



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0908250-6 B1



(22) Data do Depósito: 17/02/2009

(45) Data de Concessão: 09/11/2021

(54) Título: CONJUNTO DE REAGENTES PARA MEDIÇÃO DE PLAQUETAS SANGUÍNEAS E SEUS MÉTODOS

(51) Int.Cl.: G01N 33/49; G01N 33/48; G01N 33/483.

(30) Prioridade Unionista: 18/02/2008 JP 2008-036013; 26/03/2008 JP 2008-079785; 26/09/2008 JP 2008-247484.

(73) Titular(es): SYSMEX CORPORATION.

(72) Inventor(es): YUHI SUZUKI; KEIKO MORIYAMA; YUSUKE MORI; HIROKI TAKESHITA.

(86) Pedido PCT: PCT JP2009052685 de 17/02/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/104598 de 27/08/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 18/08/2010

(57) Resumo: REAGENTE PARA MEDIÇÃO DE PLAQUETA, CONJUNTO DE REAGENTES PARA MEDIÇÃO DE PLAQUETAS E MÉTODO DE MEDIÇÃO DE PLAQUETAS. A presente invenção refere-se a um reagente para medir plaquetas que compreende hidrogenossulfato do azul do nilo, ou azul do nilo e um ácido, um conjunto de reagentes para medir as plaquetas que compreende o reagente para medir as plaquetas e um método para medir as plaquetas usando reagente ou conjunto de reagentes.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"CONJUNTO DE REAGENTES PARA MEDIÇÃO DE PLAQUETAS SANGUÍNEAS E SEUS MÉTODOS"**.

CAMPO TÉCNICO

[001] A presente invenção refere-se a um reagente para medição de plaquetas, um conjunto de reagentes para medição de plaquetas e um método para medição de plaquetas usando o mesmo. Mais especificamente, a presente invenção refere-se ao reagente para a medição de plaquetas compreendendo azul do nilo, particularmente hidrogenossulfato do azul do nilo.

ANTECEDENTES DA TÉCNICA

[002] Métodos são conhecidos nos quais as células sanguíneas, isto é, leucócitos, reticulócitos, eritrócitos e assim por diante são rapidamente medidos pelo uso do princípio da citometria de fluxo.

[003] Como um de tais métodos de medição, por exemplo, a Patente U.S. Nº 6.114.173 descreve um método para contar e detectar reticulócitos, eritrócitos e plaquetas nas amostras de sangue total, bem como uma composição de reagente usada para o método. Especificamente, os reticulócitos são tingidos com uma mistura de reagente contendo um corante catiônico, particularmente Oxazina 750 e seu sinal de luz dispersa e sinal de absorvência da luz são medidos usando a citometria de fluxo. A seguir, os eritrócitos e reticulócitos nas amostras sanguíneas são diferenciados pela diferença nos sinais de absorvência e o grupo de eritrócitos e reticulócitos e plaquetas são diferenciados pela diferença nos sinais da luz dispersa, de modo a determinar os números totais de cada espécie.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Problema técnico

[004] É conhecido que células vermelhas fragmentadas, lipídeos e assim por diante que ocorrem no sangue são similares em tamanho

como as plaquetas, de modo que eles afetam as medições como contaminantes. Especialmente, as amostras que contêm poucas plaquetas para as quais a transfusão de sangue pode ser requerida são mais significativamente afetadas por esses contaminantes com as medições. Tal problema pode ocorrer no método descrito na Patente U.S. No 6.114.173. Entretanto, a Patente U.S. No 6.114.173 não descreve que as plaquetas são medidas impedindo qualquer efeito pelos contaminantes.

[005] Além disso, os corantes que podem tingir as plaquetas podem ser degradados em solução através do tempo. As medições de plaquetas pela citometria de fluxo são executadas detectando a luz dispersa e a fluorescência obtidas pela aplicação de luz nas células tingidas com o corante nas amostras. Entretanto, quando uma solução de corante é usada na qual a quantidade do corante contido para a tintura da plaqueta foi diminuída, a luz dispersa ou fluorescência precisa não pode ser obtida e resultados de medição precisos não podem ser obtidos.

[006] A presente invenção foi imaginada em vista das circunstâncias acima e é planejado proporcionar um reagente e conjunto de reagentes para medir plaquetas que torna possível medir as plaquetas com maior precisão impedindo o efeito dos contaminantes que podem estar contidos nas amostras e impedir a detecção das plaquetas e que têm alta estabilidade de armazenamento. A presente invenção é também planejada para proporcionar um método para medição de plaquetas que torna possível medir as plaquetas com maior precisão.

Meios para resolução dos problemas

[007] Portanto, a presente invenção proporciona um reagente para medição de plaquetas que compreende, como um corante para tingir as plaquetas, azul do nilo tendo íon de hidrogenossulfato como um contra-íon.

[008] A presente invenção também proporciona um conjunto de reagentes para medir as plaquetas que compreende:

[009] um primeiro reagente que compreende, como um corante para tingir as plaquetas, azul do nilo tendo íon de hidrogenossulfato como um contra-íon e

[0010] um segundo reagente compreendendo um agente de tamponamento.

[0011] Além do que, a presente invenção proporciona um método para medição de plaquetas que compreende as etapas de;

[0012] misturar um primeiro reagente que compreende, como um corante para tingir as plaquetas, azul do nilo tendo íon de hidrogenossulfato como um contra-íon e uma amostra com ou sem a adição de um segundo reagente que compreende um agente de tamponamento para preparar uma amostra de medição;

[0013] aplicar luz nas células na amostra de medição obtida para detectar a luz dispersa e a fluorescência emitidas das células; e

[0014] detectar plaquetas contidas na amostra de medição com base na luz dispersa e fluorescência detectadas.

[0015] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona um reagente para medir as plaquetas que compreende, como um corante para tingir as plaquetas, azul do nilo tendo um íon de ácido inorgânico como um contra-íon e um ácido.

[0016] Além do que, a presente invenção proporciona um conjunto de reagentes para medir plaquetas que compreende:

[0017] um primeiro reagente que compreende, como um corante para tingir as plaquetas, azul do nilo tendo um íon de ácido inorgânico como um contra-íon e um ácido e

[0018] um segundo reagente que compreende um agente de tamponamento.

[0019] Além do que, a presente invenção proporciona um método

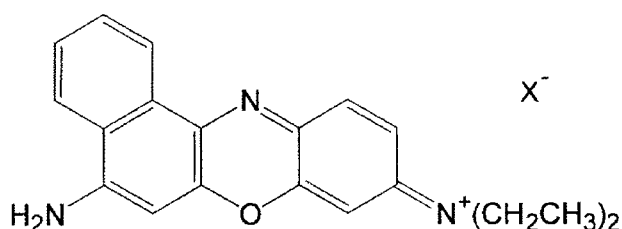
para medição das plaquetas que compreende as etapas de:

[0020] misturar um reagente para medir as plaquetas que compreende azul do nilo e um ácido e uma amostra com ou sem a adição de um segundo reagente que compreende um agente de tamponamento para preparar uma amostra de medição;

[0021] aplicar luz nas células na amostra de medição obtida para detectar a luz dispersa e a fluorescência emitidas das células; e

[0022] detectar plaquetas contidas na amostra de medição com base na luz dispersa e fluorescência detectadas.

[0023] Como usado aqui, "azul do nilo" representa corantes consistindo no composto que é representado por, por exemplo, a seguinte fórmula (II):



(I I)

[0024] onde X- é um ânion,

[0025] e está na forma de um sal com o contra-íon representado por X-. No presente relatório descritivo, os corantes representados pela fórmula (II) na qual o contra-íon representado por X- não é especificamente limitado são chamados meramente "azul do nilo" e os corantes representados pela fórmula (II) na qual o contra-íon é especificamente definido são chamados "azul do nilo XXX (XXX representa um sal com um íon particular)". Por exemplo, o corante tendo íon sulfúrico (1/2 SO42-) como um contra-íon é chamado "sulfato de azul do nilo" e o corante tendo íon de hidrogenossulfato (HSO4-) como um contra-íon é chamado azul do nilo".

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0026] A figura 1 mostra recipientes que podem conter o conjunto

de reagentes para medir as plaquetas da presente invenção.

[0027] A figura 2 é uma vista frontal da constituição esquemática de um analisador de amostra.

[0028] A figura 3 é um diagrama de blocos mostrando a constituição esquemática do analisador de amostra.

[0029] A figura 4 é uma vista plana esquemática mostrando a constituição de uma seção de detecção.

[0030] A figura 5 mostra diagramas de dispersão obtidos pela medição de plaqueta usando o reagente para medir as plaquetas do exemplo experimental 9.

[0031] A figura 6 mostra diagramas de dispersão obtidos pela medição de plaqueta usando o reagente para medir as plaquetas do exemplo experimental 10.

[0032] A figura 7 mostra diagramas de dispersão obtidos pela medição de plaqueta usando o reagente para medir as plaquetas do exemplo experimental 11.

[0033] A figura 8 mostra diagramas de dispersão obtidos pela medição de plaqueta usando o reagente para medir as plaquetas do exemplo experimental 12.

[0034] A figura 9 mostra diagramas de dispersão obtidos pela medição de plaqueta usando o reagente de corante do exemplo experimental 13.

[0035] A figura 10 mostra diagramas de dispersão obtidos pela medição do sangue contendo células vermelhas fragmentadas usando o reagente para medir as plaquetas do exemplo experimental 9.

[0036] A figura 11 mostra diagramas de dispersão obtidos pela medição do sangue contendo partículas de lipídeo usando o reagente para medir as plaquetas do exemplo experimental 9.

[0037] A figura 12 mostra diagramas de dispersão obtidos pela medição do sangue contendo células vermelhas fragmentadas usando

o reagente para medir as plaquetas do exemplo experimental 10.

[0038] A figura 13 mostra diagramas de dispersão obtidos pela medição do sangue contendo partículas de lipídeo usando o reagente para medir as plaquetas do exemplo experimental 10.

[0039] A figura 14 mostra diagramas de dispersão obtidos pelas medições de amostras usando os reagentes para medir as plaquetas do exemplo experimental 14 a 24.

[0040] A figura 15 mostra diagramas de dispersão obtidos pela medição de uma amostra usando o reagente para medir as plaquetas do exemplo experimental 25.

[0041] A figura 16 mostra diagramas de dispersão obtidos pela medição da plaqueta usando o reagente para medir as plaquetas do exemplo experimental 45.

[0042] A figura 17 mostra diagramas de dispersão obtidos pela medição da plaqueta usando o reagente para medir as plaquetas do exemplo experimental 46.

[0043] A figura 18 mostra diagramas de dispersão obtidos pela medição da plaqueta usando o reagente para medir as plaquetas do exemplo experimental 47.

[0044] A figura 19 mostra diagramas de dispersão obtidos pela medição da plaqueta usando o reagente para medir as plaquetas do exemplo experimental 48.

[0045] A figura 20 mostra diagramas de dispersão obtidos pela medição do sangue contendo células vermelhas fragmentadas usando o reagente para medir as plaquetas do exemplo experimental 45.

[0046] A figura 21 mostra diagramas de dispersão obtidos pela medição do sangue contendo partículas de lipídeo usando o reagente para medir as plaquetas do exemplo experimental 45.

LISTAGEM DE REFERÊNCIA

A primeiro recipiente

B segundo recipiente

1 analisador de amostra

2 unidade de medição

3 unidade de processamento de dados

4 seção de controle

5 seção de detecção

6 seção de preparação da amostra

7 interface

8 seção de controle

9 seção de análise dos dados

10 seção de exibição

11 seção de operação

12 interface

51 célula de fluxo

52 fonte de luz do laser

53 lentes de aplicação da luz

54 e 57 fotodiodos

54a entrave do feixe

54b amplificador

55 lente de condensação lateral

56 espelho dicróico

57 fotodiodo

57a e 58b amplificadores

58 fotomultiplicador

58a filtro ótico

MELHOR MODO PARA EXECUÇÃO DA INVENÇÃO

Reagente para medição das plaquetas

[0047] Os presentes inventores verificaram que as plaquetas podem ser claramente distinguidas de contaminantes no sangue tal como componentes da célula sanguínea diferentes de plaquetas ou partícu-

las de lipídeo usando azul do nilo como um corante para tingir as plaquetas nos métodos para medição de plaquetas pela citometria de fluxo.

[0048] Além do que, os presentes inventores conduziram estudos extensivos para as condições para medir as plaquetas usando azul do nilo e verificaram que os reagentes para medir as plaquetas têm estabilidade de armazenamento superior quando (1) ele contém hidrogenossulfato do azul do nilo ou (2) ele contém azul do nilo e um ácido, de modo a completar a presente invenção.

[0049] Na fórmula (II) acima, o ânion (contra-íon) de X- inclui um íon de ácido inorgânico tal como íon sulfúrico ($1/2 \text{SO}_4^{2-}$), íon de cloreto (Cl^-), íon de hidrogenossulfato (HSO_4^-), íon perclórico (ClO_4^-).

[0050] Os azul do nilo acima estão comercialmente disponíveis e são adquiridos de, por exemplo, Sigma Aldrich, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Nacalai Tesque, Inc., Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Kishida Chemical Co., Ltd. e assim por diante.

[0051] Especificamente, o hidrogenossulfato do azul do nilo pode ser adquirido de Wako Pure Chemical Industries, Ltd. e Kishida Chemical Co., Ltd.

[0052] O azul do nilo contido no reagente para medir as plaquetas da presente invenção (por exemplo, hidrogenossulfato do azul do nilo) está preferivelmente contido em um reagente de corante em uma faixa de concentração de modo a obter a concentração de 0,05 a 5,0 ppm, mais preferivelmente 0,1 a 0,6 ppm, ainda preferivelmente 0,2 a 0,5 ppm quando o reagente para medir as plaquetas está misturado com uma amostra. Por exemplo, quando o reagente para medir as plaquetas está misturado com uma amostra na razão de diluição de 1/50, a concentração do azul do nilo no reagente para medir as plaquetas é preferivelmente 2,5 a 2500 ppm.

[0053] Plaquetas são mais claramente distinguidas dos componen-

tes da célula sanguínea diferentes de plaquetas ou contaminantes, quando o azul do nilo está presente dentro da faixa de concentração acima.

[0054] No aspecto no qual o reagente para medir as plaquetas da presente invenção compreende azul do nilo e um ácido, o ácido pode ser um ácido orgânico ou um ácido inorgânico, com a preferência de um ácido inorgânico. O ácido inorgânico inclui oxoácidos tais como ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido perclórico e hidroácidos, tais como ácido clorídrico, ácido fluorídrico, ácido iodídrico, ácido bromídrico, ácido cianídrico, ácido isociânídrico, sulfeto de hidrogênio, azida de hidrogênio.

[0055] No aspecto acima do reagente para medir as plaquetas da presente invenção, o ácido fica contido no reagente para medir as plaquetas na concentração que é igual ou menor do que a concentração molar do azul do nilo no reagente para medir as plaquetas. Especificamente, a razão das concentrações molares de azul do nilo e do ácido no reagente para medir as plaquetas é de preferência 10:1 a 1:1. Quando o ácido é ácido clorídrico, a razão das concentrações molares do azul do nilo e do ácido clorídrico é preferivelmente 3:1 a 1:1. Quando o ácido é ácido sulfúrico, a razão das concentrações molares do azul do nilo e do ácido sulfúrico é de preferência 4:1 a 1:1. Pelo uso do ácido nas concentrações acima, a redução da concentração do componente do corante efetivo de azul do nilo no reagente para medir as plaquetas com o tempo pode ser efetivamente impedida, de modo que a estabilidade no armazenamento do reagente para medir as plaquetas pode ser melhorada.

