EDTA之Vacutainer™管中。用於該等分析之試劑以如下方式對應於所得細胞圖：圖2A(第1天血樣)及圖2F(第2天血樣)：標準R1試劑包括0.12克/升Brij® 35和0.105克/升SDS；圖2B(第1天血樣)和圖2G(第2天血樣)：無SDS測試試劑1包括0.0克/升Brij® 35和0.0克/升SDS；圖2C(第1天血樣)和圖2H(第2天血樣)：無SDS之測試試劑2包括0.14克/升Brij® 35和0.0克/升SDS；圖2D(第1天血樣)和圖2I(第2天血樣)：無SDS之測試試劑3包括0.28克/升Brij® 35

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明 (44)

和 0.0 克 / 升 SDS ; 及圖 2E (第 1 天血樣) 和圖 2J (第 2 天血樣) : 無 SDS 之測試試劑 4 包括 0.42 克 / 升 Brij® 35 和 0.0 克 / 升 SDS 。

在第 1 天血樣之分析中，用含 Brij® 35 0.12 克 / 升和 SDS 0.105 克 / 升 Px R1 試劑組合物所得之細胞圖係可接受的。然而，當不存在 Brij® 35 和 SDS 時 (如試劑 1) ，此方法之結果很失敗，且無法得到差式計數資料：細胞圖顯示非常濃的雜訊區域，且偵測到極少白血球 (圖 2B) 。用試劑進行此方法之失敗可歸因於無界面活性劑，導致大量紅血球未溶解，其產生交聯而造成高量原點雜訊。高量原點雜訊的可能成因是明顯需要界面活性劑未增加血球對過氧化酶基質之滲透性；若無界面活性劑，可能會有效抑制白血球內發生的染色反應。

試劑 2 (圖 2C) ， 3 (圖 2D) 和 4 (圖 2E) 產生和試劑 1 大約相同無法接受之細胞圖結果。在該等例子中，細胞圖顯示無 " 界限 (valley) (即濃密區域間之清淅區域) 存在於淋巴球和雜訊之間，並顯示有擴散的細胞集團和寬廣的 " 樹幹 " (即粗糙垂直的柱形，其包括雜訊和淋巴球) 。當 Brij® 濃度增加時，樹幹的密度減少，但細胞族群之擴散增加。

大致而言，與新鮮血樣相較，第 2 天或陳化血樣之細胞圖顯得較差。以第 2 天血樣作分析時，細胞變得會漏，以致細胞圖所顯示之分離細胞族群變得更擴散。對嗜中性球更是如此。對第 1 天樣本而言，以試劑 1 所進行之方法並不成功 (圖 2G) 。當 Px R1 試劑溶液中之 Brij® 濃度增加時，樹幹密度

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (45)

傾向減少(圖2H-2J)。試劑2, 3和4在細胞圖中並未顯示界限, 且以試劑2(圖2H)和4(圖2J)所得之差式計數有嚴重扭曲。

該等實驗之結果顯示, 只含非離子性界面活性劑(即Brij® 35)濃度在0.14-0.42克/升而無SDS之測試過氧化酶R1試劑組合物, 當與潤洗循環中無Brij®之潤洗溶液共同使用時, 產生無法接受之數字數據和細胞圖。同樣地, 如實例1所述, 只含SDS(0.16-0.20克/升)而無Brij® 35之Px R1稀釋劑當與不含Brij®(如無Brij®之潤洗液)之潤洗溶液共同使用時, 亦非有效試劑。因此結論為在Px方法中, 含離子性界面活性劑或非離子性界面活性劑之Px R1稀釋劑無法提供可接受之結果。事實上, 為在此方法中達到精密而準確之結果, 本發現顯示離子性界面活性劑(如SDS)和非離子性界面活性劑(如Brij® 35)二者必須同時調配入Px R1試劑組合物中。本發明另提供一項知識和發現, 當與潤洗循環連合, 且所用潤洗溶液不含非離子性界面活性劑如Brij® 35時, 過氧化酶R1試劑組合物顯得特別重要, 下列實例3有進一步詳述。

實例3

兼含非離子性界面活性劑和離子性界面活性劑之過氧化酶R1稀釋試劑組合物之調配和測試

製備第3種R1試劑組合物以測試將非離子性界面活性劑和離子性界面活性劑調配於過氧化酶組合物和方法中。為調配合雙重界面活性劑之R1稀釋劑, 乃將濃度為0.080克/

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (46)

升，0.12克/升和0.16克/升之Brij® 35調入亦含SDS 0.105克/升之R1稀釋劑組合物中。使用含雙重界面活性劑之試劑組合物以測試第1天和第2天血樣，用白血球差式計數之過氧化酶方法來進行。

進行一項實驗以測試此R1試劑配方，對一組五份血樣來做，血樣係取自含K₃EDTA之Vacutainer™管子。以標準試劑組來分析第1天和第2天樣本，在自動化分析儀上以102樣本/小時來進行。此外，亦用兼含0.105克/升SDS和0.080, 0.12和0.16克/升Brij® 35之測試Px R1試劑來分析第1天和第2天樣本，以120樣本/小時來進行。對第2天樣本而言，標準Px R1試劑含0.105克/升SDS而不含Brij® 35，用來與潤洗溶液合併使用，其含界面活性劑Pluronic P105於磷酸緩衝食鹽水中，以與測試R1試劑配方比較。

得到精密度和準確度數據(見表5和圖3A-3D)。對第1天樣本而言，準確度的精密度對所有過氧化配通道參數上都在方法說明以內。對第2天樣本而言，含SDS和Brij® 35 0.12克/升及0.16克/升之測試試劑的精密度(相對於第1天樣本和標準)是可接受的。具有SDS和0.080克/升Brij® 35時，%嗜中性球計數在精密度說明以外。上述標準Px試劑及潤洗劑在120樣本/小時下，產生無法接受之精密度結果，具有熟悉形態的升高WBCP和%淋巴球，及下降之%嗜中性球。

此實驗說明對第1天和第2天樣本，以含SDS濃度為0.105克/升和Brij® 35濃度範圍為0.12克/升至0.16克/升

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (47)

之測試Px R1試劑溶液可得到可接受之準確度和精密度。

圖3A說明用過氧化酶方法對第1天血樣之白血球差式分析的可接受結果。示於圖3A之分析中所用之R1試劑組合物為一種標準，及含0.105克/升SDS；標準潤洗試劑含3.0克/升Brij® 35和2.0克/升SDS。圖3B說明用第1天血樣進行測試Px方法之功效結果，其中Px R1試劑組合物含0.105克/升SDS，及潤洗試劑含2.0克/升SDS而無Brij® 35。圖3C說明用第2天血樣進行測試Px方法所得之功效結果，其中Px R1試劑組合物含0.105克/升SDS，及潤洗試劑含2.0克/升SDS而無Brij® 35。圖3D說明用第2天血樣進行測試Px方法所得之功效結果，其中Px R1試劑組合物含0.12克/升Brij® 35和0.105克/升SDS，及潤洗試劑不含SDS及Brij® 35，但含本文中表2所述之潤洗試劑組合物，其包括非溶血性界面活性劑Pluronic P105。由圖3C和圖3D之比較可知，當R1試劑組合物中有非離子性界面活性劑Brij® 35存在時，雜訊區域之厚度明顯下降。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

非離子性界面活性劑(Brij® 35)和離子性界面活性劑(SDS)同時存在於水性過氧化酶 R1 試劑組合物中之功效

表 5

樣本 ⁺	SDS†	Brij® 35††	WBGP	%Neut	%Lymph	%Mono	%Eos	%LUC
第 1 天	0.105 (Std)	0	6.31 0.10	59.1 1.0	30.5 0.8	5.4 0.5	2.8 0.3	1.6 0.4
第 1 天	0.105 (測試)	0.080	6.23 0.04	59.6 0.3	30.0 0.4	5.4 0.4	3.1 0.2	1.5 0.1
第 1 天	0.105 (測試)	0.12	6.12 0.05	59.3 0.5	29.7 0.3	6.1 0.8	2.8 0.2	1.6 0.2
第 1 天	0.105 (測試)	0.16	6.09 0.06	59.6 1.1	29.7 0.7	6.2 0.3	2.6 0.3	1.3 0.1
第 2 天	0.105 (Std)	0	6.46	59.9	29.2	7.0	*1.6	1.6
第 2 天	0.105 (測試)	0	*9.53	*44.0	*45.6	6.6	*1.3	1.8

五、發明說明 (48)

五、發明說明 (49)

第2天 (測試)	0.105	0.080	6.32	*56.0	30.7	6.8	*1.7	1.2
第2天 (測試)	0.105	0.12	6.17	60.0	29.5	7.2	*1.5	1.3
第2天 (測試)	0.105	0.16	6.15	61.1	28.0	7.6	*1.5	1.2

+: 第1天血樣是在取出後不到8小時內使用；

第2天血樣是在室溫下陳化24小時。五個樣本以每試劑進行二重覆。

*: 陳化血樣超過系統說明之數值。

+++ : Std: 標準； Brij® 35和SDS在R1試劑溶液中之濃度以克/升計。

WBCP: 過氧化酶方法中之白血球計數；

% Neut: 樣本中之%嗜中性球； % Lymph: 樣本中之%淋巴球；
% Mono: 樣本中之%單核球； % Eos: 樣本中之%嗜酸性球；
% LUC: 樣本中之%大型未染色細胞。

如圖3A和3B所測定，對第1天血樣使用只含離子性界面活性劑(即SDS)之Px R1試劑組合物，以及含或不含Brij®之潤洗試劑配方時，原點雜訊被認為是正常和可接受的。然而，當使室溫下陳化之第2天血樣來分析時，則觀察到不同結果。對這種陳化血樣分析而言，含0.105克/升SDS之Px R1試劑連同不含Brij® 35而含2.0克/升SDS之潤洗試劑時，所得細胞圖表現無法接受之原點雜訊(圖3C)。很有趣地，根據本發明之發現，第2天樣本之雜訊問題可藉加入非離

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (50)

子性界面活性劑(如 Brij® 35)至 Px 方法之過氧化酶 R1 試劑中而改善(圖 3D)。更特定言之，用於圖 3D 之 Px R1 試劑組合物含 0.12 克/升 Brij® 35 和 0.105 克/升 SDS，及所用潤洗試劑不含 Brij® 及 SDS，但含非溶血性界面活性劑 Pluronic P105。因此，發現用於過氧化酶 R1 試劑組合物中之最適濃度，及樣本潤洗循環和含非溶血性界面活性劑如 Pluronic P105 之對應潤洗試劑之最佳使用狀況，使最終非離子性界面活性劑濃度適合血樣之條件和體積，造成過氧化酶差式計數方法功效及所得結果精密度、準確度和可接受度之顯著改良。

實例 4

選擇非離子性界面活性劑於 R1 試劑組合物中之最佳濃度，供用於 Px 方法中，其使用樣本潤洗循環及無溶解性非離子性界面活性劑如 Brij® 35 之潤洗溶液

實驗之進行係為選擇非離子性界面活性劑於過氧化酶 R1 試劑組合物中之最佳濃度，以 Brij® 35 為例示用非離子性界面活性劑，及用一種試劑形態，其包括一種無非離子性界面活性劑(如 Brij® 35)之潤洗液(表 4)。

功效數據係得自一項實驗，其中所用 Brij® 35 之最終濃度為 0.10、0.12 和 0.14 克/升，有二組樣本：1) 26 個非醫院樣本及 2) 14 個醫院樣本。數據係得第 1 天和第 2 天樣本，係收集和貯存於含 K₃EDTA 作為抗凝劑之 Vacutainer™ 管中。數字和細胞圖數據均被考慮。

含 0.10、0.12 和 0.14 克/升 Brij® 35 之 Px R1 測試試劑溶

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (51)

液的製法是分別將0.085、1.02和1.19毫升30克/升Brij® 35加入過氧化酶R1試劑混合物(除去界面活性劑)之小份中。在用各種不同R1測試試劑組進行過氧化酶方法步驟之後，乃使用如本文所述之含非溶解性界面活性劑Pluroinc界面活性劑於樣本潤洗循環中。就標準或對照試劑形態而言，所用R1稀釋劑含0.105克/升離子性界面活性劑SDS而無非離子性界面活性劑，潤洗試劑溶液兼含Brij® 35和SDS。非醫院樣本係得自假定為正常之志願者，及醫院樣本係得自紐約衛其斯郡醫學中心(Westchester County Medical Center)之病人。