[0056] No aspecto acima do reagente para medir as plaquetas da presente invenção, qualquer combinação de azul do nilo e do ácido pode ser usada. As combinações mais preferidas são:

(A) sulfato de azul do nilo e um oxoácido ou hidroácido;

(B) cloreto de azul do nilo e ácido sulfúrico e

(C) hidrogenossulfato do azul do nilo e um oxoácido ou hidroácido.

[0057] Em outro aspecto do reagente para medir plaquetas da presente invenção, quando o azul do nilo é o hidrogenossulfato do azul do nilo, o reagente para medir as plaquetas não precisa conter um ácido. Quando o azul do nilo é hidrogenossulfato do azul do nilo, a redução na concentração do componente do corante efetivo do azul do nilo no reagente para medir as plaquetas com o tempo pode ser efetivamente prevenida sem um ácido, de modo que a estabilidade no armazenamento do reagente para medir plaquetas pode ser melhorada.

[0058] As seguintes duas hipóteses podem ser fornecidas quanto a porque os reagentes para medir as plaquetas da presente invenção nos dois aspectos acima melhoraram a estabilidade no armazenamento.

(1) É considerado que o azul do nilo tem alta estabilidade quando ele está na forma do sal de hidrogenossulfato.

[0059] Quando um ácido é adicionado no sulfato do azul do nilo, um próton (H^+) que é gerado pela dissociação do ácido se liga ao SO_4^{2-} do sulfato do azul do nilo para formar HSO_4^- , de modo que HSO_4^- e azul do nilo ficam em equilíbrio de 1:1 e estabilizados.

[0060] Quando o azul do nilo é um sal diferente do acima, ácido sulfúrico pode ser adicionado, de modo que o HSO_4^- gerado do ácido sulfúrico pode estabilizar o azul do nilo.

[0061] Dessa forma, o reagente para medir as plaquetas da presente invenção pode ser o que compreende o azul do nilo e opcionalmente um ácido de modo que o íon de hidrogenossulfato exista no reagente.

(2) O azul do nilo contém três átomos de nitrogênio no seu grupo dietilamino, grupo amino e estrutura de fenoxazina. Entre esses

átomos de nitrogênio, átomos de nitrogênio diferentes do que forma o sal com o ânion contrário representado por X^- na fórmula acima formam um sal de adição ácido, de modo que a estabilidade dos átomos de nitrogênio e a solubilidade do corante são melhoradas e a estabilidade do reagente para medir as plaquetas é melhorada.

[0062] A saber, o hidrogenossulfato do azul do nilo pode gerar um próton (H^+) e íon sulfúrico (SO_4^{2-}) devido à dissociação do íon de hidrogenossulfato (HSO_4^-). Esse próton pode se ligar a qualquer um dos átomos de nitrogênio do azul do nilo para produzir um átomo de nitrogênio prótico. É considerado que esse átomo de nitrogênio prótico forme um sal intermolecular através do ácido sulfúrico e, com isso, a solubilidade e a estabilidade do corante podem ser melhoradas.

[0063] Quando um ácido é adicionado no azul do nilo diferente do sal do hidrogenossulfato, é considerado que um próton e um ânion gerados pela dissociação do ácido contribuam para a formação dos sais intermoleculares do azul do nilo, de modo que a solubilidade e a estabilidade do corante podem ser melhoradas.

[0064] Dessa forma, o reagente para medir as plaquetas da presente invenção pode ser o que compreende azul do nilo e opcionalmente um ácido de modo que o azul do nilo possa formar um sal intermolecular.

[0065] O reagente para medir as plaquetas da presente invenção, de preferência, compreende um solvente orgânico solúvel em água. O solvente orgânico solúvel em água não é especificamente limitado contanto que ele possa dissolver o azul do nilo acima e inclua solventes próticos tais como etileno glicol, glicol dietilênico, glicol poli(etilênico).

[0066] O reagente para medir as plaquetas da presente invenção pode ser preparado pela dissolução do azul do nilo acima e opcionalmente o ácido no solvente orgânico solúvel em água na concentração

desejada acima.

Conjunto de reagentes para medir as plaquetas

[0067] O reagente acima para medir as plaquetas pode ser combinado com um reagente que compreende um agente de tamponamento para diluir o reagente para medir plaquetas que compreendem o corante para formar um conjunto de reagentes.

[0068] Dessa forma, a presente invenção também proporciona um conjunto de reagentes para medir plaquetas compreendendo:

[0069] um primeiro reagente compreendendo hidrogenossulfato do azul do nilo ou azul do nilo e um ácido (a seguir também chamado como "o reagente do corante"); e

[0070] um segundo reagente compreendendo um agente de tamponamento (a seguir também citado como "o reagente de diluição").

[0071] Os detalhes para o primeiro reagente são os mesmos que esses descritos acima para o reagente para medir plaquetas.

[0072] O agente de tamponamento contido no segundo reagente pode não ser limitado especificamente contanto que ele possa manter o pH do segundo reagente dentro de uma faixa desejada e pode ser carboxilatos, fosfatos, tampões de good, taurina, trietanolamina dependendo do pH desejado. O agente de tamponamento fica preferivelmente contido no reagente de diluição de modo a obter a faixa de pH do reagente de diluição de 6,0 a 11,0, mais preferivelmente 7,0 a 10,0 e ainda preferivelmente 8,0 a 9,5. Quando o pH do reagente de diluição é 6,0 ou acima, eritrócitos se tornam resistentes à quebra e as células vermelhas fragmentadas contaminantes podem ser diminuídas com a mistura do reagente de diluição e uma amostra. Quando o pH é 11,0 ou abaixo, a tintura não específica das células vermelhas fragmentadas pode ser reduzida.

[0073] Dessa maneira, o segundo reagente é preferivelmente um tampão tendo um pH de 6,0 a 11,0.

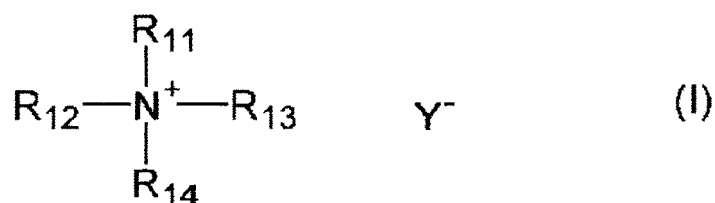
[0074] O reagente de diluição pode compreender, além do agente de tamponamento, outros componentes tais como um osmótico, um agente de aceleração de tintura para acelerar a tintura das plaquetas pelo azul do nilo.

[0075] O osmótico pode ser qualquer composto contanto que ele possa manter a osmolalidade do reagente de diluição dentro de uma faixa apropriada e inclua sais de metal alcalino de um ácido orgânico tais como ácido propiônico, sacarídeos tais como glicose, manose. Haletos de metal alcalino tais como NaCl e haletos de metal de terra alcalina podem também ser usados. Um ou mais osmóticos podem ser usados.

[0076] O osmótico fica preferivelmente contido no reagente de diluição de modo a ajustar a osmolalidade do reagente de diluição para 150 a 600 mOsm/kg e mais preferivelmente 200 a 300 mOsm/kg. Pelo ajuste da osmolalidade dentro da faixa acima, a osmolalidade da mistura dos reagentes no conjunto de reagentes e uma amostra pode ficar mais próxima da osmolalidade fisiológica, de modo que a hemólise devido à hipotonicidade pode ser impedida, o aumento das células vermelhas fragmentadas pode ser suprimido e a medição das plaquetas pode ser mais precisa. Quando a osmolalidade do reagente de diluição pode ser ajustada dentro da faixa acima usando o agente de tamponamento acima, o osmótico pode não ser requerido.

[0077] O agente de aceleração da tintura pode ser qualquer composto que possa aumentar a permeabilidade do azul do nilo para dentro das plaquetas e inclui tensoativos, de modo particularmente preferido tensoativos catiônicos.

[0078] O tensoativo catiônico preferível é o representado pela fórmula (I) seguinte:



[0079] onde R11 é um grupo de alquila tendo 8 a 12 átomos de carbono; R12, R13 e R14 são os mesmos ou diferentes um do outro e são um grupo alquila tendo 1 a 6 átomos de carbono e Y- é um ânion.

[0080] Na fórmula (I) acima, o grupo alquila tendo 8 a 12 átomos de carbono de R11 pode ser linear ou ramificado e incluir, por exemplo, octila, decila, laurila, cetila, miristila e grupos similares.

[0081] O grupo alquila tendo 1 a 6 átomos de carbono de R12, R13 e R14 pode ser linear ou ramificado e incluir, por exemplo, metila, etila, propila, butila, isobutila, sec-butila, tert-butila, pentila, hexila e grupos similares. Entre esses, grupos de metil e etil são preferíveis.

[0082] O ânion de Y- é preferivelmente um íon de bromo ou cloro.

[0083] Os tensoativos catiônicos preferíveis da fórmula (I) incluem brometo de deciltrimetilamônio (DTAB), brometo de octiltrimetilamônio (OTAB), cloreto de lauriltrimetilamônio (LTAC), cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAC), brometo de miristiltrimetilamônio (MTAB) e assim por diante. Um ou mais tensoativos catiônicos podem ser usados.

[0084] O tensoativo catiônico fica contido preferivelmente no reagente de diluição na concentração de 50 a 20.000 ppm. A concentração particularmente preferível pode depender do tipo dos tensoativos catiônicos e é preferivelmente 500 a 3.000 ppm quando DTAB é usado e 100 a 500 ppm quando LTAC é usado. Quando o reagente de diluição contém o tensoativo catiônico em tais concentrações, a hemólise pode ser impedida e a tintura das plaquetas pode ser acelerada com a mistura dos reagentes no conjunto de reagentes para medir plaquetas e uma amostra.

[0085] O reagente de diluição pode compreender, além dos com-

ponentes acima, um conservante tal como sódio 2-piridiltio-1-óxido, β -fenetil álcool.

[0086] O agente de tamponamento que está contido no reagente de diluição e os outros componentes que podem estar contidos opcionalmente no reagente de diluição podem ser misturados com o reagente de corante antecipadamente. Entretanto, pelo fato de que o azul do nilo contido no reagente do corante pode ser degradado com água ou um componente alcalino, o conjunto de reagentes compreendendo separadamente o reagente de corante e o reagente de diluição é preferível em vista da estabilidade no armazenamento.

[0087] O conjunto de reagentes para medir plaquetas de acordo com a presente modalidade pode ficar contido em um primeiro recipiente A para conter o reagente do corante e um segundo recipiente B para conter o reagente de diluição como mostrado na figura 1. Quando o reagente do corante e o reagente de diluição estão contidos em recipientes separados, a degradação do azul do nilo contido no reagente do corante pode ser impedida devido à água ou um componente alcalino contido no reagente de diluição, de modo que o conjunto de reagentes para medir as plaquetas tendo uma melhor estabilidade no armazenamento pode ser proporcionado.

Método para medição das plaquetas

[0088] O reagente ou conjunto de reagentes para medição de plaquetas é misturado com uma amostra que pode conter plaquetas, dessa maneira tingindo as plaquetas.

[0089] Dessa forma, a presente invenção ainda proporciona um método para medir as plaquetas pelo uso do reagente ou conjunto de reagentes para medir as plaquetas.

[0090] O método para medição da presente invenção compreende as etapas de:

[0091] misturar um primeiro reagente compreendendo hidrogenos-

sulfato do azul do nilo ou azul do nilo e o ácido com uma amostra para preparar uma amostra de medição;

[0092] aplicar luz nas células na amostra de medição obtida para detectar a luz dispersa e a fluorescência emitidas das células; e

[0093] detectar as plaquetas contidas na amostra de medição com base na luz dispersa e fluorescência detectadas.

[0094] Na etapa de mistura do primeiro reagente e uma amostra no método acima, um segundo reagente compreendendo o agente de tamponamento pode ser ainda misturado ou não misturado. É preferível que o segundo reagente seja ainda misturado.

[0095] Os detalhes para o primeiro e o segundo reagentes são os mesmos que esses descritos acima para o conjunto de reagentes para medir as plaquetas.

[0096] A amostra inclui sangue (sangue total, plasma rico em plaquetas (PRP), etc.) e fluido de medula óssea obtido de organismos, particularmente de mamíferos incluindo humanos. A amostra pode ser sangue ou fluido da medula óssea diluído com uma solução apropriada tal como tampão.

[0097] O primeiro reagente e a amostra são preferivelmente misturados de modo a obter a concentração de azul do nilo na amostra de medição de 0,05 a 5,0 ppm, de preferência 0,1 a 0,6 ppm e ainda preferivelmente 0,2 a 0,5 ppm.

[0098] O primeiro reagente pode ser diluído com o segundo reagente a fim de obter a concentração acima de azul do nilo na amostra de medição depois da mistura com a amostra.

[0099] Quando o segundo reagente é usado, o primeiro e o segundo reagentes e a amostra são preferivelmente misturados na razão de volume de (primeiro reagente + segundo reagente): amostra = 100:1 a 1000:1.

[00100] Quando o segundo reagente é usado, a razão de volume

entre o primeiro e o segundo reagentes é preferivelmente 1:10 a 1:100 e mais preferivelmente 1:20 a 1:75.

[00101] Quando o segundo reagente é adicionado na etapa de mistura, a ordem de mistura do primeiro reagente, segundo reagente e amostra não é especificamente limitada.

[00102] A etapa de mistura pode ser executada em uma temperatura de aproximadamente 25 a 50°C, mais preferivelmente de aproximadamente 35 a 45°C. O tempo para mistura é preferivelmente 10 segundos a 5 minutos, mais preferivelmente 10 segundos a 2 minutos e ainda preferivelmente 10 segundos a 60 segundos.

[00103] No método para medição da presente invenção, a luz é aplicada nas células na amostra de medição assim obtida e a luz dispersa e a fluorescência emitidas das células são detectadas.

[00104] Um aparelho para aplicar luz é preferivelmente um citômetro de fluxo. No citômetro de fluxo, a amostra de medição é introduzida em uma célula de fluxo do citômetro de fluxo e a luz é aplicada nas células na amostra de medição passando através da célula de fluxo.

[00105] A fonte de luz do citômetro de fluxo não é especificamente limitada e pode ser qualquer fonte de luz adequada para a excitação do azul do nilo (por exemplo, ao redor de 600 a 680 nm). A fonte de luz inclui, por exemplo, laser sem condutor vermelho e laser He-Ne. O laser sem condutor é adequado porque ele é mais econômico do que o laser a gás.

[00106] A luz dispersa emitida das células aplicadas com luz no citômetro de fluxo pode ser qualquer uma de luz dispersa dianteira (ângulo de recepção da luz de aproximadamente 0 a 20 graus) ou luz dispersa lateral (ângulo de recepção da luz de aproximadamente 90 graus). A luz dispersa dianteira pode ser de luz dispersa dianteira de pequeno ângulo (ângulo de recepção da luz de aproximadamente 1 a 5 graus) ou luz dispersa dianteira de grande ângulo (ângulo de recep-

ção da luz de aproximadamente 6 a 20 graus).

[00107] A fluorescência emitida das células aplicada com luz no citômetro de fluxo pode ser detectada pela seleção de um comprimento de onda de recepção de luz apropriado para o azul do nilo (aproximadamente 630 a 680 nm).

[00108] Com base na luz dispersa e fluorescência obtidas como acima, um diagrama de dispersão é preparado, de modo a detectar plaquetas pela distinção das plaquetas dos contaminantes tal como componentes da célula sanguínea diferentes de plaquetas, partículas de lipídeo. As plaquetas assim detectadas podem também ser contadas. A detecção e/ou contagem das plaquetas é preferivelmente executada usando um software de análise apropriado.

[00109] As medições das plaquetas usando um analisador de amostra equipado com um citômetro de fluxo são agora descritas com referência às figuras anexas.

[00110] A figura 2 é uma vista frontal da constituição esquemática do analisador de amostra. O analisador de amostra 1 é um aparelho usado para testes hem atológicos, por exemplo, e é principalmente composto de uma unidade de medição 2 e uma unidade de processamento de dados 3. Na unidade de medição 2, certos componentes contidos em uma amostra sanguínea são medidos e a unidade de processamento de dados 3 recebe os dados de medição para executar um processamento analítico.

[00111] A figura 3 é um diagrama de blocos mostrando a constituição esquemática do analisador de amostra 1. Como mostrado na figura 3, a unidade de medição 2 compreende uma seção de controle 4 para controlar a ação das seções respectivas; uma seção de detecção 5 equipada com um citômetro de fluxo para detectar as partículas a serem analisadas na amostra; e uma seção de preparação de amostra 6 para preparar uma amostra de medição e fornecer a amostra de me-

dição preparada para a seção de detecção 5; e uma interface 7 para transmitir os dados com a unidade de processamento de dados 3. A unidade de processamento de dados 3 compreende uma seção de controle 8 para controlar a ação das seções respectivas; uma seção de análise de dados 9 para analisar os dados detectados recebidos da unidade de medição 2; uma seção de exibição 10 que exhibe os resultados da análise da seção de análise de dados 9 como diagramas de dispersão; uma seção de operação 11 que aceita as operações por um operador, e uma interface 12 para transmitir os dados com a unidade de medição 2.

[00112] A constituição da seção de detecção 5 equipada com um citômetro de fluxo é agora descrita com referência à figura 4. A figura 4 é uma vista plana esquemática que mostra a constituição da seção de detecção. A seção de detecção 5 é fornecida com uma fonte de luz de laser sem icndutor 52 de modo a emitir um feixe de laser para uma célula de fluxo 51. Entre a fonte de luz do laser sem icndutor 52 e a célula de fluxo 51, lentes de aplicação de luz 53 consistindo em uma pluralidade de lentes são fornecidas. Em um eixo geométrico da luz estendido linearmente da fonte de luz do laser sem icndutor 52, um entrave do feixe 54a é fornecido de modo a ficar oposto às lentes de aplicação da luz 53 através da célula de fluxo 51, de modo que a luz direta da fonte de luz do laser sem icndutor 52 é interrompida pelo entrave do feixe 54a. Mais a jusante do eixo geométrico da luz do entrave do feixe 54a, um fotodiodo 54 é fornecido.

[00113] Quando uma amostra de medição passa através da célula de fluxo 51, sinais da luz dispersa e de fluorescência são gerados devido ao feixe do laser. Entre os sinais, a luz do sinal dianteiro é emitida para o fotodiodo 54. Entre os feixes de luz que passam ao longo do eixo geométrico da luz linearmente estendida da fonte de luz do laser sem icndutor 52, a luz direta da fonte de luz do laser sem icndutor

52 é interrompida pelo entrave do feixe 54a, e o fotodiodo 54 recebe principalmente a luz dispersa que passa ao longo da fonte de luz (a seguir citada como "luz dispersa dianteira"). A luz dispersa dianteira emitida da célula de fluxo 51 é fotoeletricamente transformada no fotodiodo 54 e o sinal elétrico assim gerado (a seguir citado como "sinal da luz dispersa dianteira") é amplificado em um amplificador 54b. O sinal da luz dispersa dianteira é liberado para a seção de controle 4, ainda liberado para a unidade de processamento de dados 3 através da interface 7 e processado na seção de análise dos dados 9 da unidade de processamento de dados 3.

[00114] Tal sinal de luz dispersa dianteira reflete o tamanho das partículas a serem detectadas. Pelo processamento do sinal da luz dispersa dianteira na seção de análise dos dados 9, o tamanho das partículas a serem detectadas é obtido.

[00115] Na direção que atravessa em ângulos retos com o eixo geométrico da luz linearmente estendida da fonte de luz do laser semicondutor 52 para o fotodiodo 54 é fornecida uma lente de condensação lateral 55, de modo a condensar a luz lateral com a lente de condensação lateral 55 que é gerada pela aplicação de um laser semicondutor nas partículas a serem detectadas passando através da célula de fluxo 51 (luz que é emitida para a direção que atravessa em ângulos retos com o eixo geométrico da luz). No lado a jusante da lente de condensação lateral 55 na direção da luz lateral é proporcionado um espelho dicróico 56, de modo a dividir a luz do sinal recebida da lente de condensação lateral 55 em um componente de luz dispersa e um componente de fluorescência. Na direção lateral do espelho dicróico 56 (a direção que atravessa com o eixo geométrico da luz conectando a lente de condensação lateral 55 e o espelho dicróico 56) é fornecido um fotodiodo 57 para receber a luz dispersa lateral e a jusante do espelho dicróico 56 na direção do eixo geométrico da luz são pro-

porcionados um filtro ótico 58a e um fotomultiplicador 58. O componente da luz dispersa lateral dividido no espelho dicróico 56 é fotoeletricamente transformado no fotodiodo 57 e o sinal elétrico assim gerado (a seguir citado como "sinal de luz dispersa lateral") é amplificado em um amplificador 57a. O sinal de luz dispersa lateral é liberado para a seção de controle 4, ainda liberado para a unidade de processamento de dados 3 através da interface 7 e processado na seção de análise de dados 9 da unidade de processamento de dados 3.

[00116] O sinal da luz dispersa lateral reflete a informação interna das partículas a serem detectadas (por exemplo, o tamanho nuclear dos leucócitos e assim por diante). Pelo processamento do sinal da luz dispersa lateral na seção de análise de dados 9, o tamanho nuclear dos leucócitos e assim por diante é obtido.

[00117] O componente de fluorescência lateral emitido do espelho dicróico 56 é selecionado dependendo do comprimento de onda no filtro ótico 58a e fotoeletricamente transformado no fotomultiplicador 58. O sinal elétrico assim gerado (o sinal de fluorescência lateral) é amplificado em um amplificador 58b. O sinal de fluorescência lateral é liberado para a seção de controle 4, ainda liberado para a unidade de processamento de dados 3 através da interface e processado na seção de análise de dados 9 da unidade de processamento de dados 3.

[00118] O sinal de fluorescência lateral reflete a informação sobre o grau de tintura das partículas a serem detectadas. Pelo processamento do sinal de fluorescência lateral na seção de análise de dados 9, o grau de tintura das partículas a serem detectadas é obtido.

[00119] A seção de análise de dados 9 da unidade de processamento de dados 3 pode analisar o sinal da luz dispersa lateral assim obtido, o sinal da luz dispersa lateral e o sinal de fluorescência para detectar as partículas a serem detectadas e ainda pode contar as partículas detectadas. A seção de análise de dados 9 ainda gera diagra-

mas de dispersão com base nos resultados de análise do sinal de luz dispersa dianteira, sinal da luz dispersa lateral e sinal de fluorescência. Os diagramas de dispersão gerados são exibidos na seção de exibição 10.

[00120] Pela utilização de tal analisador de amostra, as plaquetas podem ser medidas.

[00121] Primeiro, na seção de preparação da amostra 6, uma amostra é misturada com um reagente para medir as plaquetas ou com os reagentes contidos em um conjunto de reagentes para medir as plaquetas para preparar uma amostra de medição. O reagente e o conjunto de reagentes para medir as plaquetas a serem usadas podem ser o reagente e o conjunto de reagentes para medir as plaquetas descritos acima. No reagente para medir as plaquetas ou no reagente de corante do conjunto de reagentes para medir as plaquetas está contido o azul do nilo, de modo que as plaquetas contidas na amostra são tingidas com azul do nilo.

[00122] Na seção de preparação da amostra 6, uma amostra de medição é preferivelmente preparada misturando uma amostra e o reagente para medir as plaquetas ou os reagentes contidos no conjunto de reagentes para medir as plaquetas, de modo a obter a concentração de azul do nilo na amostra de medição de 0,05 a 5,0 ppm (0,00014 a 0,014 mmol/L), de preferência 0,1 a 0,6 ppm, ainda preferivelmente 0,2 a 0,5 ppm. A temperatura de reação e o tempo para preparação da amostra de medição são preferivelmente os descritos acima para a temperatura de reação e o tempo para o reagente para medir as plaquetas.

[00123] A amostra de medição preparada na seção de preparação de amostra 6 é então fornecida para a seção de detecção 5. Na seção de detecção 5, a amostra de medição é introduzida na célula de fluxo 51 do citômetro de fluxo e um feixe de laser é aplicado da fonte de luz

do laser sem icondutor 52 nas partículas a serem detectadas na amostra de medição. O sinal da luz dispersa dianteira, sinal da luz dispersa lateral e sinal de fluorescência obtidos pela aplicação do feixe de laser nas partículas são processados na seção de análise de dados 9 da unidade de processamento de dados 3.

[00124] Na seção de análise de dados 9, as plaquetas na amostra de medição são claramente distinguidas de outros componentes tal como células vermelhas fraturadas ou partículas de lipídeo contidas na amostra com base no sinal da luz dispersa dianteira e sinal de fluorescência. Na seção de análise de dados 9, as plaquetas assim detectadas podem também ser contadas. De modo a detectar e contar as plaquetas com base no sinal da luz dispersa dianteira e sinal de fluorescência, o processamento de sinal na seção de análise dos dados 9 é executado preferivelmente pelo uso de um software de análise apropriado.

[00125] No acima, a constituição na qual as plaquetas são detectadas com base no sinal da luz dispersa dianteira e sinal de fluorescência. Entretanto, outras constituições, tal como uma na qual as plaquetas são detectadas com base no sinal da luz dispersa lateral e sinal de fluorescência, podem ser utilizadas.

EXEMPLOS

[00126] A presente invenção é agora descrita em mais detalhes. Entretanto, esses exemplos não são planejados para limitar o escopo da presente invenção.

[00127] Exemplos experimentais 1 a 8: estabilidade de armazenamento dos reagentes para medir plaquetas contendo hidrogenossulfato do azul do nilo.

[00128] A fim de demonstrar a estabilidade no armazenamento do reagente do corante, reagentes para medir as plaquetas (reagentes do corante) que contêm azul do nilo mostrados na tabela 1 nas concen-

trações mostradas na tabela 1 foram preparados e a absorvência, um parâmetro refletindo a concentração do componente de corante efetivo do azul do nilo nos reagentes de corante, foi medida para avaliar a estabilidade no armazenamento do azul do nilo nos reagentes do corante.

[00129] Reagentes para medição de plaquetas:

[00130] Corante Nas concentrações mostradas na tabela 1

[00131] Etileno glicol 5 mL

Tabela 1

Exemplos experimentais	Corante	Concentração
1	Hidrogenossulfato do azul do nilo (hidrogenossulfato do azul do nilo, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)	18,4 ppm
2	Hidrogenossulfato do azul do nilo (hidrogenossulfato do azul do nilo, Kishida Chemical Co., Ltd.)	18,4 ppm
3	Sulfato do azul do nilo (sal do sulfato do azul do nilo, Sigma)	16,0 ppm
4	Sulfato do azul do nilo (azul do nilo, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)	16,0 ppm
5	Sulfato do azul do nilo (sulfato do azul do nilo, Nacalai Tesque, Inc.)	16,0 ppm
6	Sulfato do azul do nilo (azul do nilo A, Nacalai Tesque, Inc.)	16,0 ppm
7	Cloreto do azul do nilo (cloreto do azul do nilo, Kishida Chemical Co., Ltd.)	16,0 ppm
8	Sulfato do azul do nilo (azul do nilo A, Kishida Chemical Co., Ltd.)	16,0 ppm

[00132] Os reagentes do corante obtidos foram diluídos para 1/10 com etanol, e a absorvência de cada reagente de corante foi medida em 630 nm com um espectrofotômetro, no qual o espectro de absorvência do corante é máximo. As medidas de absorvência foram execu-

tadas usando etanol como uma referência. A absorvência dos reagentes diluídos foi medida depois de 2, 4 e 7 meses de armazenamento em 45°C e as taxas de mudança na absorvência foram calculadas. Os resultados das medições de absorvência e das taxas de mudança na absorvência são mostrados nas tabelas 2-1 e 2-2, respectivamente.

[00133] A "taxa de mudança na absorvência" representa a taxa de mudança na absorvência por porcentagem calculada usando o valor máximo de absorvência medido como um valor padrão entre todos os valores de absorvência obtidos para o exemplo experimental respectivo.

Tabela 2-1

Exemplo experimental	Imediatamente depois da diluição	2 meses mais tarde	4 meses mais tarde	7 meses mais tarde
1	0,3223	0,3141	0,3063	0,3001
2	0,3369	0,3250	0,3138	0,2799
3	0,3316	0,2919	0,2583	0,2285
4	0,3297	0,2803	0,2484	0,2178
5	0,3217	0,2729	0,2441	0,2117
6	0,3248	0,2790	0,2443	0,2119
7	0,3184	0,2696	0,2335	0,2023
8	0,3319	0,2825	0,2426	0,2234

Tabela 2-2

Exemplo experimental	Imediatamente depois da diluição	2 meses mais tarde	4 meses mais tarde	7 meses mais tarde
1	0,0%	-2,5%	-5,0%	-6,9%
2	0,0%	-3,5%	-6,9%	-16,9%
3	0,0%	-12,0%	-22,1%	-31,1%
4	0,0%	-15,0%	-24,7%	-33,9%
5	0,0%	-15,2%	-24,1%	-34,2%
6	0,0%	-14,1%	-24,8%	-35,0%
7	0,0%	-15,3%	-26,7%	-36,5%
8	0,0%	-14,9%	-26,9%	-32,7%

[00134] Como mostrado na tabela 2-2, a redução na absorvência do

reagente de corante do exemplo experimental 1 que continha hidrogenossulfato do azul do nilo como o corante foi 2,5%, 5,0% e 6,9% depois de 2 meses, 4 meses e 7 meses, respectivamente. A redução na absorvência do reagente do corante do exemplo experimental 2 que também continha hidrogenossulfato do azul do nilo como o corante foi 3,5%, 6,9% e 16,9% depois de 2 meses, 4 meses e 7 meses, respectivamente.

[00135] Por outro lado, a absorvência dos reagentes do corante dos exemplos experimentais 3 a 8 que continham azuis de Nilo tendo íons contrários diferentes do íon do hidrogenossulfato foi diminuída por mais do que 10%, mais do que 20% e mais do que 30% depois de 2 meses, 4 meses e 7 meses, respectivamente.

[00136] A partir das comparações com esses exemplos experimentais 3 a 8, é verificado que os reagentes do corante que contêm azuis de Nilo tendo íons de hidrogenossulfato como íons contrários têm menos redução na absorvência com o tempo e estabilidade de armazenamento superior comparados com os reagentes de corante que contêm azuis de Nilo tendo íons contrários diferentes do íon do hidrogenossulfato.