使用自動化血液學分析儀(如TECHNICON H●™系列)以手控開口管取放方式來收集數據。用各試劑組來分析二重覆第1天樣本。來自相同提供者組之未開口樣本貯存於室溫下過夜，並在第2天(即第2天血樣)以手控開口管取放方式作分析。標準運轉之軟體是在樣本/小時(s/h)。測試樣本以120 s/h運轉。每天在運轉樣本前，根據使用者手冊所設定之一般性維持指示清洗自動化系統。根據使用者手冊所列之分析儀說明來設定過氧化酶通道收取(channel gains)。在評估測試試劑之前和之後，以軟體和試劑之標準形態來測定系統不準確性。一個新鮮非醫院血樣經取放十次，然後對所有CBC參數測定(由系統自動進行)平均值和標準偏差(SD)。此SDs和新鮮非醫院血樣之系統不準確性說明來比較。此程序是在每天研究之後進行。測試方法不準確性是在不連續狀態用下列方程式來計算： $SD = [\text{Sum}$

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (52)

$(d^2)/2N]^{1/2}$ ，其中d是以特定試劑所得二重覆數值間之差別，及N是組內樣本數。

Brij® 35對白血球差式計數值過氧化酶方法結果的影響(26非醫院樣本)。

在此實驗中，對26非醫院樣本測試過氧化酶方法，使用上述標準R1試劑，及使用含Brij® 35濃度0.10, 0.12和0.14克/升之測試過氧化酶方法R1試劑來進行(見表6)。就第1天血樣而言，臨床參數對Brij® 35濃度不敏感。對精密度說明來說，單核球百分比很低，及雜訊百分比隨Brij® 35濃度之增加而降低。除%單核球以外，所有其他參數可滿足精密度和準確度說明。

對第2天血樣而言，%嗜酸性球低於陳化血樣之精密度說明，對標準方法和所有三個測試方法皆然。所有其他臨床參數皆在可接受之限度內。%雜訊反應和由所試第1天血樣觀察到的結果相近。對這數據組來說，第1天和第2天樣本在Brij® 35濃度範圍0.10, 0.12和0.14克/升內，數字數據大致相同。比較0.14對0.10克/升Brij®顯示%雜訊降低之好處：對新鮮和陳化血樣分別為13%和17%。

Brij® 35濃度變異(14醫院樣本)

在此實驗中，14醫院血樣組以標準過氧化酶方法試劑來測試，亦用含0.10, 0.12和0.14克/升Brij® 35之測試PxR1試劑來測試(見表7)。就第1天和第2天血樣，所有測試試劑大致都滿足精密度說明。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (53)

表6:不同Brij® 35濃度在Px方法中之影響(26非醫院樣本)							
第1天血樣							
Brij® 35(克/升)	WBCP	%N	%L	%M	%E	%LUC	%Nois
Std	6.08	58.7	29.1	7	2.7	1.9	21.2
	0.1	1	*1.4	0.5	0.2	0.2	0.6
0.1	6.12	58.7	29.4	*6.2	2.8	2.2	25
	0.12	0.9	0.9	0.5	0.4	0.2	1.4
0.12	6.1	58.9	29.5	*6.2	2.8	2.1	22.9
	0.11	1	0.8	0.5	0.3	0.2	1.3
0.14	6.1	58.6	29.6	*6.4	2.8	2	21.7
	0.12	0.8	0.7	0.6	0.2	0.3	1.4
第2天血樣							
Brij® 35(克/升)	WBCP	%N	%L	%M	%E	%LUC	%Nois
Std	*6.48	59.2	29.8	6.9	*1.6	1.7	27.1
	0.18	4.2	4.2	0.6	0.3	5	2.3
0.1	6.29	57.7	31	7.1	*1.6	1.8	24.9
	0.14	1.5	1.7	0.7	0.2	0.4	1.8
0.12	6.24	58.6	29.9	7.2	*1.6	1.8	23.9
	0.13	1.2	1.2	0.7	0.2	0.3	2.3
0.14	6.12	59.8	29.1	7	*1.6	1.7	20.8
	0.12	1.2	1.3	0.8	0.4	0.2	1.8
說明 :							
第1天 SD	0.16	1.4	1.1	0.9	0.5	0.5	無
第1天 acc	0.15	1	0.5	0.5	0.2	0.5	無
第2天 acc	0.32	2.8	2.2	1.8	1	1	無

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

說

五、發明說明 (54)

由醫院和非醫院數據組所得之細胞圖以下列特性作定性分析：雜訊/淋巴球分離；嗜中性球、淋巴球、單核球、嗜酸性球和LUC族群之緊密度；細胞圖中細胞族群之染色強度和位置；雜訊區和淋巴球區間浮動低閾值之變異；及整體一般外觀與用標準試劑於過氧化酶方法中作血樣分析所得之細胞圖作比較。於過氧化酶方法中分析之樣本組包括第1天和第2天非醫院樣本(11樣本)和醫院樣本(11樣本)。

由所得細胞圖推得之結論為過氧化酶R1稀釋劑中有0.12克/升Brij® 35可在細胞族群分離和可接受原點雜訊方面，產生最佳整體細胞圖；0.10和0.14克/升不如0.12克/升，但皆為在此方法中可接受的。對第2天樣本，Px R1測試稀釋劑中0.10克/升Brij® 35所造成之雜訊百分比略高於0.12克/升Brij® 35(即對第1天樣本為21.7%對16.7%，及對第2天樣本為18.9%對17.7%)，但對第2天血樣分析而言，0.10克/升Brij® 35濃度被測定為較佳(即細胞族群區域較緊密)。相反的，R1測試稀釋劑中之0.14克/升Brij® 35所造成之雜訊百分比比0.12克/升此界面活性劑略低(即對第1天樣本為16.2%對16.7%)；然而，0.14克/升此界面活性劑對第2天血樣之邊界來說為較佳(即0.14克/升Brij® 35造成細胞族群擴散，乃因較高界面活性劑濃度對細胞之衝擊所造成)。細胞固定性檢視之結果和數值分析一致。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (55)

表 7: Brij®35 濃度變異於 PXR1 試劑組合物中之影響(14 醫院樣本)							
第 1 天血樣							
Brij® 35(克/升)	WBCP	%N	%L	%M	%E	%LUC	%Nois
Std	15.15	71.8	16.5	5.2	0.7	5.5	8.6
	0.16	*2.9	*3.0	*1.8	0.1	*2.3	0.4
0.10	15.12	71.9	16.7	4.7	0.7	5.7	10.9
	*0.18	1.3	0.7	*1.3	0.2	0.5	0.6
0.12	15.12	71.7	17.0	4.9	0.7	5.4	9.2
	0.13	0.8	1.0	0.5	0.1	0.5	0.5
0.14	15.23	71.2	*17.6	5.3	0.6	*4.9	9.1
	*0.19	0.8	1.1	0.5	0.1	2.5	0.7
第 2 天血樣							
Brij® 35(克/升)	WBCP	%N	%L	%M	%E	%LUC	%Nois
Std	14.92	71.0	17.3	6.2	0.6	4.3	12.8
	0.67	2.3	4.2	1.5	0.1	1.7	1.0
0.10	15.00	70.8	17.7	5.4	0.5	4.9	11.6
	0.29	0.6	1.3	0.4	0.1	9.3	2.3
0.12	15.10	70.5	17.3	5.6	0.6	5.4	10.7
	0.37	1.3	1.3	0.5	0.1	0.1	1.0
0.14	15.23	70.1	17.7	5.8	0.7	5.2	9.8
	0.37	1.5	2.1	2.1	0.1	1.3	1.0
說明 :							
第 1 天 SD	0.16	1.4	1.1	0.9	0.5	0.5	無
第 1 天 acc	0.15	1	0.5	0.5	0.2	0.5	無
第 2 天 acc	0.32	2.8	2.2	1.8	1	1	無

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (56)

相似實驗之結果亦顯示，所試五種不同批次 Brij® 35 大致得到相同功效，對第 1 天和第 2 天正常和醫院血樣均如此。因此，Brij® 35 之批次間差異不預期會成為含此非離子性界面活性劑之試劑製備時的問題。基於數字和細胞圖結果之綜合，過氧化酶 R1 試劑組合物中 Brij® 35 最佳濃度範圍選在約 0.10 克/升至約 0.15 克/升，更佳為約 0.11 克/升至約 0.13 克/升。須了解的是，試劑組合物中之非離子性界面活性劑 (如 Brij® 35) 之濃度可由熟練的操作者作例行調整，視用來進行差式計數方法之血液學分析系統而定。

實例 5

在過氧化酶方法中，使用含非溶血性界面活性劑之潤洗溶液，並使用含雙重界面活性劑之 R1 試劑組合物，以避免易變潤洗攜移的問題

在自動化分析儀上進行過氧化酶白血球差式計數方法時，為避免潤洗攜移問題，本發明方法可藉包括一種潤洗溶液而進一步改良，該潤洗溶液所含非離子性、非溶血界面活性劑不同於本發明 R1 試劑組合物所含之非離子性界面活性劑。該潤洗溶液已描述於前文中，包括非溶血性界面活性劑如 Pluronic P105，其在過氧化酶方法中為不活性及非功能性，且對方法只有造成些微體積增加。於半-和全-自動化血液學分析儀上進行過氧化酶白血球差式計數方法時，樣本間潤洗可消除沉積形成，及避免數次樣本取放後過氧化酶反應室中之樣本/試劑混合物攜移。

潤洗攜移問題之特定說明如下：在設計改良的本試劑和方

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明 (57)

法前，本案發明人發現在完成樣本間潤洗循環後，有約8-10微升潤洗溶液留在反應室中。當根據本發明將潤洗溶液調配成含非離子性界面活性劑Brij® 35時，似乎少量潤洗液體積(即8至10微升)造成加入一些Brij® 35至方法之R1相中，這已足以對細胞圖所示細胞分離結果造成不利影響。例如，當潤洗攜移體積超過約10微升時，細胞圖中嗜酸性球族群上移至嗜中性球族群中，及單核球和淋巴球都在細胞圖中下移。再者，當潤洗攜移體積為約13.3微升時，過氧化酶方法因Brij® 35之存在而完全破壞。由於在此方法第一反應相中所加入之Px R1試劑溶液體積為0.25毫升，過氧化酶方法第一反應相中所計算得之Brij® 35濃度為約0.093克/升至0.120克/升，其對應於潤洗攜移體積約8.0至10.0微升。

在該等測試期間，定量由潤洗攜移轉移至Px方法R1階段之Brij® 35濃度，列示如下：潤洗溶液含3.0克/升Brij® 35。潤洗攜移體積為10微升，其相當於30微克Brij® 35。轉移30微克Brij® 35至過氧化酶方法之R1相中(即250微升過氧化酶R1稀釋劑+12微升血液，或~7微升血漿，+10微升潤洗溶液，產生總體積~267微升)，再於方法R1相中造成Brij® 35濃度為0.112克/升。測試過氧化酶R1試劑均調配成基本上含相同濃度Brij® 35，使在過氧化酶方法中輸送固定濃度之此非離子性界面活性劑。

圖4A-4F顯示使用無非離子性界面活性劑(如Brij® 35)(圖4A，4C和4E)之水性潤洗組合物，及有非離子性界面活

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (58)

劑(圖4B, 4D和4F)之水性潤洗組合物時, 不同潤洗攜移體積對本發明過氧化酶方法之影響。在過氧化酶方法R1和R2相中, 如圖4A-4F所示, 此方法之R1試劑含0.105克/升SDS而無Brij® 35。圖4A和4B出示由過氧化酶方法和伴隨之潤洗循環所得之細胞圖, 潤洗溶液攜移造成過氧化酶R1試劑溶液最終體積中之7.9微升(圖4A:無Brij® 35於潤洗溶液中; 圖4B:Brij® 35存在於潤洗溶液中)。圖4C和4D所示細胞圖係由過氧化酶方法和所伴隨之潤洗循環所得到, 潤洗溶液攜移造成過氧化酶R1試劑溶液最終體積中之10.1微升(圖4C:潤洗溶液中無Brij® 35; 圖4D:Brij® 35存在於潤洗溶液中)。圖4E和4F所示細胞圖係由過氧化酶方法和所伴隨之潤洗循環所得到, 潤洗溶液攜移造成過氧化酶R1試劑溶液最終體積中之13.3微升(圖4E:潤洗溶液中無Brij® 35; 圖4F:Brij® 35存在於潤洗溶液中)。由結果可知, 潤洗溶液中存在之Brij® 35和潤洗攜移之影響, 造成細胞圖結果之普遍劣化。當在Brij® 35存在下而潤洗攜移體積增加時, 亦可觀察到此結果(圖4B, 4D和4F)。

使用本發明改良之試劑組合物和方法時, 攜移很顯著; 此外, 結果之精密度和準確度是高度可接受的。本案發明人測定出非離子性界面活性劑Brij® 35為該試劑成份, 若其存在於潤洗組合物或溶液中, 或若攜移不同量至過氧化酶方法中時, 會造成無法接受的細胞圖結果, 對細胞圖中白血球聚集之破壞特別明顯。

如本文所述, 於過氧化酶方法潤洗溶液中使用非溶血性

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (59)

界面活性劑如 Pluronic (如 Pluronic P105)，及調配本發明新穎而改良之 R1 稀釋劑組合物，可減輕易變潤洗攜移之影響，保持原點雜訊在可接受程度，及使得以自第 2 天血樣用 Px 方法獲得可接受之結果。因此，根據本發明，由實驗發現，兼含離子性界面活性劑(如 SDS)和非離子性界面活性劑(如聚乙氧酸酯 Brij® 35)之 R1 試劑組合物可用於在室溫下已陳化 24 小時或更久之血樣。再者，根據本發明，使用含 Pluronic 類界面活性劑之潤洗溶液亦可改良本文所述白血球差式計數方法之結果。

實例 6

用 R1 試劑組合物和過氧化酶方法進行白血球差式計數方法之自動化分析

本實例描述快速(即 120 樣本/小時對 60 或 102 樣本/小時)白血球差式分析之決定，其中使用自動化血液學分析儀和本發明之改良方法和試劑。具有此技術之人士很清楚的是可用各種不同分析儀和系統以得到本發明方法和試劑之優點。

使用全血樣，在此方法之 R1 反應相中，以 250 微升含雙重界面活性劑之 R1 試劑稀釋劑來輸送 12 微升樣本。約 19 秒後，加入 250 微升含過氧化氫(3.0 克/升)之稀釋劑及 125 微升含 4-氯- α -萘酚(70 克/升)之稀釋劑。此為第二反應相(R2)。加入含色原質之試劑以後約 13 秒時，流出液通過電子光學偵測系統及製得細胞圖。以細胞為基礎來測量(正角散射對吸光)白血球染色之大小和程度，並點畫在細胞圖上

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (60)

。在電腦上分析細胞圖，以得到全部白血球計數及嗜中性球、嗜酸性球、單核球、淋巴球和大型未染色細胞之亞群差式計數。圖示說明一些細胞圖，係得自用來在自動化裝置上進行本發明方法之自動化血液學分析儀電子光學偵測系統。細胞圖顯示以本發明試劑和方法區辨出之白血球種類(即WBCs):1)淋巴球;2)單核球;3)嗜中性球;4)嗜酸性球;5)由紅血球虛體和血小板造成的原點雜訊，和6)LUCs(見圖1A)。

全血最終稀釋度為1:53，及全部反應時間為約30-32秒。在自動化分析儀上進行之過氧化酶方法的溫度型態，其一般性及非限制性例子如下:在方法之R1相中，血樣和R1試劑稀釋劑進入溫度設在約 $69^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 之過氧化酶室中。R1反應相期間約15至20秒，溫度增高至約 65°C 至約 75°C ，或至約 65°C 至約 70°C 。然後，將受質試劑加入方法之第2反應相(即R2);R2溫度為約 50°C 至約 65°C ，期間有約5至8秒，其間溫度升至約 $73^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，此乃過氧化酶方法完成時之最終溫度。過氧化酶方法R2相完成後，於潤洗循環中使用潤洗溶液。需要樣本潤洗循環以避免樣本自一樣本循環攜移至另一樣本循環，及避免自動化血液學分析儀系統之水份影響累積。

實例7

分析各種不同非離子性界面活性劑於本發明R1試劑組合物和方法中之適合度

為決定非離子性聚乙氧酸酯界面活性劑種類是否適合用

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (61)

於本發明改良試劑組合物和過氧化酶方法中，乃作下列實驗。

用於方法中第一反應相之過氧化酶R1測試試劑組合物係以如下方式製備：將200微升各種不同聚氧乙酸酯於蒸餾水中之3.0克/升溶液加入50.0毫升之第1相試劑組合物中，並置入60毫升之聚丙烯旋蓋離心管中。界面活性劑溶液之製法是加3.0克聚乙氧酸酯至97.0毫升蒸餾水中，及加熱攪拌至溶液開始沸騰。冷卻至室溫歷約30分鐘後，將200微升溶液加入至過氧化酶R1試劑組合物之其他成份中以製成R1測試試劑。此處被測試之聚乙氧酸酯可購自許多不同來源；例如，Brij[®]界面活性劑係得自ICI和Ruger；Macol界面活性劑係得自Mazer，Sipionic界面活性劑係得自Alcolac；Triton X[®]界面活性劑係得自Sigma，Union Carbide或Rohm & Haas；Igepal CO987係得自GAF；Pluronic P105係得自BASF；Surfonic N31.5係得自Huntsman。在離子性界面活性劑方面，TDAPS係得自Boehringer-Mannheim及TTAB係得自Sigma。

如表8所示，使用下列族群或類別之聚乙氧酸酯：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (62)

表 8

界面活性劑	HLB 值	疏水物	親水物
1)直鏈疏水物經醚化成聚乙二醇			
Brij® 52	5.3	C ₁₆ H ₃₃ O	POE ₂
Brij® 30	9.7	C ₁₂ H ₂₅ O	POE ₄
Brij® 76	12.4	C ₁₈ H ₃₇ O	POE ₁₀
Macol® TD12	14.5	C ₁₃ H ₂₇ O	POE ₁₂
Siponic® L12	14.6	C ₁₂ H ₂₅ O	POE ₁₂
Brij® 78	15.3	C ₁₈ H ₃₇ O	POE ₂₀
Brij® 58	15.7	C ₁₆ H ₃₇ O	POE ₂₀
Siponic® E15	16.9	C ₁₆ H ₃₃ O/C ₁₈ H ₃₇ O	POE ₃₂
Brij® 35	16.9	C ₁₂ H ₂₅ O	POE ₂₃
2)支鏈辛苯基疏水物經醚化為聚乙二醇			
Triton X®-100	13.5	C ₈ H ₁₇ OC ₆ H ₄ O	POE _{9.5}
Triton X®-165*	15.8	C ₈ H ₁₇ OC ₆ H ₄ O	POE ₁₆
Triton X®-305*	17.3	C ₈ H ₁₇ OC ₆ H ₄ O	POE ₂₀
Triton X®-405*	17.9	C ₈ H ₁₇ OC ₆ H ₄ O	POE ₄₀
3)直鏈壬苯基疏水物經醚化為聚乙二醇			
Igepal® CO897*	17.8	C ₉ H ₁₉ OC ₆ H ₄ O	POE ₄₀
4)直鏈脂肪酸經酯化為聚乙二醇			
Myrj® 53	17.9	C ₁₇ H ₃₅ CO ₂	POE ₅₀

*原料為 70%(重量/重量)之水中溶液;因此, 4.30 克界面活性劑溶液和 95.7 克蒸餾水混合以產生最終濃度 3.00 百分比(重量/重量)界面活性劑於過氧化酶方法第一反應相試劑組合物中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (63)

由正常提供者收集每試劑組10份血樣至 Vacutainer® 管中，並以K₃EDTA抗凝集。於自動化分析儀上收集數據，以手控取放開口管。每試劑組之第1天血樣取放二重覆。來自相同提供者之未開口樣本貯存在室溫下過夜，第2天作手控分析(第2天樣本)。標準運轉軟體發生在102樣本/小時；測試樣本和試劑在通過120樣本/小時之情況下運轉。每天在運轉樣本前，根據操作指示清洗系統，及過氧化酶通道收取係根據所用各自動化系統之操作指示來設定。

在評估測試試劑之前和之後，用軟體和試劑之標準形態來測定系統不準確性。一個第1天血樣取放十次，及對所有參數測定(由系統自動進行)平均值和標準偏差。標準偏差和由新鮮血液測出之系統不準確性說明作比較。每天作研究時都進行此步驟。

為測定測試方法之不準確性，將10樣本取放二重覆。在不連線狀態估計不準確性，以下列方程式計算過氧化酶通道參數之標準偏差SD(多重提供者SD之合併): $SD = [\text{Sum}(d^2)/2N]^{1/2}$ ，其中d是以特定試劑所得之二重覆數值間之差異，和N是十樣本組中之樣本數。

在二組中評估測試Px R1試劑。對各組而言，併入標準過氧化酶方法(如在TECHNICON H●™自動化分析儀上進行)作為參考。參考值之定義為第1天平均值，其係在無本發明改良方法和試劑之情況下獲得。第1天和第2天樣本分析之精密度("acc")是相對於參考來測定；第1天和第2天陳化血樣之精密度要求不同。此外，不準確性只對第1天血

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (64)

樣測定(見表9)。

Brij[®] 52見HLB為5.3 (見表10)，因此為疏水性，通常用於水在油中之乳化應用上。在H●3TM自動化分析儀上進行的自動化過氧化酶方法在過氧化酶流出物之水性環境中，係利用油在水中乳化作用(即紅血球和血小板細胞膜之脂質被界面活性劑微粒體"溶解")。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (65)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

表9 用不同非離子性界面活性劑對第1天和第2天血樣作白血球差式分析

第1天血樣											結構疏水物	親水物
試劑	WBCP	%NEUT	%LYMP	%MONO	%EOS	%LUC	%NOISE	HLB		POE單位 n =		
Std	6.35	61.0	26.9	6.6	2.6	2.2	17.8					
sd	0.09	0.6	0.8	0.6	0.2	0.4	0.6					
Brij® 58	6.40	60.7	27.3	6.6	2.5	2.2	19.5			20		
sd	0.10	1.0	1.0	0.3	0.4	0.2	1.3					
Ig.® CO897	6.46	60.7	27.3	6.5	2.7	2.1	28.0			40		
sd	0.10	1.3	1.1	0.4	0.3	0.5	1.2					
Trilon X® 100	6.32	61.0	27.1	6.6	2.7	2.0	18.9			9.5		
sd	0.10	1.2	0.9	0.7	0.2	0.2	1.0					
Siponic® E15	6.44	60.5	27.2	6.9	2.7	2.0	23.1			**32		
sd	0.14	1.3	1.0	0.3	0.3	0.3	1.4					
Trilon X® 400	6.49	61.1	27.4	6.0	2.6	2.1	27.1			40		
sd	0.12	1.1	1.1	0.3	0.5	1.0	1.0					
Brij® 76	6.50	60.8	27.1	6.4	2.7	2.3	24.3			10		
sd	0.11	0.9	0.7	0.5	0.2	0.2	0.9					
Myrij® 53	6.48	60.1	27.3	6.1	2.8	2.1	24.6			50		
sd	0.09	1.2	1.0	0.5	0.3	0.2	0.9					
acc spec	0.15	1.0	0.5	0.5	0.2	0.5	無					
sd spec	0.16	1.4	1.1	0.9	0.5	0.5	無					

五、發明說明 (66)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝 訂 線

第 2 天血樣													結核菌水物	親水物
試劑	WBCP	%NEUT	%LYMP	%MONO	%EOS	%LUC	%NOIS	HLB						
Sid	6.62	59.6	29.7	6.3	1.8	1.7	24.1							
Brij® 58	6.62	60.5	28.5	7.1	1.6	1.7	14.3	15.7						
Ig® CO897	*9.79	*54.4	*33.7	7.3	*1.3	2.3	33.0	17.8						
Trion X® 100	6.43	62.7	26.7	6.9	1.7	1.5	15.4	13.5						
Siponic® E15	6.65	60.8	28.7	6.6	1.7	1.6	17.7	16.9						
Trion X® 400	*10.77	57.1	*31.2	7.2	*1.2	2.3	33.3	17.9						
Brij® 76	6.68	60.8	28.8	6.5	1.7	1.7	23.3	12.4						
Myrj® 53	*8.04	58.8	*30.5	6.7	*1.2	2.0	31.8	17.9						
acc spec														
Day 2	0.32	2.8	2.2	1.8	1.0	1.0	無	N/A						

*:超過在日 ● TM 分析儀上之方法說明; **:經於 C、H、L、S 之計算; Sd:平均值標準偏差

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (67)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝 訂 線