[00137] Exemplos experimentais 9 a 13: propriedade de tintura da plaqueta dos reagentes para medir plaquetas compreendendo hidrogenossulfato do azul do nilo

[00138] Os experimentos seguintes foram executados a fim de demonstrar a propriedade de tintura da plaqueta dos reagentes para medir plaquetas compreendendo hidrogenossulfato do azul do nilo.

[00139] Conjuntos de reagentes consistindo em reagentes de corante tendo as composições seguintes e do reagente de diluição foram preparados.

(1) Reagentes de corante

Corante para tingir as plaquetas	Nas concentrações
----------------------------------	-------------------

mostradas na tabela 3

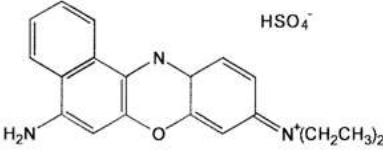
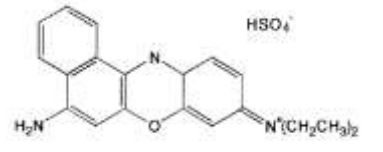
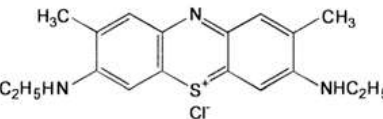
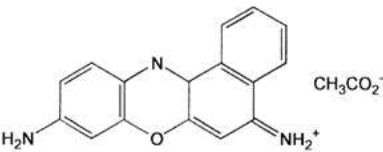
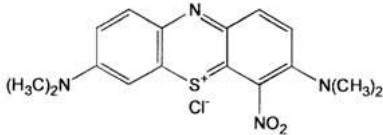
Etileno glicol	1L
(2) Reagente de diluição	
Tricina (agente de tamponamento)	1,8 g
Cloreto de Lauriltrimetilamônio (LTAC)	0,15 g
Água purificada	1L
(ajustado para pH 9,0 e osmolalidade 200 mOsm/kg.H ₂ O)	

[00140] Os corantes usados para medir as plaquetas foram esses mostrados na tabela 3 nas concentrações mostradas na tabela 3. As concentrações finais dos corantes depois da mistura dos reagentes com uma amostra são mostradas em parênteses.

[00141] As fórmulas químicas dos corantes são mostradas na tabela 3.

[00142] O reagente de diluição (alíquotas de 1 mL) nos tubos foi aquecido em um banho de água de 40°C. No reagente de diluição foram adicionados 20 µL do reagente do corante e 5 µL do sangue total de humano saudável como uma amostra e a reação foi executada em 40°C por 25 segundos para preparar amostras de medição. As amostras de medição foram introduzidas em uma seção de detecção de um citômetro de fluxo tendo uma fonte de luz emitindo luz com o comprimento de onda de 633 nm, a luz de excitação foi aplicada nas células nas amostras de medição, um sinal de luz dispersa e um sinal de fluorescência emitidos das células foram detectados, os sinais obtidos foram analisados e as plaquetas nas amostras de medição foram medidas. A preparação das amostras de medição e as medições das plaquetas pelo citômetro de fluxo foram executadas no analisador de sangue XE-2100 (Sysmex Corporation). A saída da fonte de luz do analisador de sangue foi modificada para 9W da saída normal de 3W.

Tabela 3

	Corante	Concentração	Estrutura	Resultados
Ex. 9	hidrogenossulfato do azul do nilo A (Wako Pure Chemicals)	18,4ppm (0,3ppm)		tintura suficiente das plaquetas
Ex. 10	hidrogenossulfato do azul do nilo A (Kishida Chemical)	18,4ppm (0,3ppm)		tintura suficiente das plaquetas
Ex. 11	Azul de metileno NNX (Sigma)	102,5ppm (2ppm)		tintura suficiente das plaquetas
Ex. 12	Acetato de violeta cresilo (Sigma)	1025ppm (20ppm)		Sem tintura
Ex. 13	Verde básico 5 (Tokyo Chemical Industry)	1025ppm (20ppm)		tintura suficiente das plaquetas

[00143] Os diagramas de dispersão obtidos dos exemplos experimentais 9 a 13 são mostrados nas figuras 5 a 9, respectivamente. Em cada figura, (a) é um diagrama de dispersão tendo o eixo geométrico y da intensidade da luz dispersa dianteira e o eixo geométrico x da intensidade da fluorescência e (b) é um diagrama de dispersão no qual o eixo geométrico y do diagrama de dispersão (a) é convertido para os logaritmos. Em (b), a área onde as plaquetas aparecem é mostrada com uma linha sólida. Os resultados de medição dos exemplos experimentais são mostrados na tabela 3.

[00144] Como mostrado nas figuras 5 a 9, quando os exemplos experimentais 9 e 10 foram usados que continham hidrogenossulfato do azul do nilo como o corante para tingir as plaquetas, as plaquetas foram tingidas suficientemente comparado com os exemplos experimentais 11 a 13 que continham os corantes diferentes do azul do nilo, de modo que as plaquetas puderam ser detectadas na região com maior intensidade de fluorescência.

[00145] Dessa forma, quando o hidrogenossulfato do azul do nilo é usado como o corante para tingir as plaquetas, as plaquetas podem ser medidas com melhor discriminação de outros componentes da célula sanguínea.

[00146] A seguir, foi examinado se as plaquetas podem ser especificamente tingidas usando os reagentes de corante dos exemplos experimentais 9 e 10 contendo hidrogenossulfato do azul do nilo mesmo quando o sangue contém os contaminantes tal como partículas de lipídeo.

[00147] As medições de plaqueta do sangue contendo células vermelhas fragmentadas e do sangue contendo partículas de lipídeo foram executadas com os reagentes do corante dos exemplos experimentais 9 e 10. Os procedimentos experimentais foram os mesmos como acima, exceto que o sangue contendo células vermelhas frag-

mentadas e o sangue contendo partículas de lipídeo foram usados ao invés do sangue total de humano saudável.

[00148] Os diagramas de dispersão obtidos das medições do sangue contendo células vermelhas fragmentadas e do sangue contendo partículas de lipídeo usando o reagente do corante do exemplo experimental 9 são mostrados nas figuras 10 e 11. Os diagramas de dispersão obtidos das medições do sangue contendo células vermelhas fragmentadas e do sangue contendo partículas de lipídeo usando o reagente do corante do exemplo experimental 10 são mostrados nas figuras 12 e 13. Em cada figura, (a) é um diagrama de dispersão tendo o eixo geométrico y da intensidade da luz dispersa dianteira e o eixo geométrico x da intensidade de fluorescência, (b) é um diagrama de dispersão no qual o eixo geométrico y do diagrama de dispersão (a) é convertido para os logaritmos e (c) é uma vista ampliada da área onde as plaquetas aparecem em (b). Em (c), a área onde as plaquetas aparecem é mostrada com uma linha sólida.

[00149] Os resultados das figuras 10 a 13 mostram que os reagentes de corante dos exemplos experimentais 9 e 10 podem tingir especificamente as plaquetas com discriminação clara das células vermelhas fragmentadas ou partículas de lipídeo no sangue. Dessa maneira, quando o hidrogenossulfato do azul do nilo é usado para tingir as plaquetas, as plaquetas podem ser medidas com discriminação clara de outros componentes da célula sanguínea, mesmo quando o sangue contém contaminantes tais como células vermelhas fragmentadas ou partículas de lipídeo.

[00150] De acordo com os exemplos experimentais 1 e 2, é mostrado que os reagentes do corante contendo hidrogenossulfato do azul do nilo tem menos redução na absorvência com o tempo e melhor estabilidade no armazenamento. Além do que, os exemplos experimentais 9 e 10 mostram que o hidrogenossulfato do azul do nilo como o corante

para tingir as plaquetas pode tingir especificamente as plaquetas no sangue, e que isso torna possível executar medições precisas na plaqueta mesmo quando o sangue contém contaminantes tais como células vermelhas fragmentadas ou partículas de lipídeo.

[00151] Exemplos experimentais 14 a 24: propriedades de tintura da plaqueta dos reagentes para medir as plaquetas contendo sulfatos de hidrogênio do azul do nilo em várias concentrações.

[00152] Os reagentes de corante foram preparados contendo hidrogenossulfato do azul do nilo (Merck Co.) nas concentrações indicadas na tabela 4 no etileno glicol.

[00153] Os reagentes de corante obtidos foram combinados com o reagente de diluição descrito nos exemplos experimentais 9 a 13 para medir plaquetas nas amostras seguintes: sangue total de humano saudável, sangue contendo células vermelhas fragmentadas e sangue contendo partículas de lipídeo, como similar aos exemplos experimentais 9 a 13.

Tabela 4

Exemplo experimental	Concentração do corante no reagente do corante (mg/L)	Concentração final do corante na mistura de reagentes e amostra (mg/L)
14	6,0	0,12
15	8,0	0,16
16	9,1	0,18
17	12,5	0,24
18	15,0	0,29
19	16,6	0,32
20	18,3	0,36
21	20,3	0,40
22	22,5	0,44
23	25,5	0,50
24	29,3	0,57

[00154] Os diagramas de dispersão obtidos são mostrados na figu-

ra 14.

[00155] Os resultados na figura 14 mostram que as plaquetas foram suficientemente medidas com o hidrogenossulfato do azul do nilo em todas as concentrações testadas.

[00156] Entre esses, quando a amostra, sangue contendo células vermelhas fragmentadas, foi testada com os reagentes para medir as plaquetas dos exemplos experimentais 17 a 22 (concentração final do hidrogenossulfato do azul do nilo: 0,24 a 0,44 mg/L), as plaquetas foram mais claramente discriminadas de outros componentes da célula sanguínea e contaminantes.

[00157] Exemplo experimental 25: estabilidade no armazenamento dos reagentes para medir as plaquetas contendo hidrogenossulfato do azul do nilo

[00158] O reagente do corante foi preparado contendo 14,4 ppm do hidrogenossulfato do azul do nilo (Merck Co.) no etileno glicol. O reagente do corante foi armazenado na condição de temperatura de 45°C por 16 semanas e usado para a medição das amostras.

[00159] As amostras usadas foram sangue tirado de humano saudável, sangue com pouca plaqueta, sangue contendo lipídeo artificial e sangue contendo células vermelhas fragmentadas. As plaquetas foram medidas como descrito nos exemplos experimentais 9 a 13.

[00160] Os diagramas de dispersão obtidos são mostrados na figura 15.

[00161] Os diagramas de dispersão na figura 15 mostram que as plaquetas puderam ser medidas com discriminação clara dos contaminantes em todas as amostras.

[00162] Esses resultados mostram que, quando o hidrogenossulfato do azul do nilo é usado como o corante para tingir as plaquetas, as plaquetas podem ser medidas precisamente com pouco efeito dos contaminantes, mesmo quando o reagente do corante é armazenado

sob condição desfavorável para o corante.

[00163] A mudança na concentração do corante durante o armazenamento sob a condição acima foi examinada pelos experimentos seguintes.

[00164] A absorvência foi medida como descrito nos exemplos experimentais 1 a 8, exceto que o reagente do corante imediatamente depois da preparação e o reagente do corante depois do armazenamento de 16 semanas foram diluídos para 1/10 com etanol e a absorvência em 628 nm foi medida. Com base na taxa de redução na absorvência medida, a concentração do corante no reagente do corante depois do armazenamento de 16 semanas foi calculada. Os resultados são mostrados na tabela 5 seguinte.

Tabela 5

	Imediatamente depois da preparação	Depois do armazenamento de 16 semanas
Absorvência	0,288	0,262
Taxa de redução (%)	0,00%	-9,03%
[00165] Concentração do corante (ppm)	[00166] 14,40	[00167] 13,10

[00168] Como mostrado na tabela 5, a concentração do corante na solução não diluída depois do armazenamento de 16 semanas foi calculado como 13,1 ppm. Portanto, é mostrado que uma concentração favorável de corante para medições de plaqueta pode ser mantida mesmo depois do armazenamento sob a condição acima.

[00169] Exemplos experimentais 26 a 29: estabilidade de armazenamento dos reagentes para medir as plaquetas contendo azul do nilo e ácido.

[00170] Os experimentos foram executados a fim de estudar a estabilidade no armazenamento das soluções do azul do nilo contendo ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. A estabilidade no armazena-

mento das soluções do azul do nilo foi avaliada medindo a absorvência que é um parâmetro que reflete a concentração efetiva do componente de corante do azul do nilo na solução.

[00171] Nas descrições seguintes, a "taxa de mudança na absorvência" representa a taxa de mudança na absorvência por porcentagem calculada usando o valor de absorvência medido máximo como um valor padrão entre todos os valores de absorvência obtidos do exemplo experimental respectivo.

[00172] Nos exemplos experimentais presentes, o azul do nilo tendo o íon sulfúrico como um contra-íon (azul do nilo A, Sigma) foi usado. Esse azul do nilo foi dissolvido em etileno glicol na concentração de 0,02 mmol/L para preparar a solução do azul do nilo (exemplo comparativo 1).

[00173] Em 5 mL da solução do azul do nilo foi adicionada a substância seguinte na concentração seguinte para obter os exemplos experimentais 26 a 29.

Exemplo experimental

26	ácido clorídrico	2 mmol/L
27	ácido clorídrico	0,02 mmol/L
28	hidróxido de sódio	2 mmol/L
29	hidróxido de sódio	0,02 mmol/L

[00174] Cada solução foi diluída para 1/5 com etanol e a absorvência de cada solução foi medida em 630 nm com um espectrofotômetro, no qual o espectro de absorvência do corante é máximo. As soluções diluídas foram armazenadas sob a condição de temperatura de 60°C e a absorvência em 2 semanas e 4 semanas depois da diluição foi medida para calcular a taxa de mudança na absorvência. O etanol foi usado como um controle na medição da absorvência. Os resultados das medições de absorvência e as taxas de mudança na absorvência são mostrados nas tabelas 6-1 e 6-2, respectivamente.

Tabela 6-1

		Imediatamente depois da pre- paração	Depois de 2 semanas	Depois de 4 semanas
Exemplo comparativo 1		0,5158	0,5033	0,4306
Exemplo experimental	26 (HCl a 2mM)	0,5388	0,0800	0,0055
	27 (HCl a 0,02 mM)	0,5319	0,5286	0,4741
	28 (NaOH a 2 mM)	0,0065	0,0017	0,0047
	29 (NaOH a 0,02 mM)	0,4948	0,4721	0,3825

Tabela 6-2

		Imediatamente depois da pre- paração	Depois de 2 semanas	Depois de 4 semanas
Exemplo comparativo 1		0,0%	-2,4%	-16,5%
Exemplo experimental	26 (HCl a 2mM)	0,0%	-85,2%	-99,0%
	27 (HCl a 0,02 mM)	0,0%	-0,6%	-10,9%
	28 (NaOH a 2 mM)	0,0%	-73,8%	-27,7%
	29 (NaOH a 0,02 mM)	0,0%	-4,6%	-22,7%

[00175] Como mostrado na tabela 6-1, a absorvência inicial do exemplo comparativo 1 foi 0,5158 no qual ácido clorídrico ou hidróxido de sódio não foi adicionado. As taxas de mudança na absorvência do exemplo comparativo 1 foram, como mostrado na tabela 6-2, -2,4% e -16,5% em 2 e 4 semanas depois da preparação, respectivamente.