表 10 用不同非離子性界面活性劑對第 1 天和第 2 天血樣作白血球差式分析

第 1 天血樣	WBCP	%NEUT	%LYMP	%MONO	%EOS	%LUC	%NOIS	HLB	結構疏水物	親水物 POE 單位 n =
試劑:										
Sid	7.02	62.4	25.2	6.5	3.1	2.0	20.3			
sd	0.14	0.8	0.7	0.5	0.2	0.2	0.5			
Brij® 52	*7.20	62.4	25.5	6.0	3.1	2.4	32.4	5.3	C ₁₆ H ₃₃	2
sd	0.09	1.0	0.8	0.6	0.2	0.4	2.0			
Brij® 35	6.97	62.1	25.9	6.0	3.2	2.1	22.5	16.9	C ₁₂ H ₂₅	23
sd	0.15	0.7	0.6	0.5	0.3	0.3	0.8			
Siponice® L12	6.97	61.9	25.7	6.5	3.1	2.3	19.4	14.6	C ₁₂ H ₂₅	12
sd	0.15	0.7	0.6	0.4	0.3	0.3	1.4			
Triton X® 165	7.04	62.1	25.7	6.1	3.2	2.2	23.0	15.8	C ₈ H ₁₇ Ph	16
sd	0.09	0.7	0.9	0.7	0.2	0.3	0.7			
Triton X® 300	7.04	62.4	25.4	6.0	3.2	2.3	27.9	17.3	C ₈ H ₁₇ Ph	30
sd	0.12	1.0	0.8	0.9	0.3	0.3	1.3			
Brij® 30	7.05	61.5	26.1	6.5	3.1	2.1	21.0	9.7	C ₁₂ H ₂₅	4
sd	0.10	0.9	0.7	0.5	0.3	0.1	0.9			
Macol®TD12	7.01	62.3	25.4	6.4	3.0	2.0	19.0	14.5	C ₁₂ H ₂₇	12
sd	0.15	0.9	0.7	0.5	0.3	0.1	0.9			

五、發明說明 (68)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝 訂 線

第 2 天血樣

Brij® 78	7.10	61.4	25.6	6.9	3.0	2.2	23.4	15.3	C ₁₄ H ₁₁	20
sd	0.16	1.2	1.0	0.6	0.3	0.3	1.2			
accy spec	0.15	1	0.5	0.5	0.2	0.5	無	N/A		
sd spec	0.16	1.4	1.1	0.9	0.5	0.5	無	N/A		

試劑	WBCP	%NEUT	%LYMP	%MONO	%EOS	%LUC	%NOIS	HLB		
Sid	7.16	6.3	25.8	7.4	2.2	1.7	22.4			
Brij® 52	*13.10	*47.8	*33.2	7.6	*1.0	3.0	35.6	5.3		
Brij® 35	7.10	62.5	25.8	7.3	2.2	1.8	19.6	16.9		
Siponic® L12	6.95	62.7	25.1	7.9	2.2	1.8	14.5	14.5		
Triton X® 165	7.07	62.6	25.7	7.2	2.3	1.7	21.9	15.8		
Triton X® 300	*8.90	60.8	27.0	7.8	2.3	1.8	35.8	17.3		
Brij® 30	7.04	62.6	26.0	7.2	2.1	1.8	17.0	9.7		
Macol®TD1	6.90	63.9	24.3	7.5	2.2	1.7	13.3	14.5		
Brij® 78	7.03	63.8	25.1	6.9	2.2	1.7	17.3	15.3		
acc spec										
aged	0.32	2.8	2.2	1.8	1.0	1.0	無	N/A		

*:超過在 H ● TM 分析儀上之方法說明; Sd:平均值標準偏差

五、發明說明 (69)

一般而言，過氧化酶流出物包括下列成份：0.25毫升Px R1試劑溶液，Px 1；0.125毫升含色原質之試劑溶液，Px 2；0.25毫升含過氧化氫之試劑溶液，Px 3；和12微升血樣。Px 1和Px 3(3.0克/升過氧化氫水溶液)為水溶液，而Px 2為4-氯-萘酚溶於二乙二醇中之(非水性但可與水相混之溶劑)之溶液。

具HLBs值在3-6範圍之界面活性劑較宜用於水於油中之乳化作用中。相對的，較宜用於油於水中乳化作用中之HLB範圍為約8-18(M. J. Rosen, 1978, Surfactant and Interfacial Phenomena, Wiley-Interscience, pp. 243-244)。

Triton X[®] 305顯示為高親水性，因其具HLB為17.3，適合用於油於水中乳化作用。然而，在分析條件下，其非常親水性的結果可能是達不到最佳功效。本案發明人由數項過氧化酶研究發現，紅血球在室溫下貯存後變得更不易溶解，因在貯存期間產生生物化學改變。由於血樣會隨時間劣化，且有需要對此種樣本進行分析，並在非最佳陳化樣本條件下得到適當結果，本發明方法和試劑的精密度和可信度是特別重要的。

對於含離子性界面活性劑加上下列非離子性界面活性劑之過氧化酶R1試劑組合物而言：Brij[®] 58，Igepal[®] CO897，Triton X[®]-100，Siponic[®] E15，Triton X[®]-405，Brij[®] 76，及Myrj[®] 53，均在第1天血樣分析中表現得精密且可接受。然而，對第2天樣本，含Igepal[®] CO897，Triton X[®]-405和Myrj[®] 53之Px R1試劑組合物似乎產生無法接受之數字和細

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (70)

胞圖結果(見表11和12)。該等聚乙氧酸酯具HLB值分別為17.8, 17.9和17.9, 及平均%雜訊值分別為33.0, 33.3和31.8。此外, 由於使用該等界面活性劑而造成的其他共同特性為升高之WBCP和扭曲的%嗜中性球和%淋巴球。如所示, Myrj® 53為十八酸之羧酸酯, 其在水性溶液可能較不安定, 因其會水解。用於表11和12中之縮寫為: WBCP:%全白血球; %NEUT:%嗜中性球; %LYMPH:%淋巴球; %MONO:%單核球; %EOS:%嗜酸性球; LUC:%大型未染色細胞; %NOIS:%進行過氧化酶方法後之原點雜訊; HLB:親水性親脂性平衡值。

不受任何理論所限, 過氧化酶方法所用R1試劑組合物中之界面活性劑的可能功能包括下列之一者或二者:(1)對細胞膜之穿透導致紅血球和血小板之溶解, (2)水不溶性4-氯萘酚之複合, 及此受質運送至發生染色之細胞, 及(3)紅血球殘骸之乳化, 因而減少過氧化酶通道之累積。

在附圖所示之代表性細胞圖中, 在原點處之雜訊/淋巴球"樹幹"的寬度和深色度(和細胞數相關)隨雜訊百分比之增加而增加。一般而言, 得自陳化血樣之細胞圖表現出嗜中性球降低至新鮮血樣嗜中性球族群之界限以下。在陳化血樣中, 族群並不傾向散佈出去。由此實例的結果顯示, 在所測試之聚乙氧酸酯界面活性劑之各種不同家族中, 細胞圖係相當的(見表8實例7)。然而, 特別的是, 如上所述衍生自界面活性劑家族1和2(如直鏈或支鏈辛苯基疏水物經醚化為聚乙二醇)及具HLB範圍為約9.6至約16.9之界面活性劑, 在第1天和第2天血樣分析中均可得可接受之結果。這

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (71)

些結果和被推薦用於油於水中乳化作用中之界面活性劑HLB範圍約8-18為一致的。在自動化過氧化酶方法中，如在所例示之H●3™系統上所進行的，紅血球細胞膜殘骸為脂肪("油")物質，其在水性環境中被界面活性劑微球粒所乳化；因此，該等類型分析之操作模式為油於水中乳化作用。

實例8

具低HLB值之界面活性劑的分析，及Pluronic對Px R1試劑組合物和白血球差式計數過氧化酶方法之評估

進行實驗以測試具較低HLB範圍(~8)之聚乙氧酸酸酯界面活性劑經調配入含0.105克/升SDS之Px R1試劑組合物中之用途及功效。因此，測試了HLB值由5.3至17.9之界面活性劑。

屬試劑組一部份之測試R1試劑組合物，其功效係以一組樣本來測試，包括5個第1天非醫院血樣及5個在室溫貯存後之第2天非醫院樣本。其功效根據現行自動化分析儀之精密度和準確度說明來評斷。偵測下列參數：WBCP%，%嗜中性球(%N或Neut)，%淋巴球(%Ly)，%單核球(%M)；%嗜酸性球(%Eos)，%大型未染色細胞(%LUCs)和%過氧化酶雜訊(%Noise)。

測試Px R1試劑含有SDS(0.105克/升)及下列其他界面活性劑，如Brij® 35, Macol® NP4, Surfonic® N31.5, Pluronic P105, Macol® Td3, 及Triton X® 35,其製法係根據實例7所述方法。例示之測試界面活性劑和其對應之HLB值如下：

五、發明說明 (72)

界面活性劑	HLB 值
Brij® 35	16.9
Macol® NP4	8.9
Surfonic® N31.5	7.7
Pluronic P105	12-18
Macol® TD3	8.0
Triton X® 35	7.8

另進行一些研究以測試用 Pluroincs 代替本發明過氧化酶 R1 試劑組合物中作為非離子性界面活性劑之 Brij® 35。

如實例 7 和表 11 和 12 所示，使用 HLB 值由約 9.3 至約 16.9 之界面活性劑對第 1 天和第 2 天血樣都可得到可接受的自動化過氧化酶方法結果。R1 試劑組合物中之界面活性劑具高於約 17.3 之 HLB 值及低 HLB 值(如 HLB: 5.3)則得到無法接受之數據。

Pluronics, 包括 P105, 其結構和其他用於所述實驗中的聚乙氧酸酯很不同。在 Pluronics 的結構中, 有三個功能部位: $(POE)_n-(POP)_m-(POE)_n$, 其中 POE 和 POP 分別代表聚氧乙稀和聚氧丙稀。POE 功能部位為親水性的(即"親水物")及 POP 功能部位為疏水性的(即"疏水物")。亦有 Pluroinc"反向(reverse)"或"R"系列, 其中 POE 功能部份旁有二個 POP 功能部位(見 Pluroinc & Tetronic Surfactants, BASF Corporation, 1987), Pluronics 已有被指定之 HLB 值。P105 之 HLB 值為 12-18。P105 之寬廣 HLB 範圍和雙功能部份聚乙氧酸酯者有明顯不同。因 Pluronic 結構和其他雙功能部位聚乙氧酸酯(聚

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (73)

乙氧酸酯化之醇類和酚類)明顯不同，所以Pluronics代表不同類的聚乙氧酸酯。因此，雙和三功能部位聚乙氧酸酯間之不同，使得可用HLB刻度作為雙功能部份聚乙氧酸酯可成功用於本發明過氧化酶試劑和方法中作為有潛力的非離子性界面活性劑之實用性指標。

雙功能部位類聚乙氧酸酯可用疏水物-O-(POE)_n-OH來代表。疏水物可為長鏈、支鏈或直鏈醇，如Brij® 35。或者，其中常用的疏水物結構為辛苯基(如Triton X®系列)或壬苯基類(如Triton N®系列，Macol® NP系列，Surfonic® NP系列等)，其直或支鏈烴結合至酚結構上，其再結合至POE功能部位上。

當過氧化酶R1試劑組合物經調配成兼含SDS和具HLB值由約7.7至8.9之聚乙氧酸酯化之醇或酚，且該等組合物用於分析第2天血樣，所有細胞圖中，淋巴球區域和雜訊區域間都無通道。因此，在四例中，淋巴球百分比很高，及在三例中，嗜中性球百分比很低。整組這種試劑被評斷為不適合用於過氧化酶方法之R1試劑組合物中。所觀察到不可接受之表現的最可能原因為用自動化血液學分析儀作過氧化酶方法應用時，該等聚乙氧酸酯疏水性太高(即HLB太低)。因此，結論是在離子性界面活性劑(如SDS或TDAPS)存在下聚乙氧酸酯化之醇或酚所需HLB值需介於約9.3至約17.3，較佳為約9.7至16.9。因Pluronics代表獨立一類之非離子性界面活性劑，但此類中之一員，即Pluronic P105，經測定可用於過氧化酶試劑和方法，熟諳此項技術

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (74)

之人士應知，其他具不同結構或性質的Pluronics可能有用，因其不同HLB值提供用於本發明試劑所需之足夠界面活性劑溶解性質。

因此，根據這些研究，就0.12克/升之雙功能部位聚乙氧酸酯非離子性界面活性劑而言，在過氧化酶R1試劑組合物中存在有0.105克/升SDS時，具有HLB值介於約5.3和約8.9，及大於約17.3，可被接受用於此方法中，相對的，調配入R1試劑中且其HLB值在約9.7至16.9範圍內之界面活性劑(即該等界面活性劑具有包括三種常見疏水物之結構者)，可在此方法中得到可接受的結果。Pluronics包括獨特一類聚乙氧酸酯界面活性劑，由於其具三功能部位結構。由於其非溶血性特質，當調配入過氧化酶R1試劑組合物中至0.12克/升(在0.105克/升SDS存在下)，Pluronic P105是無法接受的，即使Pluronic具寬度HLB範圍12-18而此範圍和雙功能部位聚乙氧酸酯之有用HLB範圍重疊。