[00176] As absorvências iniciais dos exemplos experimentais 26 e 27 contendo ácido clorídrico foram, como mostrado na tabela 6-1, 0,5388 e 0,5319, respectivamente, e esses valores não foram significativamente diferentes da absorvência inicial do exemplo comparativo 1.

[00177] As taxas de mudança na absorvência do exemplo experimental 26 contendo concentração de 2 mmol/L de ácido clorídrico foram -85,2% e -99,0% em 2 e 4 semanas, apresentando redução significativa na absorvência com o tempo comparado com o exemplo com-

parativo 1. Isso mostra que a estabilidade no armazenamento das soluções do azul do nilo foi reduzida.

[00178] Por outro lado, as taxas de mudança na absorvência do exemplo experimental 27 contendo concentração de 0,02 mmol/L de ácido clorídrico foram -0,6% e -10,9% em 2 e 4 semanas, mostrando que a redução na absorvência com o tempo foi moderada comparado com o exemplo comparativo 1. Isso mostra que a estabilidade do armazenamento das soluções do azul do nilo foi melhorada.

[00179] As absorvências iniciais dos exemplos experimentais 28 e 29 contendo hidróxido de sódio foram, como mostrado na tabela 6-1, 0,0065 e 0,4948, respectivamente, mostrando que a absorvência inicial foi diminuída comparado com o exemplo comparativo 1.

[00180] As taxas de mudança na absorvência dos exemplos experimentais 28 e 29 foram, como mostrado na tabela 6-2, abaixo de -20% em 4 semanas depois da preparação, mostrando que a redução na absorvência com o tempo foi significativa. Isso mostra que a estabilidade de armazenamento das soluções do azul do nilo foi reduzida.

[00181] Esses resultados experimentais sugeriram que a adição do ácido clorídrico em certas concentrações nas soluções do azul do nilo pode melhorar a estabilidade do armazenamento das soluções do azul do nilo.

[00182] Exemplos experimentais 30 a 36: efeito da razão da concentração molar entre o azul do nilo e o ácido clorídrico na estabilidade do armazenamento dos reagentes para medir plaquetas

[00183] É verificado que a estabilidade no armazenamento das soluções do azul do nilo é melhorada pela adição de certa concentração de ácido clorídrico, de acordo com os exemplos experimentais 26 a 29.

[00184] É considerado que a redução na estabilidade do armazenamento das soluções do azul do nilo, a saber, a redução na concentração efetiva do componente do corante do azul do nilo é devido à

degradação do componente efetivo do corante, de modo que a concentração do ácido clorídrico a ser adicionado nas soluções deve ser examinada em relação ao número de moléculas do azul do nilo.

[00185] Dessa forma, nos presentes exemplos experimentais, as relações entre a razão do azul do nilo e ácido clorídrico (razão de concentração molar) e a estabilidade do armazenamento das soluções do azul do nilo foram examinadas variando a razão de ácido clorídrico e azul do nilo (razão da concentração molar) nas soluções do azul do nilo.

[00186] A estabilidade no armazenamento das soluções do azul do nilo é examinada avaliando a absorvência das soluções do azul do nilo como similar aos exemplos experimentais 26 a 29.

[00187] Como similar aos exemplos experimentais 26 a 29, o azul do nilo A (Sigma) foi dissolvido no etileno glicol na concentração de 0,02 mmol/L para preparar a solução do azul do nilo (exemplo comparativo 2).

[00188] Em 5 mL da solução do azul do nilo foi adicionado ácido clorídrico na concentração seguinte para obter os exemplos experimentais 30 a 36. As razões de concentração molar entre o azul do nilo e o ácido clorídrico nas soluções são descritas em parênteses.

Exemplo experimental

30	Ácido clorídrico	0,002 mmol/L (10:1)
31	Ácido clorídrico	0,006 mmol/L (3:1)
32	Ácido clorídrico	0,02 mmol/L (1:1)
33	Ácido clorídrico	0,06 mmol/L (1:3)
34	Ácido clorídrico	0,2 mmol/L (1:10)
35	Ácido clorídrico	0,6 mmol/L (1:30)
36	Ácido clorídrico	2 mmol/L (1:100)

[00189] As soluções de corante obtidas foram diluídas para 1/20 com etanol e a absorvência de cada solução foi medida em 630 nm

com um espectrofotômetro, no qual o espectro de absorvência do corante é máximo. As soluções do corante foram armazenadas sob a condição de temperatura de 45°C e a absorvência em 4 semanas, 9 semanas e 18 semanas depois da preparação foi medida para calcular a taxa de mudança na absorvência. Etanol foi usado como um controle na medição da absorvência.

[00190] Os resultados das medições de absorvência e as taxas de mudança na absorvência são mostrados nas tabelas 7-1 e 7-2, respectivamente.

		Imediatamente depois da preparação	Depois de 4 semanas	Depois de 9 semanas	Depois de 18 semanas
Exemplo Comparativo 2		0,1342	0,1208	0,1174	0,0986
Exemplo Experimental	30 (HCl a 0,002mM)	0,1369	0,1246	0,1225	0,1051
	31 (HCl a 0,006 mM)	0,1371	0,1277	0,1244	0,1084
	32 (HCl a 0,02 mM)	0,1380	0,1303	0,1308	0,1148
	33 (HCl a 0,06 mM)	0,1381	0,1211	0,0838	0,0245
	34 (HCl a 0,2 mM)	0,1394	0,0255	0,0001	0,0000
	35 (HCl a 0,6 mM)	0,1399	0,0282	0,0006	0,0000
	36 (HCl a 2mM)	0,1399	0,0466	0,0014	0,0000

Tabela 7-2

		Imediatamente depois da preparação	Depois de 4 semanas	Depois de 9 se- manas	Depois de 18 semanas
Exemplo Comparativo 2		0,0%	-10,0%	-12,5%	-26,5%
Exemplo Experimental	30 (HCl 0,002mM)	0,0%	-9,0%	-10,5%	-23,2%
	31 (HCl 0,006 mM)	0,0%	-6,9%	-9,3%	-20,9%
	32 (HCl 0,02 mM)	0,0%	-5,6%	-5,2%	-16,8%
	33 (HCl 0,06 mM)	0,0%	-12,3%	-39,3%	-82,3%
	34 (HCl 0,2 mM)	0,0%	-81,7%	-99,9%	-100,0%
	35 (HCl 0,6 mM)	0,0%	-79,8%	-99,6%	-100,0%
	36 (HCl 2mM)	0,0%	-66,7%	-99,0%	-100,0%

[00191] Como mostrado na tabela 7-1, a absorvência inicial do exemplo comparativo 2 foi 0,1342 no qual nenhum ácido clorídrico foi adicionado. As taxas de mudança na absorvência do exemplo comparativo 2 foram, como mostrado na tabela 7-2, -10,0%, -12,5% e -26,5% em 4, 9 e 18 semanas depois da preparação, respectivamente.

[00192] As absorvências iniciais dos exemplos experimentais 30 a 36 não foram significativamente diferentes dessa do exemplo comparativo 2, como mostrado na tabela 7-1.

[00193] As taxas de mudança na absorvência do exemplo experimental 30 no qual a razão de concentração molar entre o azul do nilo e o ácido clorídrico foi 10:1 foram -9,0%, -10,5% e -23,2% em 4, 9 e 18 semanas depois da preparação, respectivamente.

[00194] As taxas de mudança na absorvência do exemplo experimental 31 no qual a razão de concentração molar entre o azul do Nilo e o ácido clorídrico foi 3:1 foram -6,9%, -9,3% e -20,9% em 4, 9 e 18 semanas depois da preparação, respectivamente.

[00195] As taxas de mudança na absorvência do exemplo experimental 32 no qual a razão de concentração molar entre o azul do Nilo e o ácido clorídrico foi 1:1 foram -5,6%, -5,2% e -16,8% em 4, 9 e 18 semanas depois da preparação, respectivamente.

[00196] Como evidente da comparação com o exemplo comparativo 2, a redução na absorvência dos exemplos experimentais 30 a 32 nos quais a concentração molar de ácido clorídrico é menor do que essa do azul do nilo é moderada em qualquer ponto do tempo do que o exemplo comparativo 2 que não contém ácido clorídrico. Dessa forma, a estabilidade no armazenamento das soluções do azul do nilo é melhorada.

[00197] Em particular, o exemplo experimental 32 no qual a razão de concentração molar entre o azul do nilo e o ácido clorídrico foi 1:1 teve melhor estabilidade no armazenamento do que os outros exem-

plos experimentais.

[00198] Exemplos experimentais 37 a 44: estabilidade no armazenamento dos reagentes para medir plaquetas contendo azul do Nilo e ácido sulfúrico.

[00199] A seguir, a estabilidade no armazenamento das soluções de azul do Nilo foi estudada que continham ácido sulfúrico ao invés do ácido clorídrico.

[00200] Como similar aos exemplos experimentais 26 a 36, azul do nilo A (Sigma) foi dissolvido em etileno glicol na concentração de 0,02 mmol/L para preparar a solução do azul do nilo (exemplo comparativo 3).

[00201] Em 5 mL da solução do azul do nilo foi adicionado ácido sulfúrico na concentração seguinte para obter os exemplos experimentais 37 a 40. As razões de concentração molar entre o azul do nilo e o ácido sulfúrico nas soluções são descritas em parênteses.

Exemplo experimental

37	Ácido Sulfúrico	0,005 mmol/L (4:1)
38	Ácido Sulfúrico	0,01 mmol/L (2:1)
39	Ácido Sulfúrico	0,02 mmol/L (1:1)
40	Ácido Sulfúrico	0,05 mmol/L (1:2.5)

[00202] Soluções de azul do Nilo foram preparadas com azul do Nilo A tendo o íon sulfúrico como um contra-íon (Nacalai Tesque, Inc.) ao invés do azul do nilo A (Sigma) usado nos exemplos experimentais 37 a 40 (exemplo comparativo 4).

[00203] Em 5 mL da solução do azul do nilo foi adicionado ácido sulfúrico na concentração seguinte para obter os exemplos experimentais 41 a 44. As razões de concentração molar entre o azul do nilo e o ácido sulfúrico nas soluções são descritas em parênteses.

Exemplo experimental

41	Ácido Sulfúrico	0,005 mmol/L (4:1)
42	Ácido Sulfúrico	0,01 mmol/L (2:1)
43	Ácido Sulfúrico	0,02 mmol/L (1:1)
44	Ácido Sulfúrico	0,05 mmol/L (1:2.5)

[00204] As absorvências imediatamente depois da preparação das soluções dos exemplos experimentais 37 a 44 foram medidas. Cada solução foi armazenada sob a condição de temperatura de 45°C e a absorvência em um 1 mês, 2 meses, 3 meses e 4 meses depois da preparação foi medida para calcular a taxa de mudança na absorvência.

[00205] Os resultados das medições de absorvência e as taxas de mudança na absorvência dos exemplos experimentais 37 a 40 são mostrados nas tabelas 8-1 e 8-2, respectivamente.

[00206] Os resultados das medições de absorvência e as taxas de mudança na absorvência dos exemplos experimentais 41 a 44 são mostrados nas tabelas 9-1 e 9-2, respectivamente.

Tabela 8-1

		Imediata- mente depois da prepara- ção	Depois de 1 mês	Depois de 2 meses	Depois de 3 meses	Depois de 4 meses
Exemplo comparativo 3		0,2852	0,2849	0,2421	0,2225	0,2076
Exemplo experi- mental	37 (H ₂ SO ₄ a 0,005mM)	0,2887	0,2907	0,2547	0,2367	0,2224
	38 (H ₂ SO ₄ a 0,01mM)	0,2923	0,3045	0,3041	0,2672	0,2545
	39 (H ₂ SO ₄ a 0,02mM)	0,2999	0,3109	0,3009	0,2980	0,3000
	40 (H ₂ SO ₄ a 0,05mM)	0,3076	0,2921	0,2934	0,2123	0,1546

Tabela 8-2

		Imediatamente depois da pre- paração	Depois de 1 mês	Depois de 2 meses	Depois de 3 meses	Depois de 4 meses
Exemplo comparativo 3		0,0%	-0,1%	-15,1%	-22,0%	-27,2%
Exemplo experi- mental	37 (H ₂ SO ₄ a 0,005mM)	0,0%	0,7%	-11,8%	-18,0%	-23,0%
	38 (H ₂ SO ₄ a 0,01mM)	0,0%	4,2%	4,0%	-8,6%	-12,9%
	39 (H ₂ SO ₄ a 0,02mM)	0,0%	3,7%	0,3%	-0,6%	0,0%
	40 (H ₂ SO ₄ a 0,05mM)	0,0%	-5,0%	-4,6%	-31,0%	-49,7%

Tabela 9-1

		Imediatamente depois da pre- paração	Depois de 1 mês	Depois de 2 meses	Depois de 3 meses	Depois de 4 meses
Exemplo comparativo 4		0,2941	0,2901	0,2552	0,2449	0,2136
Exemplo experi- mental	41 (H ₂ SO ₄ a 0,005mM)	0,2981	0,2990	0,2752	0,2633	0,2346
	42 (H ₂ SO ₄ a 0,01mM)	0,3013	0,3120	0,3041	0,3024	0,2885
	43 (H ₂ SO ₄ a 0,02mM)	0,3068	0,3155	0,3009	0,2832	0,2562
	44 (H ₂ SO ₄ a 0,05mM)	0,3140	0,3159	0,2934	0,2660	0,2092

Tabela 9-2

		Imediatamente depois da pre- paração	Depois de 1 mês	Depois de 2 meses	Depois de 3 meses	Depois de 4 meses
Exemplo comparativo 4		0,0%	-1,4%	-13,2%	-16,7%	-27,4%
Exemplo experi- mental	41 (H ₂ SO ₄ a 0,005mM)	0,0%	0,3%	-7,7%	-11,7%	-21,3%
	42 (H ₂ SO ₄ a 0,01mM)	0,0%	3,6%	0,9%	0,4%	-4,2%
	43 (H ₂ SO ₄ a 0,02mM)	0,0%	2,8%	-1,9%	-7,7%	-16,5%
	44 (H ₂ SO ₄ a 0,05mM)	0,0%	0,6%	-6,6%	-15,3%	-33,4%

[00207] Como evidente da tabela 8-2, a redução na absorvência dos exemplos experimentais 37 a 39 nos quais a concentração molar

de ácido sulfúrico contido é menor do que essa do azul do nilo é moderada em qualquer ponto do tempo comparado com o exemplo comparativo 3 que não contém ácido sulfúrico. Dessa maneira, a estabilidade no armazenamento das soluções do azul do nilo é melhorada.

[00208] Além do que, como evidente da tabela 9-2, a redução da absorvência dos exemplos experimentais 41 a 43 nos quais a concentração molar de ácido sulfúrico contido é menor do que essa do azul do nilo é moderada em qualquer ponto do tempo comparado com o exemplo comparativo 4 que não contém ácido sulfúrico. Dessa forma, a estabilidade no armazenamento das soluções do azul do nilo é melhorada.

[00209] Em particular, as taxas de mudança na absorvência depois de 4 meses dos exemplos experimentais 39 e 42 nos quais a razão de concentração molar entre o azul do nilo e o ácido sulfúrico foi 2:1 a 1:1 foram 0,0% e -4,2%, respectivamente, mostrando a estabilidade no armazenamento particularmente favorável do mesmo.

[00210] Dessa forma, é demonstrado que a estabilidade no armazenamento das soluções do azul do nilo é melhorada adicionando um ácido nas soluções do azul do nilo na concentração que é igual a ou menor do que a concentração molar do azul do nilo.