實例9

分析其他類離子性界面活性劑是否適用於白血球差式計數Px R1試劑組合物和過氧化酶方法

為測定是否其他類離子性界面活性劑(如陽離子性或兩性離子性界面活性劑)適用於本發明改良試劑組合物和方法，乃另用此種離子性界面活性劑進行實驗。設計該等研究以測試是否陽離子性和兩性離子性界面活性劑(而非陰離子性界面活性劑如SDS)適合和0.12克/升非離子性界面活性劑(如Brij® 35)併用於過氧化酶R1試劑組合物。此等實驗以自

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (75)

動化血液學分析儀中進行，並使用無一Brij® 35潤洗液之潤洗循環。例如所測試的一種陽離子性界面活性劑為溴化十四基三甲基銨或TTAB;及例如，所測試的一種兩性離子性界面活性劑為十四基胺丙烷磺酸酯或TDAPS。

不含SDS(如Px1/無SDS)之測試R1試劑係製成含Brij® 35(4.0毫升30克/升於蒸餾水中之溶液);葡萄糖醇，113.0克;磷酸鈉，單鹼基，2.08克(Mallinkrodt);磷酸鈉，二鹼基，11.89克(Mallinkrodt); NaCl, 0.488克(Mallinkrodt 7581KMER); Na₂EDTA, 0.750 (Mallinkrodt 4931KMHK); 甲醛，37%，150毫升(Mallinkrodt)。分析過程中之pH為7.23。測試試劑過濾通過0.2微米聚砜膜(47毫米)盤(Gelman Supor)。離子性界面活性劑以下列方式加入Px1/無SDS中:200微升TDAPS或TTAB之30克/升溶液加入於60毫升聚丙烯旋蓋管中之50.0毫升Px1/無SDS。在所以測試分析之潤洗循環中，乃使用含Pluronic P105之潤洗試劑。每組有自正常志願者收集之5個正常血樣，於Vacutainer™管中並以K₃EDTA抗凝集。在TECHNICON H●™系列之自動化血液學分析儀上以手控開口管取放方式收集數據，以實例2方式進行此方法。

在所述之白血球差式計數標準或對照方法中，發現含SDS作為唯一離子性界面活性劑及Brij® 35之Px R1試劑組合物因潤洗攜移(即潤洗液含Brij® 35和SDS，見實例5)而進入R1相中。根據本發明發現而進行的測試方法中，Px R1試劑組合物兼含陰離子性界面活性劑SDS和非離子性界

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(76)

面活性劑Brij® 35，及潤洗溶液不含SDS及Brij®。

亦分析用其他Px1試劑組合物之Px方法的功效，其中陰離子性界面活性劑SDS以陽離子性、四級銨鹵化物界面活性劑TTAB取代，濃度為0.12克/升，或以兩性離子性界面活性劑TDAPS取代，濃度為0.12克/升。得自含0.12克/升TTAB和0.12克/升Brij® 35("試劑1")之R1試劑的結果出人意外-未得到過氧化酶數據，因紅血球溶解不良，導致細胞圖左側有紅血球的條紋。相對的，含0.12克/升TDAPS和0.12克/升Brij® 35之R1試劑則在以過氧化酶方法中用第1天和第2天血樣分析都提供可接受的數據(見表11)。該等結果顯示，如TDAPS之兩性離子性界面活性劑適合和非離子性界面活性劑併用於本發明過氧化酶方法之Px R1試劑組合物中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (77)

表 11: 用含雙重界面活性劑之 R1 試劑組合物進行過氧化酶方法之功效，其調製成含 Brij® 35 和陽離子性或兩性離子性界面活性劑

第 1 天												
試劑	Px R1 界面活性劑	WBCP	%N	%LYM	%M	%EOS	%LUC	%NOIS	界面活性劑種類	結構疏水物	結構親水物	
Std	SDS	6.09	60.2	27.1	7.6	1.9	2.4	19.6	A	C ₁₁ H ₂₃ O	SO ₃ ⁻	
sd		0.11	0.5	0.6	0.2	0.3	0.4	0.8				
1	TTAB 及 Brij® 35	N.D. (紅血球未溶解)						N.D.	N.D.	C,N	C ₁₁ H ₂₃	N(CH ₃) ₃ ⁺
2	TDAPS† 及 Brij® 35	6.01	61.4	27.2	*5.8	2.4	2.6	20.9	Z,N	C ₁₁ H ₂₃		
sd		0.04	0.8	0.7	0.5	0.2	0.2	0.7				
acc. spec		0.15	1	0.5	0.5	0.2	0.5	無				
sd spec		0.16	1.4	1.1	0.9	0.5	0.5	無				
第 2 天												
試劑		WBCP	%NEU	%LYM	MON	%EOS	%LUC	%NOIS				
Std		5.96	61.5	25.8	8.1	1.5	2.3	17.6				
1	TTAB 及 Brij® 35	N.D.	N.D.			N.D.	N.D.	N.D.				
2	TDAPS† 及 Brij® 35	5.81	62.0	26.6	6.6	*2.0	2.1	17.2				
acc. spec												
陳化		0.32	2.8	2.2	1.8	1.0	1.0	無				
* 透過自動化血液學分析儀說明 † TDAPS = N-十四基-N, N-二甲基-3-胺基-1-丙烷磺酸鹽 界面活性劑種類: A=陰離子性(如 SDS); C=陽離子性(如 TTAB); Z=兩性離子性(如 TDAPS); 及 N=非離子性(如 Brij® 35). N, D: 因細胞未溶解而得到數據 CH ₂ (CH ₂) ₁₁ -N(CH ₂) ₂ (CH ₂) ₂ -SO ₃ ⁻ . 親水物 = -N(CH ₃) ₂ (CH ₂) ₂ -SO ₃ ⁻ TDAPS 是兩性離子性，在 N 上有 "+" 價，在 O 上有 "-" 價 TTAB: 溴化十四基三甲基胺；抗衡離子是 Br ⁻												

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (78)

摘要而言，實例7-9中之實驗中，具HLB值介於約7.7和8.9之聚乙氧酸酯化之醇和酚無法接受作為Px R1試劑組合物中非離子性界面活性劑Brij[®] 35之替代物。Pluronic P105，一種嵌段共聚物(聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯)亦不適合和離子性界面活性劑SDS併用於Px R1試劑組合物中(其在細胞圖中造成高5雜訊)。發現陽離子性界面活性劑(如TTAB)不適合作為Px R1試劑組合物中SDS之替代物。然而，發現兩性離子性界面活性劑(如TDAPS)是SDS之可接受和有用的替代物。

所有引據之專利申請案、專利、書籍和發表之文獻和參考文獻都全文列為本案之參考資料。

上述組合物可製成各種不同改變而不偏離本發明之範圍和精神，上述說明、附圖和申請專利範圍之內容應解釋為說明性而非限制性的。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

四、中文發明摘要 (發明之名稱：利用白血球之內過氧化酶的表現新鮮及陳化之全血樣的白血球差式計數的改良方法與試劑組合物)

本發明提供一種改良的試劑組合物和方法，使用新鮮和陳化之血液樣本來進行白血球差式計數和亞群分析，其具有精密性和準確性。本發明特別適合用於分析貯存在室溫下超過一天的陳化血液樣本，可自樣本中得到正確而有用的資料，這通常是被認為不是最佳狀況。此改良的試劑組合物和方法特別是關於白血球差式決定的過氧化酶方法。本發明一方面係包括供進行差式計數過氧化酶方法之改良水性試劑組合物。本發明另一方面則包括使用不含溶血界面活性劑之潤洗循環和潤洗溶液，以避免潤洗攜移 (carryover) 之不良作用，並使分析方法合理化和經濟化，特別是當分析是在自動化血液學分析儀和流動式細胞分析系

英文發明摘要 (發明之名稱：IMPROVED METHOD AND REAGENT COMPOSITION FOR PERFORMING LEUKOCYTE DIFFERENTIAL COUNTS ON FRESH AND AGED WHOLE BLOOD SAMPLES, BASED ON INTRINSIC PEROXIDASE ACTIVITY OF LEUKOCYTES)

The present invention provides an improved reagent composition and method to perform white blood cell differential counting and subpopulation analysis using both fresh and aged blood samples with accuracy and precision. The invention is particularly applicable for the analysis of aged blood samples that have been stored at room temperature for over a day, thereby allowing accurate and useful information to be obtained from samples that are normally considered to be suboptimal. The improved reagent composition and method are particularly related to the peroxidase method of white blood cell differential determinations. One aspect of the invention includes an improved aqueous reagent composition for carrying out the peroxidase method of differential counting. Another aspect includes the use of a rinse cycle and rinse solution devoid of hemolytic surfactant to alleviate the adverse effects of rinse carryover and to streamline and economize the analytical process, particularly when the analyses are performed on automated hematology analyzers and flow cytometry systems. The composition and method of the invention provide clinically useful data for the differential analysis of whole blood samples.

四、中文發明摘要 (發明之名稱:)

統上進行時。本發明組合物和方法提供臨床上有用的數據，可供全血樣本的差式分析。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

英文發明摘要 (發明之名稱:)

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

六、申請專利範圍

1. 一種對含紅血球和白血球之新鮮或陳化全血樣進行白血球差式計數及亞群分析之改良方法，該方法之基礎為該樣本中白血球亞群之內過氧化酶活性，其包括下列步驟：

a) 該血樣與一種水性試劑組合物混合形成均勻的反應混合物，該試劑組合物包括：(i) 一種非離子性聚乙氧酸酯界面活性劑，其濃度可有效溶解紅血球以釋出血紅素但不溶解血樣中之白血球族群；(ii) 一種陰離子性或兩性離子性之離子性界面活性劑，其濃度可有效溶解紅血球以釋出血紅素但不溶解血樣中之白血球族群；(iii) 甲醛或三聚甲醛，其濃度可有效地將白血球交聯但不將血樣中可溶解之紅血球交聯；(iv) 糖或糖醇，其濃度可有效增加樣本中淋巴球之可偵測性；及(v) 一種緩衝劑或緩衝劑混合物，以維持該反應混合物在中性或近中性pH，介於6.8至8.0之間；

b) 將步驟a)之反應混合物加熱至60°C至75°C，以使樣本中之紅血球溶解及使白血球固定；及

c) 將該反應混合物中之白血球的至少一部份染色，以在懸浮液中產生被染色之白血球族群及未被染色之白血球族群；

其中該水性試劑組合物中同時存在有非離子性界面活性劑及離子性界面活性劑，因此對新鮮血樣及取出後在室溫下儲存至少一天之陳化血樣，在步驟c)之後，都可得到白血球差式計數結果。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

2. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中步驟a)i)之非離子性界面活性劑具有親水性親脂性平衡或HLB值介於9.3至17.5之間。
3. 根據申請專利範圍第2項之方法，其中該非離子性界面活性劑之HLB值介於9.5至17.3之間。
4. 根據申請專利範圍第3項之方法，其中該非離子性界面活性劑之HLB值介於9.7至16.9之間。
5. 根據申請專利範圍第1項之方法，該方法之基礎為該樣本中白血球亞群之內過氧化酶活性，其包括下列步驟：
 - a) 該血樣與一種水性試劑組合物混合形成一個反應混合物，該試劑組合物包括：
 - (i) 一種非離子性聚乙氧酸酯界面活性劑，其具有親水性親脂性平衡或HLB值介於9.3至17.5之間，濃度可有效溶解紅血球以釋出血紅素但不溶解血樣中之白血球族群；
 - (ii) 一種陰離子性或兩性離子性之離子性界面活性劑，其濃度可有效溶解紅血球以釋出血紅素但不溶解血樣中之白血球族群；
 - (iii) 甲醛或三聚甲醛，其濃度可有效地將白血球交聯但不將血樣中可溶解之紅血球交聯；
 - (iv) 糖或糖醇，其濃度可有效增加樣本中淋巴球之偵測性；及
 - (v) 一種緩衝劑或緩衝劑混合物，以維持該反應混合物在中性或近中性pH，介於6.8至8.0之間；
 - b) 將步驟a)之反應混合物加熱至60°C至75°C，以使樣本中之紅血球溶解及使白血球固定；及

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

c) 將該反應混合物中之白血球的至少一部份染色，以在懸浮液中產生被染色之白血球族群及未被染色之白血球族群；

其中該水性試劑組合物中同時存在有非離子性界面活性劑及離子性界面活性劑，因此對新鮮血樣及取出後在室溫下儲存至少一天之陳化血樣，在步驟c)之後，都可得到白血球差式計數結果。