[00211] Incidentalmente, as concentrações ótimas de ácido sulfúrico nas soluções de azul do nilo foram diferentes entre os exemplos experimentais 37 a 40 e 41 a 44. Isso é considerado ser devido à diferença na pureza do azul do nilo contido nos reagentes comerciais de azul do nilo e pode estar dentro da faixa de erro.

[00212] Exemplos experimentais 45 a 48: propriedade de tintura da plaqueta dos reagentes para medir plaquetas contendo azul do nilo e ácido.

[00213] Os experimentos seguintes foram executados a fim de estudar a propriedade de tintura das plaquetas dos reagentes para medir as plaquetas contendo azul do nilo.

[00214] Os reagentes para medir as plaquetas e o reagente de diluição tendo as composições seguintes foram preparados.

(1) Reagentes para medir plaquetas

Corante para tingir as plaquetas Nas concentrações mostradas na tabela 10

Etileno glicol 1L

(2) Solução de diluição

Tricina (agente de tamponamento)	1,8g
----------------------------------	------

Cloreto de Lauriltrimetilamônio (LTAC)	0,15 g
--	--------

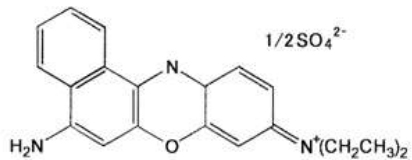
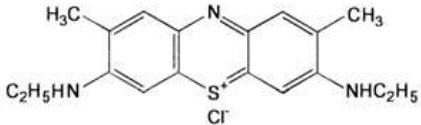
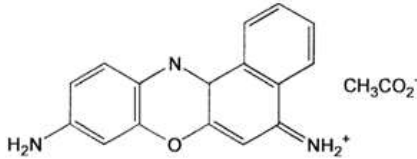
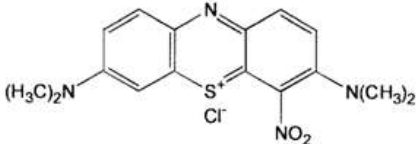
Água purificada	1L
-----------------	----

(ajustado para pH 9,0 e osmolalidade 200 mOsm/kg.H₂O)

[00215] Os corantes usados para medir as plaquetas foram os corantes mostrados na tabela 10 nas concentrações mostradas na tabela 10. As concentrações finais do corante na mistura do reagente, solução de diluição e uma amostra são mostradas em parênteses. As fórmulas químicas dos corantes são mostradas na tabela 10.

[00216] As medições das plaquetas foram executadas como descrito nos exemplos experimentais 9 a 13.

Tabela 10

	Corante	concentração	estrutura	resultados
Ex. 45	azul do nilo A (Wako Pure Chemicals)	18,4ppm (0,3ppm)		tintura suficiente das plaquetas
Ex. 46	Azul de metileno NNX (Sigma)	102,5ppm (2ppm)		tintura suficiente das plaquetas
Ex. 47	Acetato de violeta cresilo (Sigma)	1025ppm (20ppm)		Sem tintura
Ex. 48	Verde básico 5 (Tokyo Chemical Industry)	1025ppm (20ppm)		tintura suficiente das plaquetas

[00217] Os diagramas de dispersão obtidos com os exemplos experimentais 45 a 48 são mostrados nas figuras 16 a 19, respectivamente. Em cada figura, (a) é um diagrama de dispersão tendo o eixo geométrico y da intensidade da luz dispersa dianteira e o eixo geométrico x da intensidade de fluorescência e (b) é um diagrama de dispersão no qual o eixo geométrico y do diagrama de dispersão (a) é convertido para os logaritmos. Em (b), a área onde as plaquetas aparecem é mostrada com uma linha sólida.

[00218] Os resultados de medição com os exemplos experimentais são mostrados na tabela 10.

[00219] Como mostrado na figura 16, quando o exemplo experimental 45 foi usado no qual o azul do nilo foi usado como o corante, o grupo de plaquetas aparece na área tendo alta fluorescência no diagrama de dispersão, mostrando que as plaquetas foram tingidas suficientemente.

[00220] Por outro lado, quando os exemplos experimentais 46 a 48 foram usados, no qual os corantes diferentes de azul do nilo foram usados, o grupo de plaquetas ficou concentrado na área tendo baixa fluorescência no diagrama de dispersão, mostrando que as propriedades de tintura das plaquetas não foram suficientes.

[00221] Dessa forma, é sugerido que, quando o azul do nilo é usado como o corante para medir as plaquetas, as plaquetas podem ser suficientemente tingidas comparado com os outros corantes. Além do que, é sugerido que, quando as plaquetas são tingidas com azul do nilo, as plaquetas podem ser detectadas precisamente com a intensidade da luz dispersa dianteira e a intensidade da fluorescência.

[00222] A seguir, foi estudado se as plaquetas poderiam ser especificamente tingidas usando o reagente para medir as plaquetas do exemplo experimental 45 contendo azul do nilo e um ácido mesmo quando o sangue continha os contaminantes, tais como partículas de

lipídeo, de acordo com os experimentos similares como descrito nos exemplos 9 a 13.

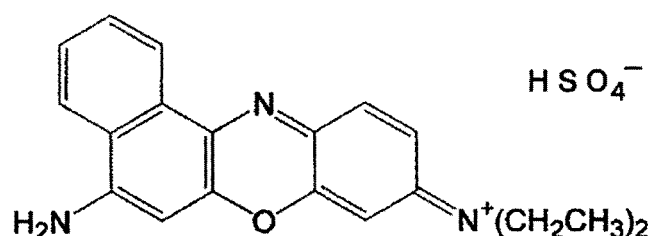
[00223] As figuras 20 e 21 mostram os diagramas de dispersão obtidos medindo o sangue contendo células vermelhas fraturadas e o sangue contendo partículas de lipídeo com o reagente para medir as plaquetas do exemplo experimental 45. Em cada figura, (a) é um diagrama de dispersão tendo o eixo geométrico y da intensidade de luz dispersa dianteira e o eixo geométrico x da intensidade de fluorescência, (b) é um diagrama de dispersão no qual o eixo geométrico y do diagrama de dispersão (a) é convertido para os logaritmos e (c) é uma imagem ampliada da área onde as plaquetas aparecem em (b). Em (c), a área onde as plaquetas aparecem é mostrada com uma linha sólida.

[00224] Os resultados nas figuras 20 e 21 mostram que os grupos de plaquetas contidos nas amostras aparecem nos diagramas de dispersão distintamente dos outros componentes nas amostras, tais como células vermelhas fraturadas ou partículas de lipídeo. De acordo com esses resultados, é demonstrado que as plaquetas podem ser distintamente detectadas e precisamente medidas com os reagentes para medir as plaquetas da presente invenção mesmo quando o sangue contém os contaminantes, tais como células vermelhas fraturadas ou partículas de lipídeo.

[00225] O presente pedido refere-se ao pedido de patente japonês No 2008-36013, 2008-79785 e 2008-247484 respectivamente depositados em 18 de fevereiro de 2008, 26 de março de 2008 e 26 de setembro de 2008, cujas reivindicações, relatórios descritivos, desenhos e resumos são incorporados aqui por referência.

REIVINDICAÇÕES

1. Conjunto de reagentes para medir plaquetas sanguíneas, caracterizado pelo fato de que compreende, como um corante para corar as plaquetas sanguíneas, um composto da fórmula (III) seguinte:



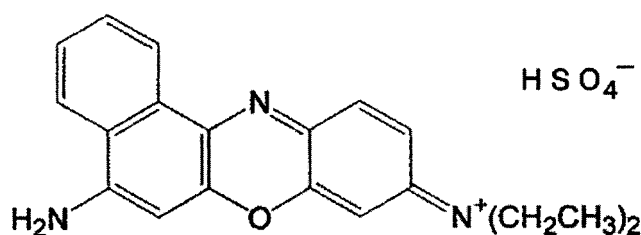
(III)

e pelo menos um solvente orgânico solúvel em água selecionado do grupo que consiste em etileno glicol, dietileno glicol e polietileno glicol,

sendo que o referido composto é dissolvido no referido solvente orgânico solúvel em água.

2. Conjunto de reagentes de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:

um primeiro reagente que compreende, como um corante para corar as plaquetas sanguíneas, um composto da fórmula (III) seguinte:



(III)

e pelo menos um solvente orgânico solúvel em água selecionado do grupo que consiste em etileno glicol, dietileno glicol e polietileno glicol,

sendo que o referido composto é dissolvido no referido solvente orgânico solúvel em água, e

um segundo reagente que compreende um agente de tamponamento.

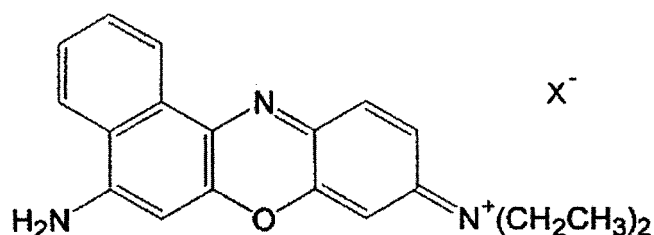
3. Conjunto de reagentes de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o segundo reagente é um tampão tendo pH de 6,0 a 11,0.

4. Conjunto de reagentes de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o segundo reagente apresenta uma osmolalidade de 150 a 600 mOsm/kg.

5. Conjunto de reagentes de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o segundo reagente compreende ainda um tensoativo para acelerar a coloração das plaquetas sanguíneas com o corante.

6. Conjunto de reagentes de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o tensoativo é um tensoativo catiônico.

7. Conjunto de reagentes para medir plaquetas sanguíneas, caracterizado pelo fato de que compreende, como um corante para corar as plaquetas sanguíneas, um composto da fórmula (II) seguinte:



(II)

sendo que X⁻ é um ânion selecionado do grupo consistindo em HSO₄⁻, ½ SO₄²⁻, Cl⁻ e ClO₄⁻, um ácido, e

pelo menos um solvente orgânico solúvel em água selecionado do grupo que consiste em etileno glicol, dietileno glicol e polietileno glicol,

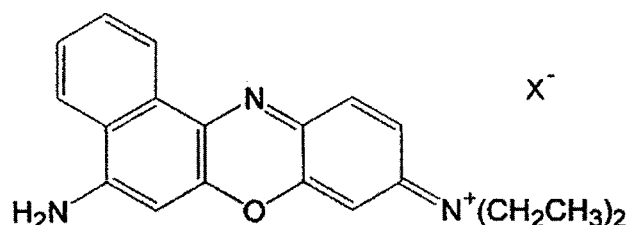
sendo que o referido composto é dissolvido no referido solvente orgânico solúvel em água.

8. Conjunto de reagentes de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o ácido é um ácido inorgânico.

9. Conjunto de reagentes de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que a razão de concentração molar entre o corante e o ácido é 10:1 a 1:1.

10. Conjunto de reagentes de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 9, caracterizado pelo fato de que compreende:

um primeiro reagente que compreende, como um corante para corar as plaquetas sanguíneas, um composto da fórmula (II) seguinte:



(II)

sendo que X⁻ é um ânion selecionado do grupo consistindo em HSO₄⁻, ½ SO₄²⁻, Cl⁻ e ClO₄⁻, um ácido, e

pelo menos um solvente orgânico solúvel em água selecionado do grupo que consiste em etileno glicol, dietileno glicol e polietileno glicol,

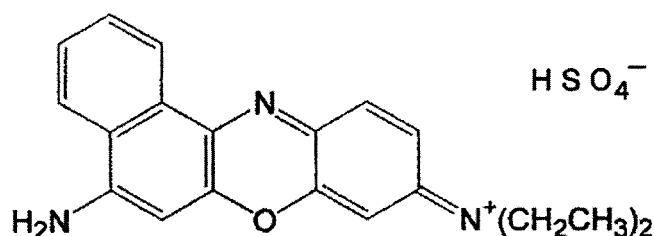
sendo que o referido composto é dissolvido no referido solvente orgânico solúvel em água, e

um segundo reagente que compreende um agente de tamponamento.

11. Conjunto de reagentes de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10, caracterizado pelo fato de que a razão de concentração molar entre o corante e o ácido no primeiro reagente é 10:1 a 1:1.

12. Método para medir plaquetas sanguíneas, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

misturar um primeiro reagente que compreende, como um corante para corar as plaquetas sanguíneas, um composto da fórmula (III) seguinte:



(III)

e pelo menos um solvente orgânico solúvel em água selecionado do grupo que consiste em etileno glicol, dietileno glicol e polietileno glicol,

sendo que o referido composto é dissolvido no referido solvente orgânico solúvel em água, e

uma amostra com ou sem a adição de um segundo reagente que compreende um agente de tamponamento para preparar uma amostra de medição,

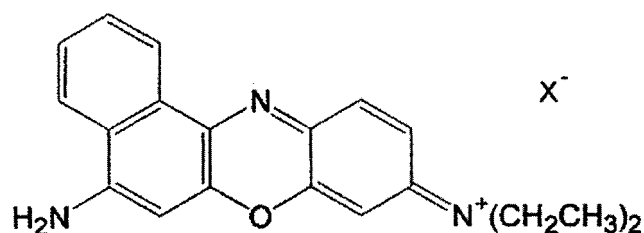
aplicar luz nas células na amostra de medição obtida para detectar a luz dispersa e a fluorescência emitidas das células; e

detectar as plaquetas sanguíneas contidas na amostra de medição com base na luz dispersa e fluorescência detectadas.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma etapa de contagem das plaquetas sanguíneas detectadas.