6. 根據申請專利範圍第5項之方法，其中該非離子性界面活性劑之HLB值介於9.5至17.3之間。
7. 根據申請專利範圍第6項之方法，其中該非離子性界面活性劑之HLB值介於9.7至16.9之間。
8. 根據申請專利範圍第1或5項之方法，其中該非離子性聚乙氧酸酯界面活性劑係選自下列族群：直鏈脂族疏水物經醚化為聚乙二醇；支鏈脂族或芳香族辛苯基疏水物經醚化為聚乙二醇；直鏈脂族或芳香族壬苯基疏水物經醚化為聚乙二醇；及直鏈脂族脂肪酸經酯化為聚乙二醇。
9. 根據申請專利範圍第8項之方法，其中該非離子性界面活性劑直鏈脂族疏水物經醚化為聚乙二醇。
10. 根據申請專利範圍第9項之方法，其中該非離子性界面活性劑為Brij[®] 35。
11. 根據申請專利範圍第8項之方法，其中該非離子性界面活性劑支鏈脂族或芳香族辛苯基疏水物經醚化為聚乙二醇。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

12. 根據申請專利範圍第11項之方法，其中該非離子性界面活性劑為Triton X[®]-100。
13. 根據申請專利範圍第1或5項之方法，其中該非離子性聚乙氧酸酯界面活性劑存在於步驟a)水性試劑組合物中之量為0.09克/升至0.21克/升。
14. 根據申請專利範圍第1或5項之方法，其中該非離子性界面活性劑為陰離子性類。
15. 根據申請專利範圍第14項之方法，其中該陰離子性界面活性劑包括含10至16碳原子之硫酸烷酯之鹼金屬鹽。
16. 根據申請專利範圍第15項之方法，其中該陰離子性界面活性劑包括硫酸十二烷酯之鹼金屬鹽。
17. 根據申請專利範圍第16項之方法，其中該陰離子性界面活性劑為硫酸十二烷酯鈉。
18. 根據申請專利範圍第1或5項之方法，其中該離子性界面活性劑為一種兩性離子性界面活性劑。
19. 根據申請專利範圍第18項之方法，其中該兩性離子性界面活性劑為磺基甜菜鹼。
20. 根據申請專利範圍第19項之方法，其中該磺基甜菜鹼為十四基二甲基胺基丙烷磺酸酯(TDAPS)或癸基二甲基胺基丙烷磺酸酯(DDAPS)。
21. 根據申請專利範圍第18項之方法，其中該兩性離子性界面活性劑為一種膽酸之衍生物。
22. 根據申請專利範圍第21項之方法，其中該膽酸之衍生

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

第

六、申請專利範圍

- 物為3-[(3-氯醯胺丙基)二甲基胺基]-2-羥基-1-丙烷磺酸酯。
23. 根據申請專利範圍第14項之方法，其中該陰離子性或兩性離子界面活性劑存在於步驟a)試劑組合物中之量為0.050克/升至0.125克/升。
24. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該陰離子性或兩性離子界面活性劑存在於步驟a)試劑組合物中之量為0.050克/升至0.125克/升。
25. 根據申請專利範圍第1或5項之方法，其中步驟a)水性試劑組合物進一步包括一種多價金屬離子之螯合劑。
26. 根據申請專利範圍第25項之方法，其中多價金屬離子螯合劑EDTA；EGTA；EDTA或EGTA之鈉鹽；EDTA或EGTA之三鈉鹽；或EDTA或EGTA之四鈉鹽，其濃度為1 mM至5 mM。
27. 根據申請專利範圍第1或5項之方法，其中步驟a)水性試劑組合物進一步包括一種氯化鹼金屬鹽。
28. 根據申請專利範圍第27項之方法，其中該步驟a)水性試劑組合物中之氯化鹼金屬鹽係選自由NaCl，KCl和LiCl所組成之族群。
29. 根據申請專利範圍第28項之方法，其中該鹽係NaCl，其存在於該試劑組合物中之量為6.8 mM至10.3 mM。
30. 根據申請專利範圍第1或5項之方法，其中甲醛存在於

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

該試劑組合物中之濃度為52克/升至58克/升。

31. 根據申請專利範圍第1或5項之方法，其中該緩衝劑或緩衝劑混合物保持該水性試劑組合物之pH介於7.0至7.4之間。
32. 根據申請專利範圍第1或5項之方法，其中該緩衝劑包括 Na_2HPO_4 和 NaH_2PO_4 之緩衝劑混合物。
33. 根據申請專利範圍第1或5項之方法，其中該染色步驟涉及具過氧化酶活性之白血球之過氧化酶染色。
34. 根據申請專利範圍第33項之方法，其中該染色步驟包括將該反應混合物很快的與過氧化氫和色原質混合。
35. 根據申請專利範圍第34項之方法，其中該色原質為4-氯-1-奈酚。
36. 根據申請專利範圍第1或5項之方法，其中該糖和糖醇係選自由蔗糖、果糖、葡萄糖、葡萄糖醇和甘露糖醇所組成之族群。
37. 根據申請專利範圍第36項之方法，其中該糖醇係葡萄糖醇。
38. 根據申請專利範圍第37項之方法，其中該葡萄糖醇存在於步驟a)試劑組合物中之量為110克/升至120克/升。
39. 根據申請專利範圍第1或5項之方法，其進一步包括將步驟之染色及未染色白血球懸浮液通過一個電子光學系統，及得到懸浮液中白血球之差式計數。
40. 根據申請專利範圍第39項之方法，其中該步驟係在自

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

動化血液學分析儀之反應室中進行。

41. 根據申請專利範圍第40項之方法，其在進行差式計數方法之步驟a)至c)後，進一步包括步驟d)，以水性潤洗試劑組合物潤洗該自動化分析儀之反應室，該水性潤洗試劑組合物包括非溶血性非離子性界面活性劑，其為環氧乙烷和環氧丙烷之共聚物，較佳的分子量為950至8000聚氧丙烯和10%至80%聚氧乙烯。
42. 根據申請專利範圍第41項之方法，其中該潤洗試劑組合物所含之界面活性劑為普魯羅(Pluronic)類之一員。
43. 根據申請專利範圍第42項之方法，其中該普魯羅為Pluronic P105。
44. 根據申請專利範圍第41項之方法，其中該潤洗試劑組合物進一步包括一或多種下列成份：一種氯化鹼金屬鹽，選自由NaCl、KCl和LiCl所組成之族群；一種抗菌化合物，選自由Proclin 150, Proclin 300, Germall 115, Dowacil 200和Bronopol所組成之族群；一種抗氧化化合物，選自3, 3'-硫二丙酸，3, 3'-二硫乙酸，TroloxTM或維生素E，BHT或2, 6-二第三丁基-4-甲基酚，BHA或2-第三丁基-4-甲氧基酚，及MEHQ或-甲氧基酚；及一種緩衝劑或緩衝劑混合物以維持該水性潤洗組合物之pH在6.9至7.6。
45. 根據申請專利範圍第41項之方法，其中該水性潤洗試劑組合物具有滲透性介於285 mOsmol/kg至305

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

mOsmol/kg。

46. 根據申請專利範圍第44項之方法，其中該潤洗試劑組合物包括NaCl，Proclin 150，3，3'-硫二丙酸及一種緩衝劑或緩衝劑混合物以維持該水性潤洗組合物之pH在7.0至7.5。
47. 根據申請專利範圍第46項之方法，其中在該潤洗試劑組合物中，NaCl存在之濃度為7.40克/升至8.0克/升，Proclin 150存在之濃度為0.25毫升/升至0.60毫升/升，及3，3'-硫二丙酸存在之濃度為50毫克/升至150毫克/升。
48. 一種用於對全血樣進行白血球差式計數及亞群分析之改良試劑組合物，該差式計數之基礎為測定該樣本中白血球亞群之內過氧化酶活性，其水性混合物包括下列成份：
- (a) 一種非離子性聚乙氧酸酯界面活性劑，其濃度可有效溶解紅血球以釋出血紅素但不溶解樣本中之白血球族群；
- (b) 一種陰離子性或兩性離子性界面活性劑，其濃度可有效溶解紅血球以釋出血紅素但不溶解樣本中之白血球族群；
- (c) 一種糖或糖醇，其濃度可有效增加樣本中淋巴球之可偵測性；
- (d) 甲醛或三聚甲醛，其濃度可有效地將白血球交聯但不將樣本中可溶解之紅血球交聯；及

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

(e) 一種緩衝劑或緩衝劑混合物，以維持該試劑混合物之pH介於6.8至8.0之間。

49. 根據申請專利範圍第48項之組合物，其中該非離子性界面活性劑具有親水性親脂性平衡或HLB值介於9.3至17.3之間。

50. 根據申請專利範圍第49項之組合物，其中該非離子性界面活性劑之HLB值介於9.7至16.9之間。

51. 根據申請專利範圍第48項之組合物，其進一步包括一種多價金屬離子之螯合劑。

52. 一種在全血樣白血球差式計數及亞群分析中用來溶解紅血球及染色淋巴球之改良試劑組合物，該差式計數之基礎為測定該血樣中淋巴球亞群之內過氧化酶活性，其水性混合物包括下列成份：

(a) 一種非離子性聚乙氧酸酯界面活性劑，其具有親水性親脂性平衡或HLB值介於9.3至17.5之間，濃度可有效溶解紅血球以釋出血紅素但不溶解樣本中之白血球族群；

(b) 一種陰離子性或兩性離子性界面活性劑，其濃度可有效溶解紅血球以釋出血紅素但不溶解樣本中之白血球族群；

(c) 一種糖或糖醇，其濃度可有效增加樣本中淋巴球之可偵測性；

(d) 甲醛或三聚甲醛，其濃度可有效地將白血球交聯但不將樣本中可溶解之紅血球交聯；及

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

- (e) 一種緩衝劑或緩衝劑混合物，以維持該試劑混合物之pH介於6.8至8.0之間。
53. 根據申請專利範圍第48或52項之組合物，其中該非離子性聚乙氧酸酯界面活性劑係選自下列族群：直鏈脂族疏水物經醚化為聚乙二醇；支鏈脂族或芳香族辛苯基疏水物經醚化為聚乙二醇；直鏈脂族或芳香族壬苯基疏水物經醚化為聚乙二醇；及直鏈脂族脂肪酸經酯化為聚乙二醇。
54. 根據申請專利範圍第53項之組合物，其中該非離子性界面活性劑直鏈脂族疏水物經醚化為聚乙二醇。
55. 根據申請專利範圍第54項之組合物，其中該非離子性界面活性劑為Brij[®] 35。
56. 根據申請專利範圍第53項之組合物，其中該非離子性界面活性劑為支鏈脂族或芳香族疏水物經醚化為聚乙二醇。
57. 根據申請專利範圍第56項之組合物，其中該非離子性界面活性劑為Triton X[®]-100。
58. 根據申請專利範圍第48或52項之組合物，其中該非離子性聚乙氧酸酯界面活性劑存在於組合物中之量為0.09克/升至0.20克/升。
59. 根據申請專利範圍第48或52項之組合物，其中該非離子性界面活性劑為陰離子性界面活性劑。
60. 根據申請專利範圍第59項之組合物，其中該陰離子性界面活性劑包括含10至16碳原子之硫酸烷酯之鹼金

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

屬鹽。

61. 根據申請專利範圍第60項之組合物，其中該陰離子性界面活性劑包括硫酸十二烷酯之鹼金屬鹽。
62. 根據申請專利範圍第61項之組合物，其中該陰離子性界面活性劑為硫酸十二烷酯鈉。
63. 根據申請專利範圍第48或52項之組合物，其中該離子性界面活性劑為一種兩性離子性界面活性劑。
64. 根據申請專利範圍第63項之組合物，其中該兩性離子性界面活性劑為磺基甜菜鹼。
65. 根據申請專利範圍第64項之組合物，其中該磺基甜菜鹼為十四基二甲基胺基丙烷磺酸酯(TDAPS)或癸基二甲基胺基丙烷磺酸酯(DDAPS)。
66. 根據申請專利範圍第63項之組合物，其中該兩性離子性界面活性劑為一種膽酸之衍生物。
67. 根據申請專利範圍第66項之組合物，其中該膽酸之衍生物為3-[(3-氯醯胺丙基)二甲基胺基]-2-羥基-1-丙烷磺酸酯。
68. 根據申請專利範圍第48或52項之組合物，其中該陰離子性或兩性離子界面活性劑存在於組合物中之量為0.050克/升至0.125克/升。
69. 根據申請專利範圍第48或52項之組合物，其進一步包括一種氯化鹼金屬鹽。
70. 根據申請專利範圍第69項之組合物，其中該氯化鹼金屬鹽係選自由NaCl, KCl和LiCl所組成之族群。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