14. Método para medir plaquetas sanguíneas, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

misturar um primeiro reagente que compreende um composto da fórmula (II) seguinte:



(II)

sendo que X⁻ é um ânion selecionado do grupo consistindo em HSO₄⁻, ½ SO₄²⁻, Cl⁻ e ClO₄⁻, um ácido e pelo menos um solvente orgânico solúvel em água selecionado do grupo que consiste em etileno glicol, dietileno glicol e polietileno glicol,

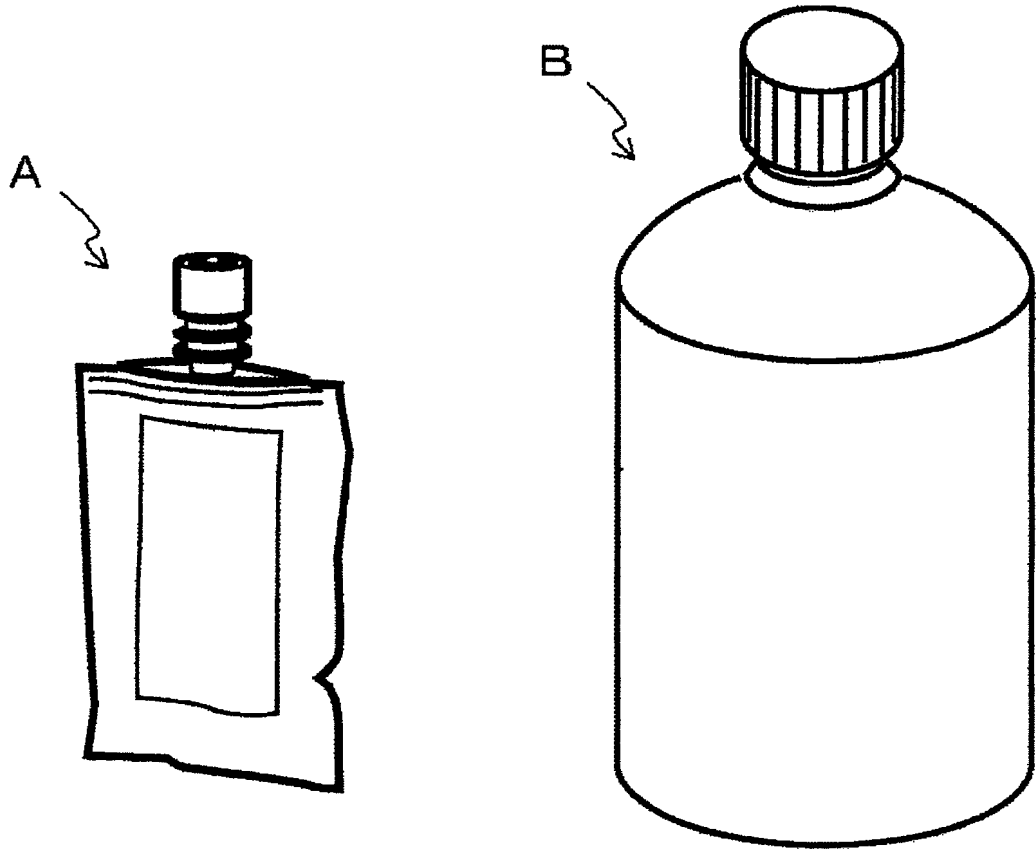
sendo que o referido composto é dissolvido no referido solvente orgânico solúvel em água, e uma amostra com ou sem a adição de um segundo reagente que compreende um agente de tamponamento para preparar uma amostra de medição,

aplicar luz nas células na amostra de medição obtida para detectar a luz dispersa e a fluorescência emitidas das células; e

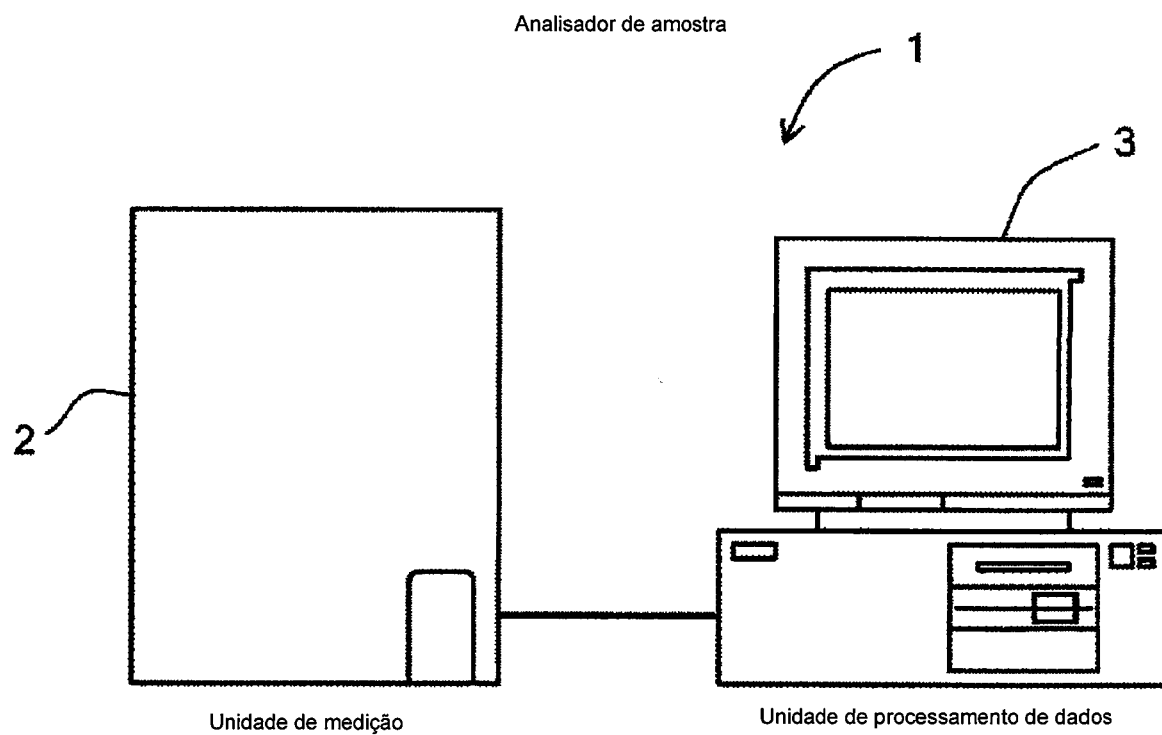
detectar as plaquetas sanguíneas contidas na amostra de medição com base na luz dispersa e fluorescência detectadas.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma etapa de contagem das plaquetas sanguíneas detectadas.

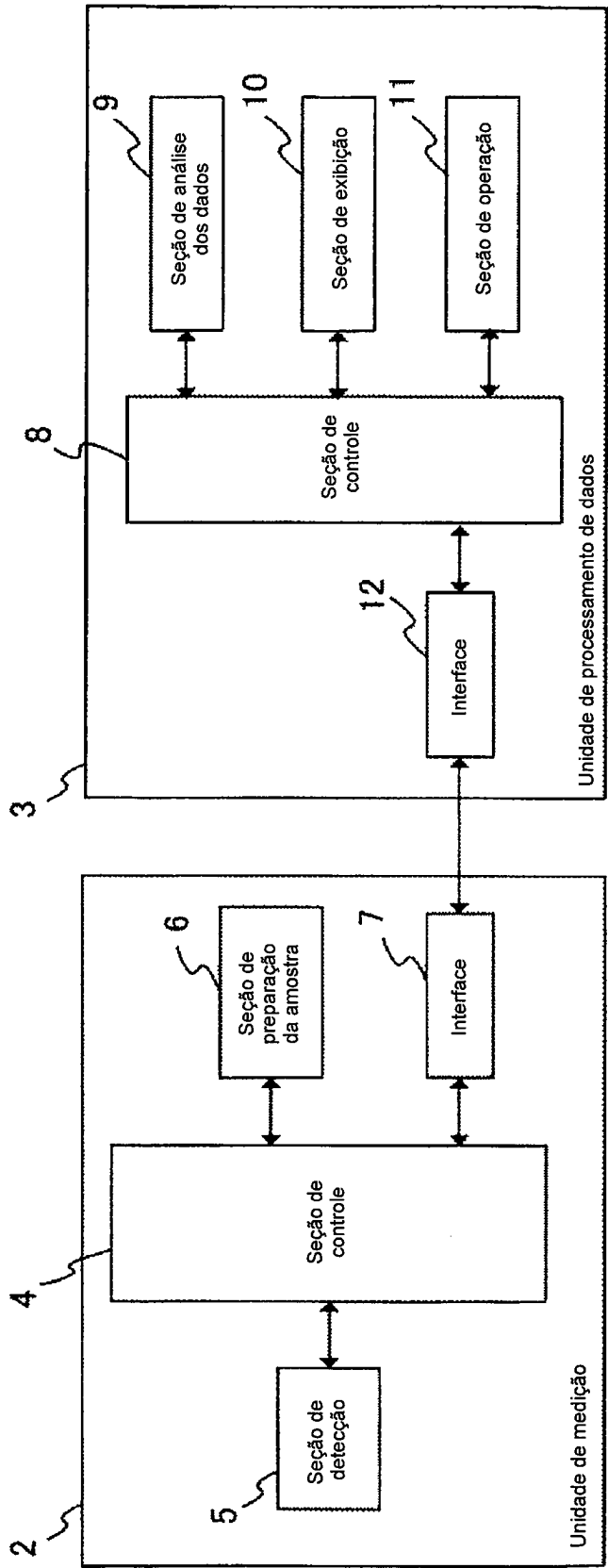
[Fig. 1]



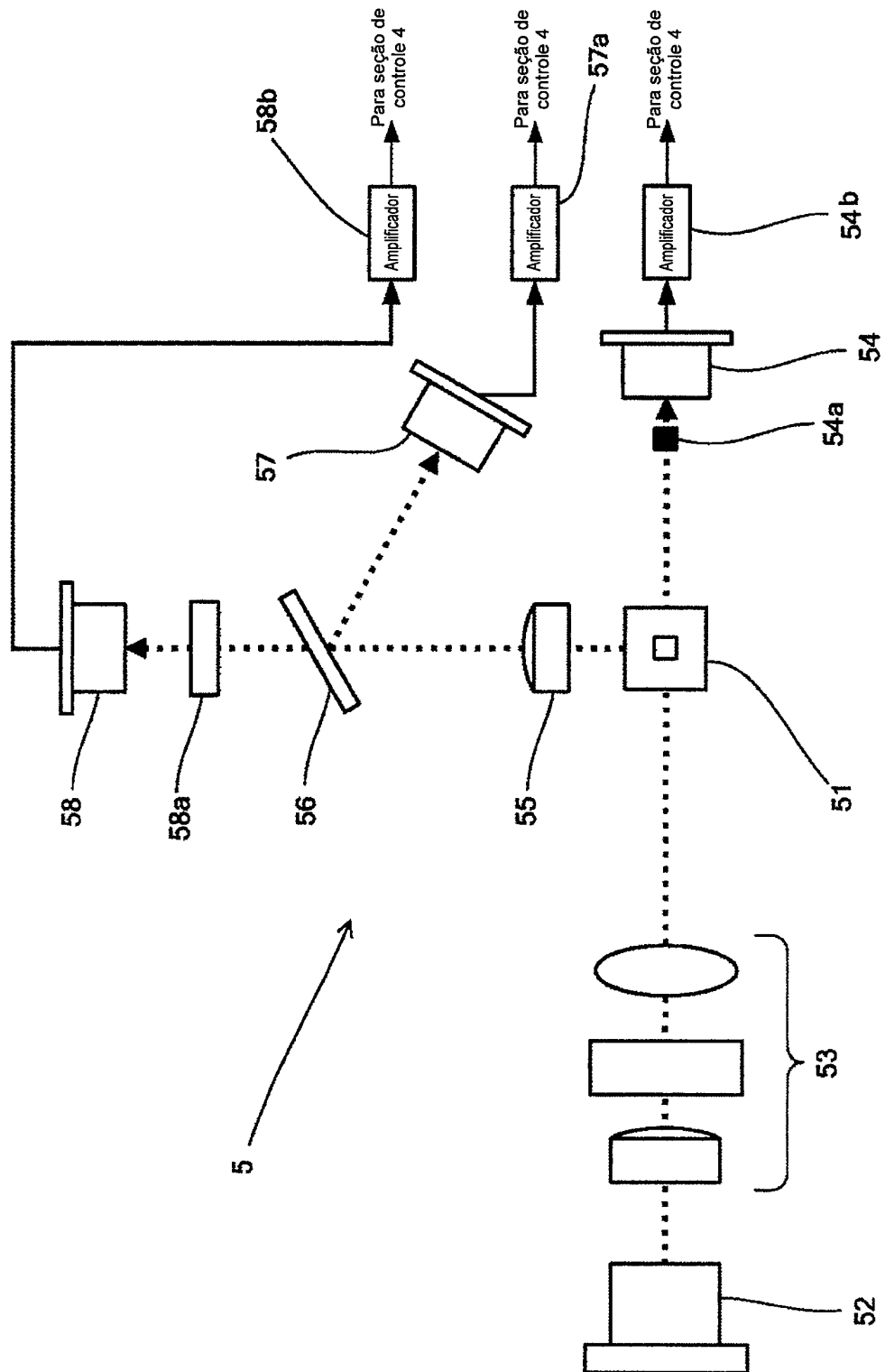
[Fig. 2]



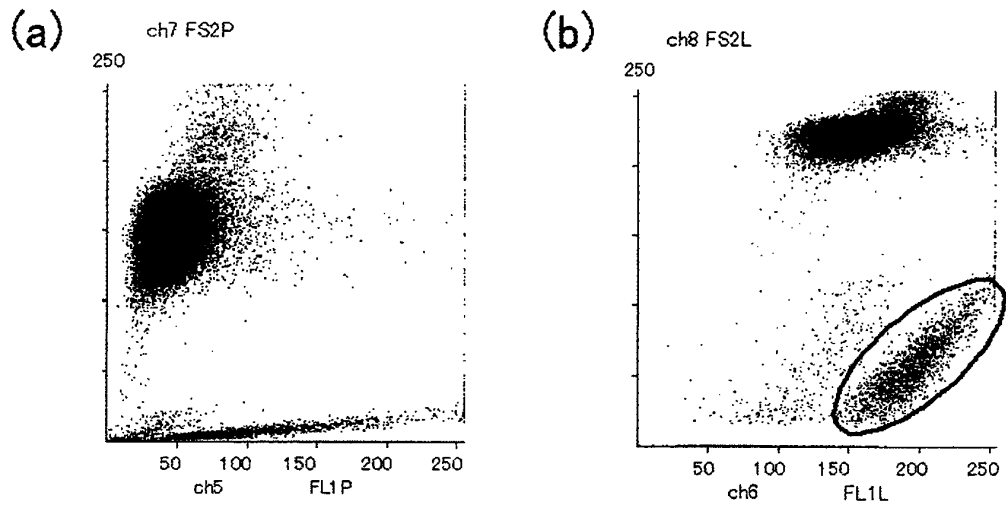
[Fig. 3]



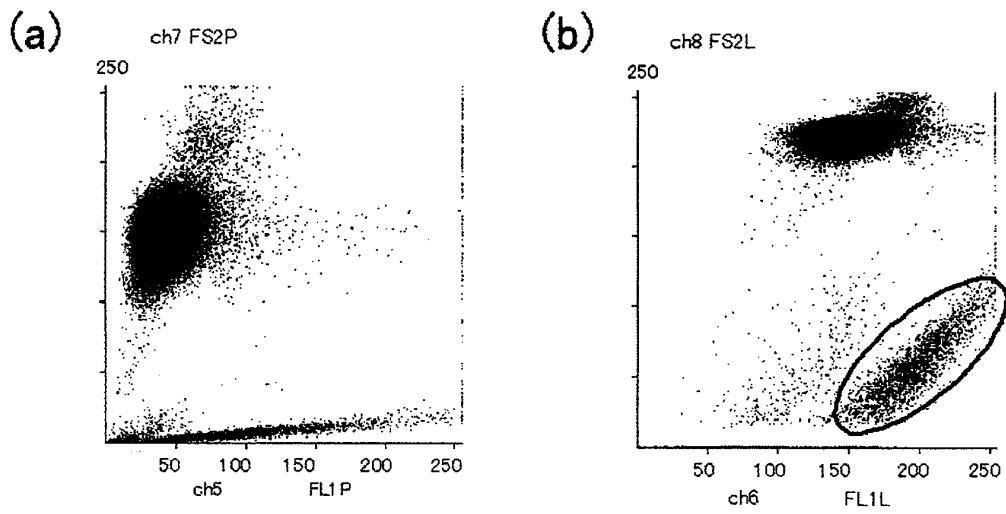
[Fig. 4]