71. 根據申請專利範圍第70項之組合物，其中該鹽係NaCl，其存在於該試劑組合物中之量為6.8 mM至10.3 mM。
72. 根據申請專利範圍第48或52項之組合物，其中甲醛存在於該組合物中之濃度為52克/升至58克/升。
73. 根據申請專利範圍第49或52項之組合物，其中該緩衝劑包括Na₂HPO₄和NaH₂PO₄之緩衝劑混合物。
74. 根據申請專利範圍第48或52項之組合物，其中該糖和糖醇係選自由蔗糖、果糖、葡萄糖、葡萄糖醇和甘露糖醇所組成之族群。
75. 根據申請專利範圍第74項之組合物，其中該糖醇係葡萄糖醇。
76. 根據申請專利範圍第75項之組合物，其中該葡萄糖醇存在於組合物中之量為110克/升至120克/升。
77. 根據申請專利範圍第48或52項之組合物，其進一步包括一種多價金屬離子之螯合劑。
78. 根據申請專利範圍第77項之組合物，其中該多價金屬離子螯合劑為EDTA; EGTA; EDTA或EGTA之二鈉鹽; EDTA或EGTA之三鈉鹽; 或EDTA或EGTA之四鈉鹽。
79. 根據申請專利範圍第78項之組合物，其中該多價金屬離子螯合劑為EDTA或EGTA之二鈉鹽，其存在濃度為1 mM至5 mM。
80. 根據申請專利範圍第1項或第5項之方法，其中該緩衝

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

劑或緩衝劑混合物維持該水性反應劑組合物之pH在6.9至7.6之間。

81. 根據申請專利範圍第48項或第52項之組合物，其中該緩衝劑或緩衝劑混合物維持該水性反應劑組合物之pH在6.9至7.6之間。
82. 一種決定白血球細胞差別計數及含有紅血球及白血球之全血血樣中子群偵測之改進方法，此中並利用過氧化酶染色及自動化血液學分析儀進行，此改善方法包括：
 - a) 混合血樣與水性試劑組合物以形成試劑混合物，該試劑組合物包括：
 - (i) 非離子聚乙氧化界面活性劑，其濃度可有效溶解紅血球釋出血紅素，但不會溶解該樣品中之白血球細胞族群；
 - (ii) 陰離子或兩性離子類之離子化界面活性劑，其濃度可有效溶解該紅血球，但不溶解該樣品中之白血球細胞族群；
 - (iii) 甲醛或三聚甲醛，其濃度可有效地化學交聯該白血球，但不會交聯樣品中該可溶解之紅血球；
 - (iv) 糖或糖醇，其濃度可有效增加樣品中淋巴細胞之可偵測度；及
 - (v) 緩衝物質或緩衝物質混合物以維持反應混合物之pH在中性或近中性；
 - b) 加熱a)步驟之反應混合物至60°C至75°C溫度，由是該血樣中之紅血球可被溶解，而白血球被固定；及
 - c) 將反應混合物中至少部份白血球細胞染色，以生成經染色之白血球細胞族群及未經染色之白血球族群於

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

懸液中；其中存在於水性試劑混合物中之非離子界面活性劑及離子性界面活性劑，依循c)步驟可針對新鮮血樣及老化之血樣提供正確及可信賴之白血球細胞差別計數結果，其中老化之血樣係在室溫下貯放至少抽後一天之久；

d)將步驟c)之經染色及未染色之白血球細胞懸液通過光電偵測系統並得到懸液中白血球細胞之差別白血球細胞計數；及

e)以水性沖洗試劑組合物沖洗該自動化分析儀以移去在進行白血球血樣分析後累積在系統硬體部份及其元件中之血樣及試劑混合物，該水性沖洗試劑溶液在摻合物中含有：i)非溶血性及非離子性界面活性劑，其為環氧乙烷及環氧丙烷多元醇終止在第一羥基之嵌段共聚物，其中環氧乙烷在該界面活性劑分子中之重量百分率為由10至80%；且該界面活性劑分子具有由950至8000克/莫耳之分子量；及ii)緩衝物質或其混合物以維持該沖洗試劑組合物在生理pH值下。

83. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中a)步驟之試劑組合物中之非離子性界面活性劑為直鏈脂族疏水物醚化至聚乙二醇上。

84. 根據申請專利範圍第83項之方法，其中該非離子性界面活性劑是Brij[®] 35。

85. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中該a)步驟試劑組合物之陰離子界面活性劑包括含有由10至16個碳原

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

子之硫酸烷酯之鹼金屬鹽。

86. 根據申請專利範圍第85項之方法，其中該陰離子界面活性劑包括硫酸十二酯之鹼金屬鹽。
87. 根據申請專利範圍第86項之方法，其中該陰離子界面活性劑是硫酸十二酯鈉。
88. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中該非離子界面活性劑於a)步驟試劑組合物中之含量為0.09至0.21克/升。
89. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中該陰離子或兩性離子界面活性劑於a)步驟試劑組合物中之含量為0.050至0.125克/升。
90. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中甲醛於a)步驟試劑組合物中之含量為由52至58克/升。
91. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中a)步驟試劑組合物進一步含有鹼金屬氯化物，選自NaCl、KCl及LiCl。
92. 根據申請專利範圍第91項之方法，其中該鹽是NaCl，且於試劑中之含量為由6.8 mM至10.3 mM。
93. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中該緩衝物質或其混合物可維持a)步驟之試劑溶液pH值在7.0至7.5間。
94. 根據申請專利範圍第93項之方法，其中a)步驟試劑中之緩衝物質包括 Na_2HPO_4 ， NaH_2PO_4 或其混合物。
95. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中a)步驟試劑組

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

- 合物進一步包括多價硬體離子之螯合物，選自下列包括EDTA、EGTA、及EDTA或EGTA之二、三或四鈉。
96. 根據申請專利範圍第95項之方法，其中該硬體離子螯合物於該試劑組合物中之濃度為1 mM至5 mM。
97. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中該d)步驟染色涉及過氧化酶活性白血球之過氧化酶染色，係以過氧化氫及色原快速混合該反應混合物。
98. 根據申請專利範圍第97項之方法，其中該色原是4-氯-1-萘酚。
99. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中a)步驟之試劑組合物進一步包括以山梨糖醇為該糖醇，其在試劑組合物中之濃度為由110.0克/升至120.0克/升。
100. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中該e)步驟沖洗中之界面活性劑係選自Pluronic P84，P85，P103，P105及P123。
101. 根據申請專利範圍第100項之方法，其中該e)步驟沖洗中之界面活性劑為P105。
102. 根據申請專利範圍第82項之方法，其進一步在e)步驟之沖洗試劑組合物中包括鹼金屬鹽。
103. 根據申請專利範圍第102項之方法，其中於e)步驟該沖洗試劑組合物中之鹼金屬氯化物鹽為NaCl、KCl或LiCl。
104. 根據申請專利範圍第103項之方法，其中該鹼金屬氯化物是NaCl。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

105. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中該e)步驟沖洗試劑組合物進一步含有抗菌化合物，選自下列包括 Proclin 150、Proclin 300、Germall 115、Dowacil 200及Bronopol。
106. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中e)步驟之沖洗試劑組合物進一步含有抗氧化劑，選自下列包括3,3'-硫二丙酸、3,3'-二硫醋酸、Trolox™或水溶性維生素E、BHT或2,6-二-第三、丁基-4-甲基酚，BHA或2-第三、丁基-4-甲氧基酚，及MEHQ或*p*-甲氧基酚。
107. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中e)步驟沖洗試劑組合物具有由285m Osmol/公斤至305m Osmol/公斤之滲透度，且進一步其中該緩衝物質維持由6.8至7.6之pH值。
108. 根據申請專利範圍第82項之方法，其中e)步驟沖洗試劑組合物中的緩衝物質或緩衝物質混合物維持由6.9至7.5之pH值。

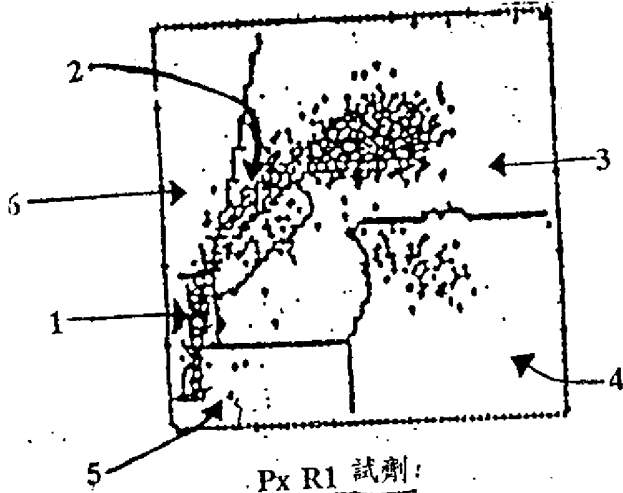
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

圖 1A

第 1 天樣本

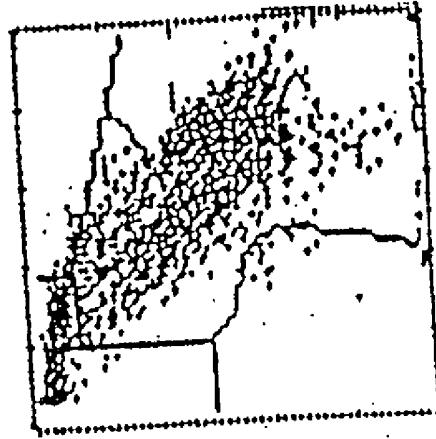


Px R1 試劑：
0.105 克/升 SDS

潤洗： 3.0 克/升 Brij® 35 及
2.0 克/升 SDS

圖 1B

第 2 天樣本

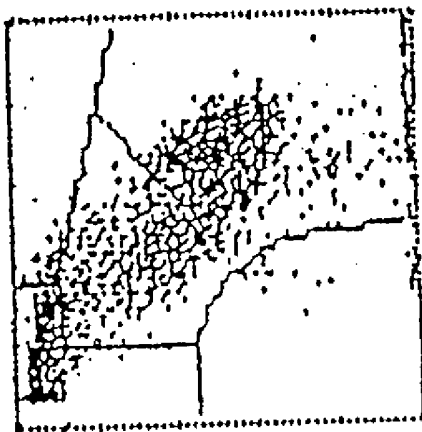


Px R1 試劑：
0.105 克/升 SDS

潤洗： 3.0 克/升 Brij® 35 及
2.0 克/升 SDS

圖 1C

第 2 天樣本

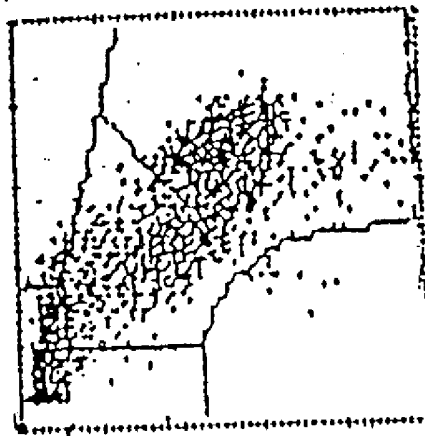


Px R1 試劑：
0.105 g/L SDS

潤洗： 1.0 克/升 Pluronic P105
於 PBS 中

圖 1D

第 2 天樣本

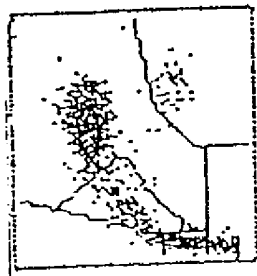


Px R1 試劑：
0.17 g/L SDS

潤洗： 1.0 克/升 Pluronic P105
於 PBS 中

圖 2A-2J

圖 2A



第 1 天血樣

圖 2B

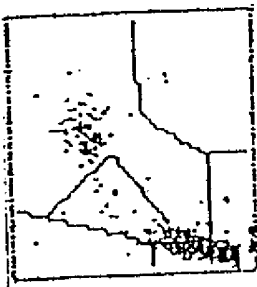


圖 2C

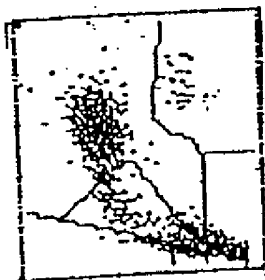


圖 2D

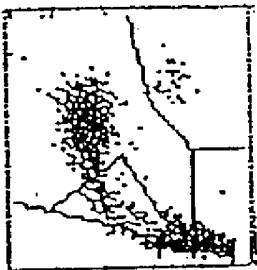
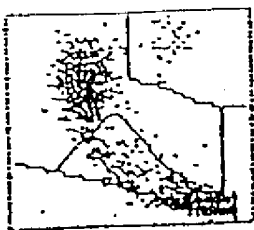


圖 2E



Brij® 35
(克/升) 0.12

SDS
(克/升) 0.105

0.0

0.0

0.14

0.0

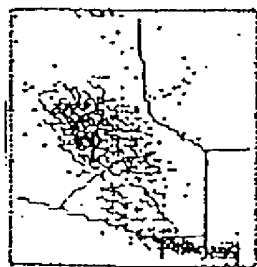
0.28

0.0

0.42

0.0

圖 2F



第 2 天血樣

圖 2G

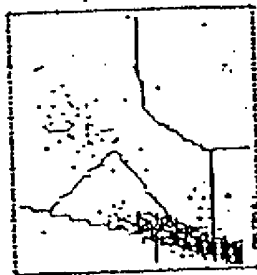


圖 2H

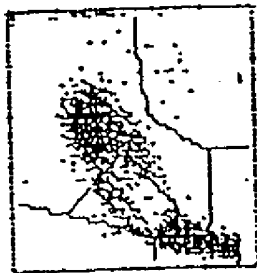


圖 2I

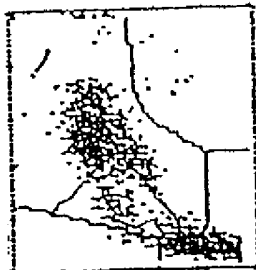
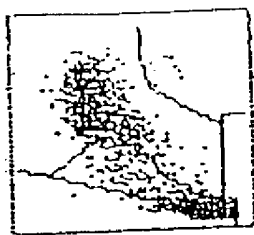


圖 2J



第 1 天血樣

第 1 天血樣

圖 3A

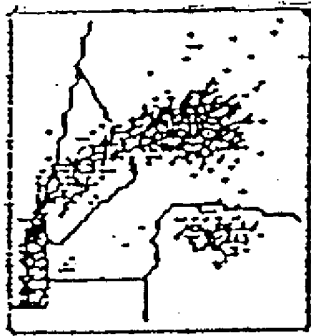
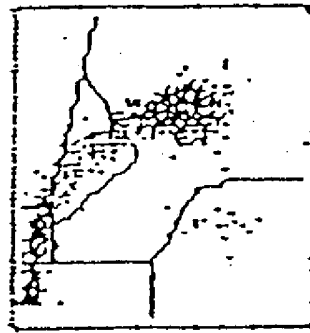


圖 3B



Px R1 試劑 :

Brij® 35 (克/升)

0.0

0.0

+

SDS (克/升)

0.105

0.105

潤洗 :

Brij® 35 (克/升)

3.0

0.0

+

SDS (克/升)

2.0

2.0

第 2 天血樣

第 2 天血樣

圖 3C

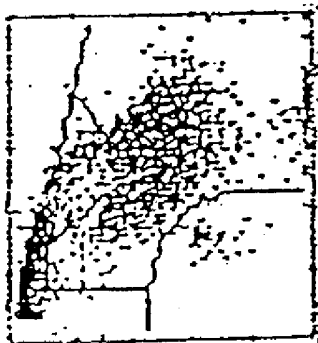
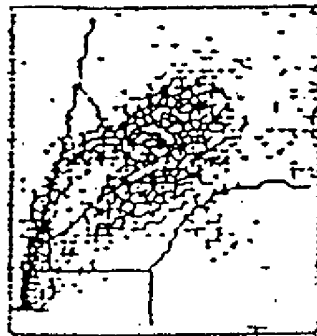


圖 3D



Px R1 試劑 :

Brij® 35 (克/升)

0.0

0.12

+

SDS (g/L)

0.105

0.105

潤洗 :

Brij® 35 (克/升)

0.0

0.0

SDS (克/升)

2.0

0.0

Pluronic P105

1.0

於 PBS (克/升) 中

448295

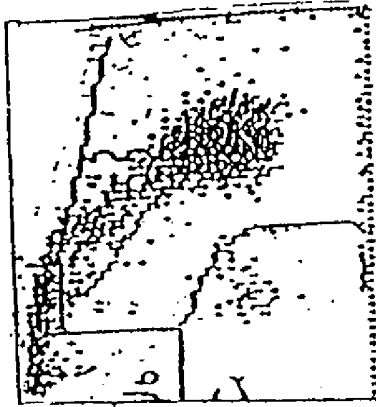
圖 4A-4F

Px R1 試劑
0.105克/升 SDS

潤洗 : 2.0 克/升 SDS

潤洗 : 2.0 克/升 SDS
+ 3.0 克/升 Brij® 35

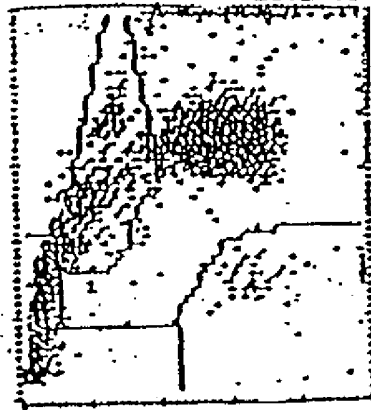
圖 4A



潤洗攜移體積
(微升):

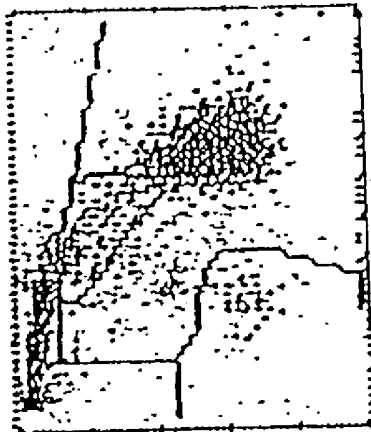
7.9

圖 4B



7.9

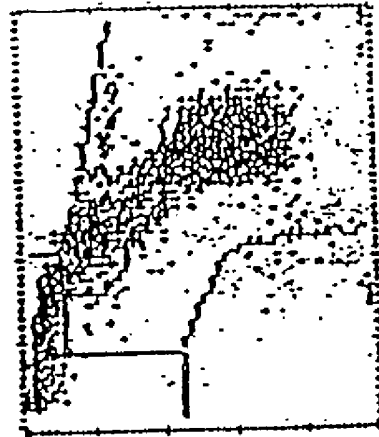
圖 4C



潤洗攜移體積
(微升):

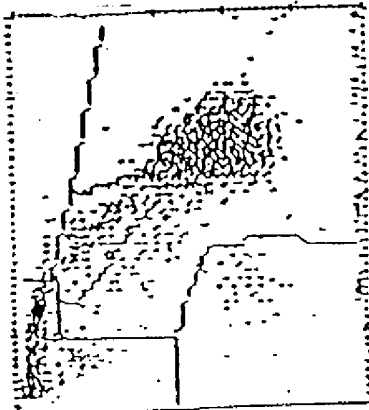
10.1

圖 4D



10.1

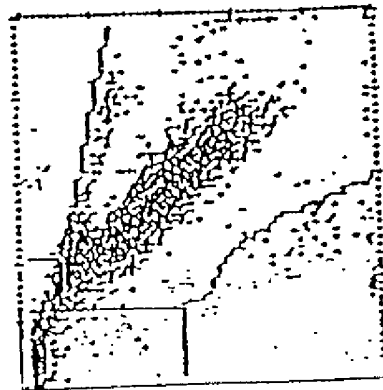
圖 4E



潤洗攜移體積
(微升):

13.3

圖 4F



13.3

五、發明說明(29)

劑對半-和全-自動化系統特別有利和有用，特別是 TECHNICON H●1TM，H●2TM和H●3TM系統等，其可快速進行白血球差式計數之過氧化酶方法。本發明潤洗試劑描述於同在申請中之美國專利申請序號08/442,363中，於1995年5月16日提出申請，名稱爲"可用於全血樣血液學分析之通用潤洗試劑組合物"，讓與給本發明之受讓人。

可用於改良白血球差式計數方法中之潤洗試劑組合物包括一或多種緩衝劑或化合物或其混合物，例如，單鹼基磷酸鈉和雙鹼基磷酸鈉，以使pH和滲透性接近生理值，例如，pH爲約6.9至約7.6，較佳pH爲約7.0至約7.3，及滲透性值約300 mOsmol/kg;抗菌化合物以阻滯微生物生長；非溶血性界面活性劑，如Pluronics，如P84, P85, P104, P104, P105和P123 (P105爲較佳，因在潤洗溶液中之用量時爲非溶解性，其分子量約6500，及包括以重量計約50%聚氧乙烯)；鹼金屬氯化鹽類，如NaCl, KCl, LiCl等。適當抗菌劑之非限制性例子有Proclin 150 (2-甲基-4-異噻唑啉-3-酮)和Proclin 300 (5-氯-2-甲基-4-異噻唑啉-3-酮)(Rohm & Haas); Germall 115 (N, N'-亞甲基雙[N'-(1-羥甲基)-2, 5-二氧-4-四氫咪唑基]脲)(Sutton Laboratories); Dowacil 200 (1-(3-氯丙烯基)-3, 5, 7-三氯-1-氮鎗金鋼烷氯化物)(Dow Chemical); 及Bronopol (Angus Chemical Company)。Proclin 150是用於潤洗組合物中之較佳者。

亦可使用水溶性抗氧化劑化合物以穩定潤洗試劑組合物中之非溶血性界面活性劑，抗氧化劑化合物的例子有3，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (30)

3'-硫二丙酸; 3, 3'-二硫乙酸; Trolox[®] (即水溶性維生素 E, 赫夫孟拉羅); BHT, 丁基化羥甲苯或(2, 6-二第三丁基-4-甲基苯酚); BHA, 丁基化羥基苯甲醚或(2-第三丁基-4-甲氧基苯酚); 及MEHQ(ρ -甲氧基苯酚); 或其混合物。3, 3'-硫二丙酸為用於組合物中之較佳者。潤洗溶液之最終滲透性為約285 mOsm/kg至約305 mOsm/kg。

在最簡單的配方中, 潤洗試劑可包括磷酸緩衝劑(如磷酸緩衝食鹽水, pH為約6.8至7.8)及Pluronic族或類之非離子性和非溶血性界面活性劑。Pluronic為聚氧乙烯和聚氧丙烯之嵌段共聚物, 其結構為(EO)_x-(PO)_y-(EO)_x(見 Pluronic & Tetronic Surfactants, BASF Corporation, Parsippany, New Jersey, 1987), 其係用環氧丙烷之控制聚合作用合成聚丙二醇單元而形成。由於Pluronic之分子量可由約950至約14600克/莫耳, 及(PO)可包括以重量計約20至90%, 所以"y"可在約3至62單元之範圍內。接著, EO聚合鏈在聚(PO)單元之二邊形成, 產生Pluronic共聚物。此技術領域中之人士知道, EO聚合作用可對稱控制, 所以"x"在Pluronic分子之各邊或各端大致相等。可用於通用潤洗組合物中之適當Pluronic的"x"和"y"非限制性例子如下:"x"為約1至36單元, 更佳為約7至27, 及"y"較佳約14至48單元。

適用於潤洗試劑中之Pluronic具有%EO值以重量計為約20至80%, 分子量為約2000至約8000克/莫耳。更佳地, %EO以重量計在約30至70%範圍內, 分子量在約3000至約7000範圍內。例如, Pluronic P105和P85具有%EO值以重量計為約50%, 及Pluronic P104和P84具有%EO值以重

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

1. 一種對含紅血球和白血球之新鮮或陳化全血樣進行白血球差式計數及亞群分析之改良方法，該方法之基礎為該樣本中白血球亞群之內過氧化酶活性，其包括下列步驟：

a) 該血樣與一種水性試劑組合物混合形成均勻的反應混合物，該試劑組合物包括：(i) 一種非離子性聚乙氧酸酯界面活性劑，其濃度可有效溶解紅血球以釋出血紅素但不溶解血樣中之白血球族群；(ii) 一種陰離子性或兩性離子性之離子性界面活性劑，其濃度可有效溶解紅血球以釋出血紅素但不溶解血樣中之白血球族群；(iii) 甲醛或三聚甲醛，其濃度可有效地將白血球交聯但不將血樣中可溶解之紅血球交聯；(iv) 糖或糖醇，其濃度可有效增加樣本中淋巴球之可偵測性；及(v) 一種緩衝劑或緩衝劑混合物，以維持該反應混合物在中性或近中性pH，介於6.8至8.0之間；

b) 將步驟a)之反應混合物加熱至60°C至75°C，以使樣本中之紅血球溶解及使白血球固定；及

c) 將該反應混合物中之白血球的至少一部份染色，以在懸浮液中產生被染色之白血球族群及未被染色之白血球族群；

其中該水性試劑組合物中同時存在有非離子性界面活性劑及離子性界面活性劑，因此對新鮮血樣及取出後在室溫下儲存至少一天之陳化血樣，在步驟c)之後，都可得到白血球差式計數結果。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線