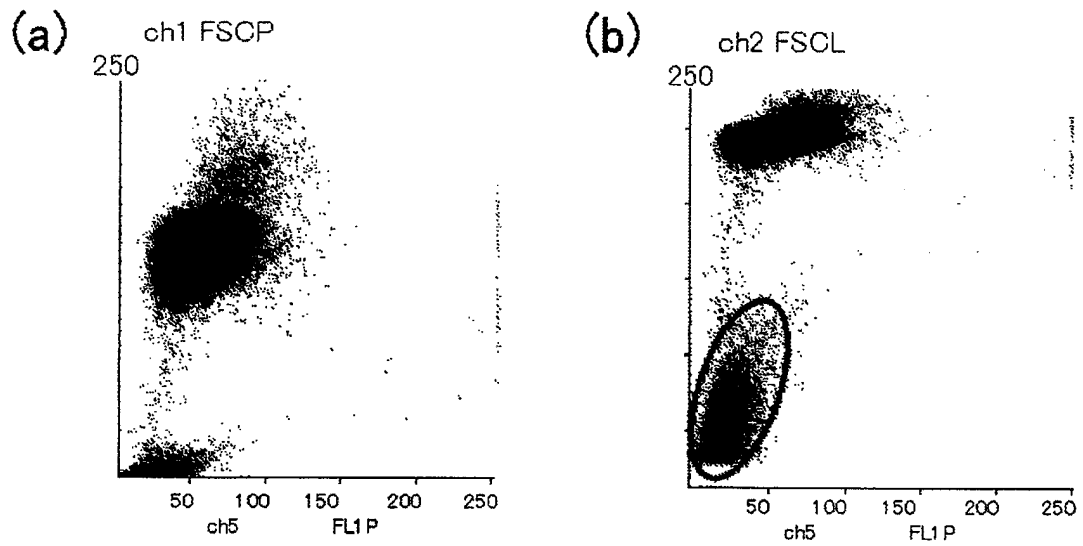
[Fig. 5]



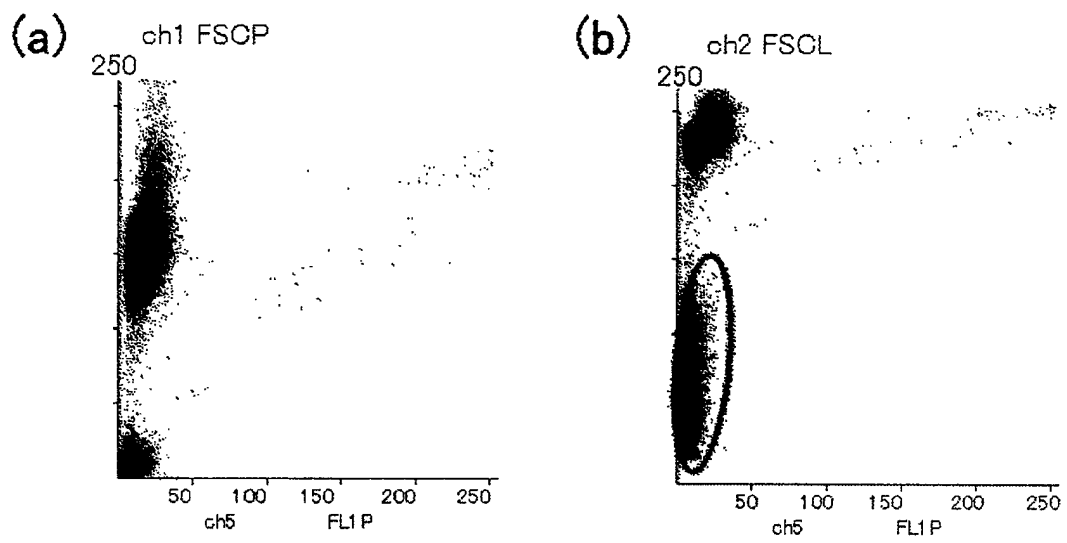
[Fig. 6]



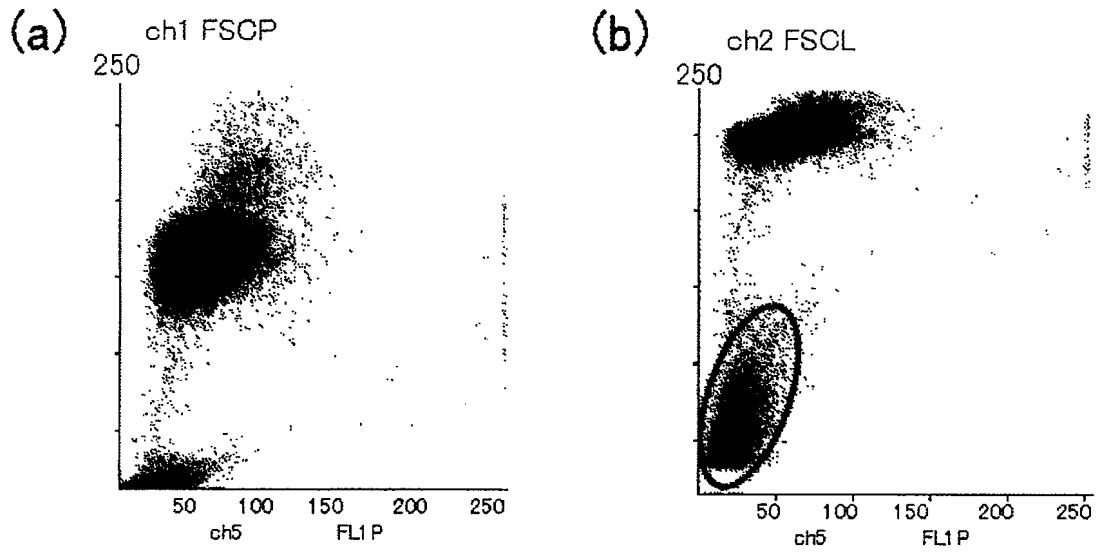
[Fig. 7]



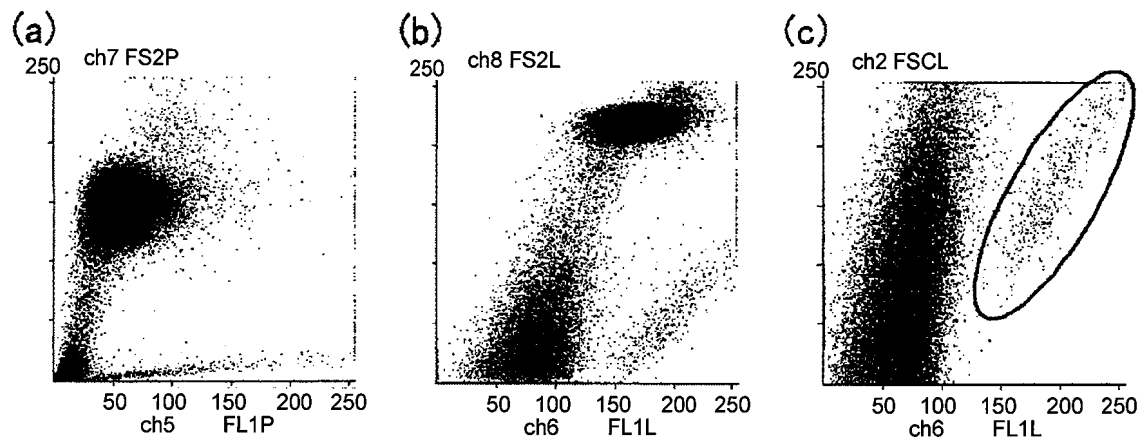
[Fig. 8]



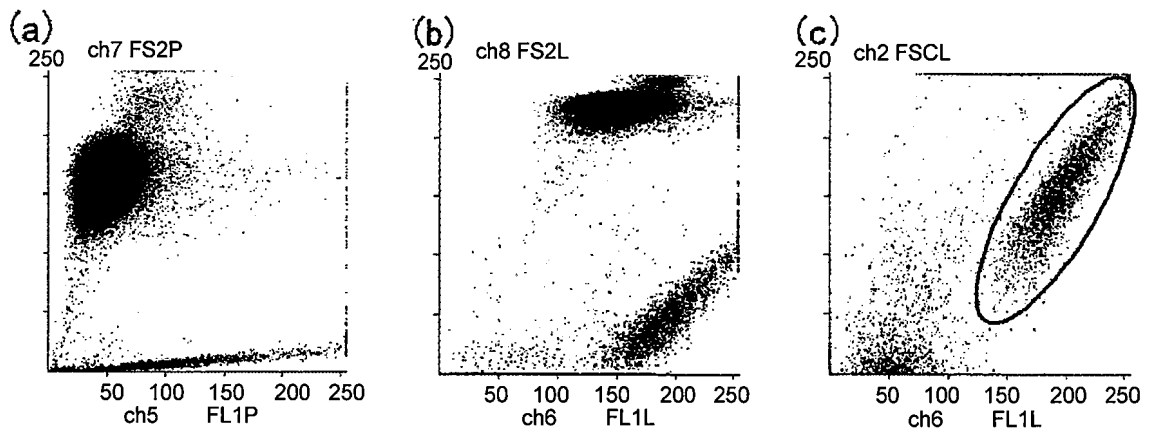
[Fig. 9]



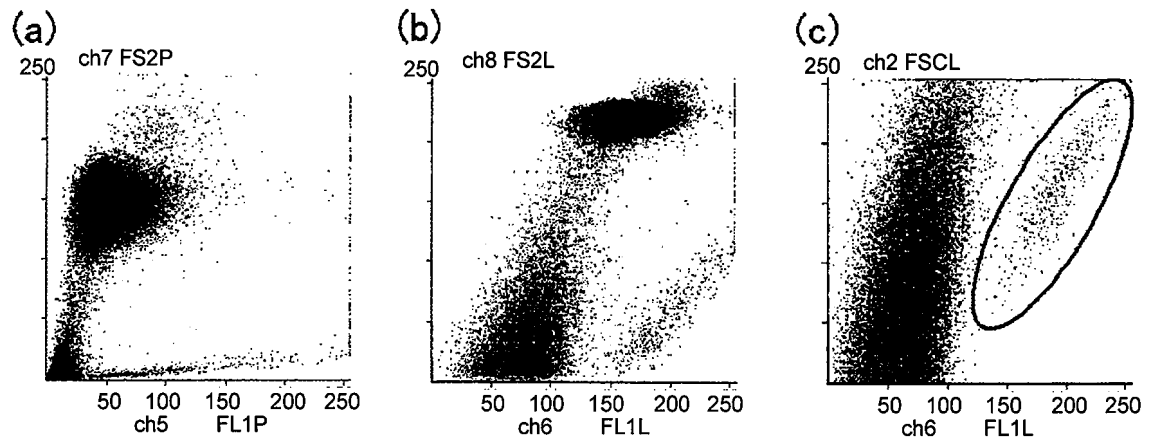
[Fig. 10]



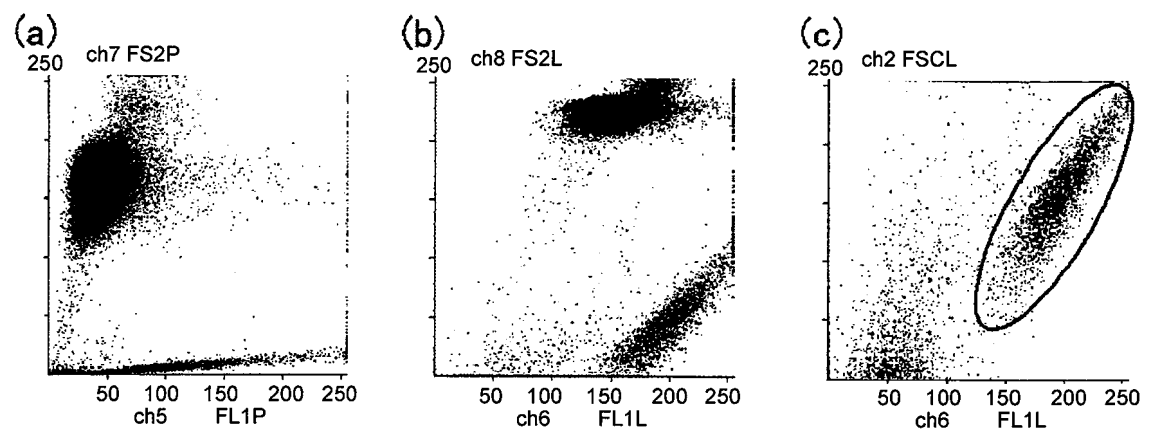
[Fig. 11]



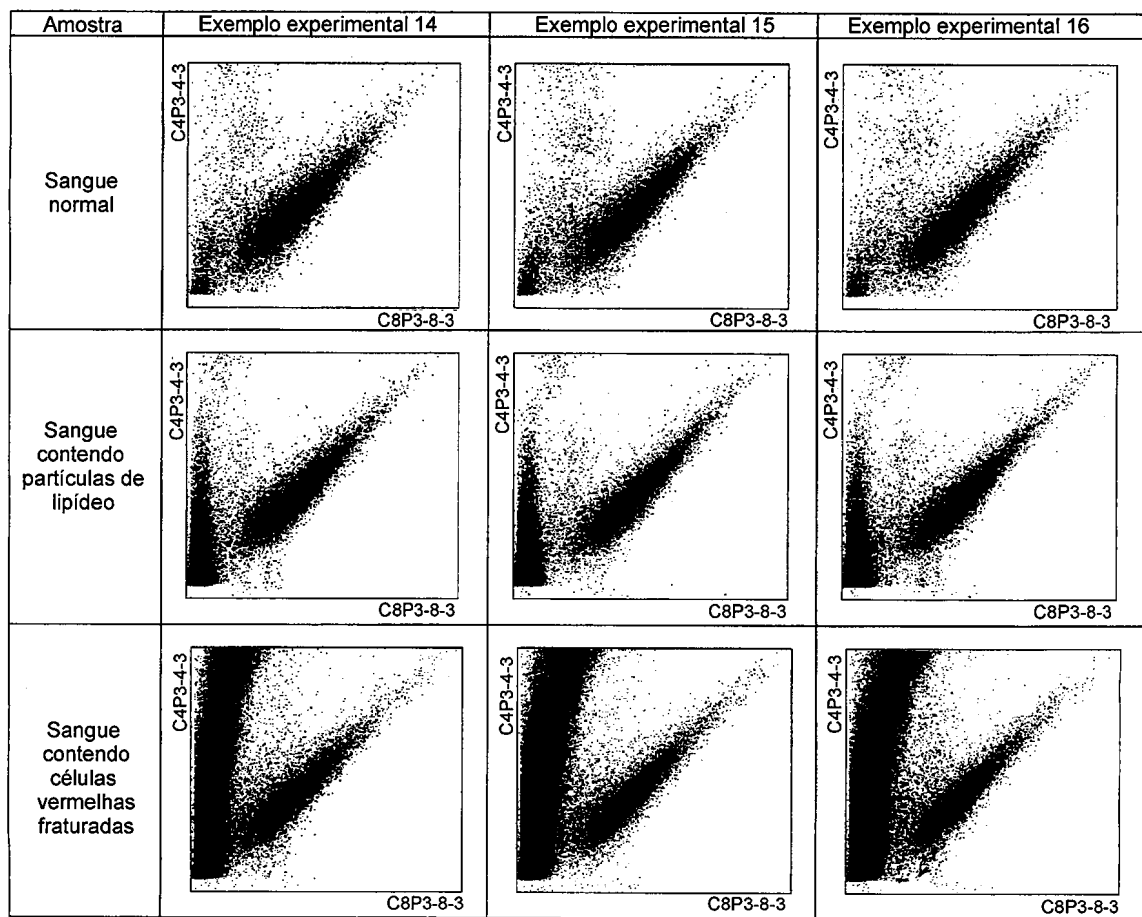
[Fig. 12]



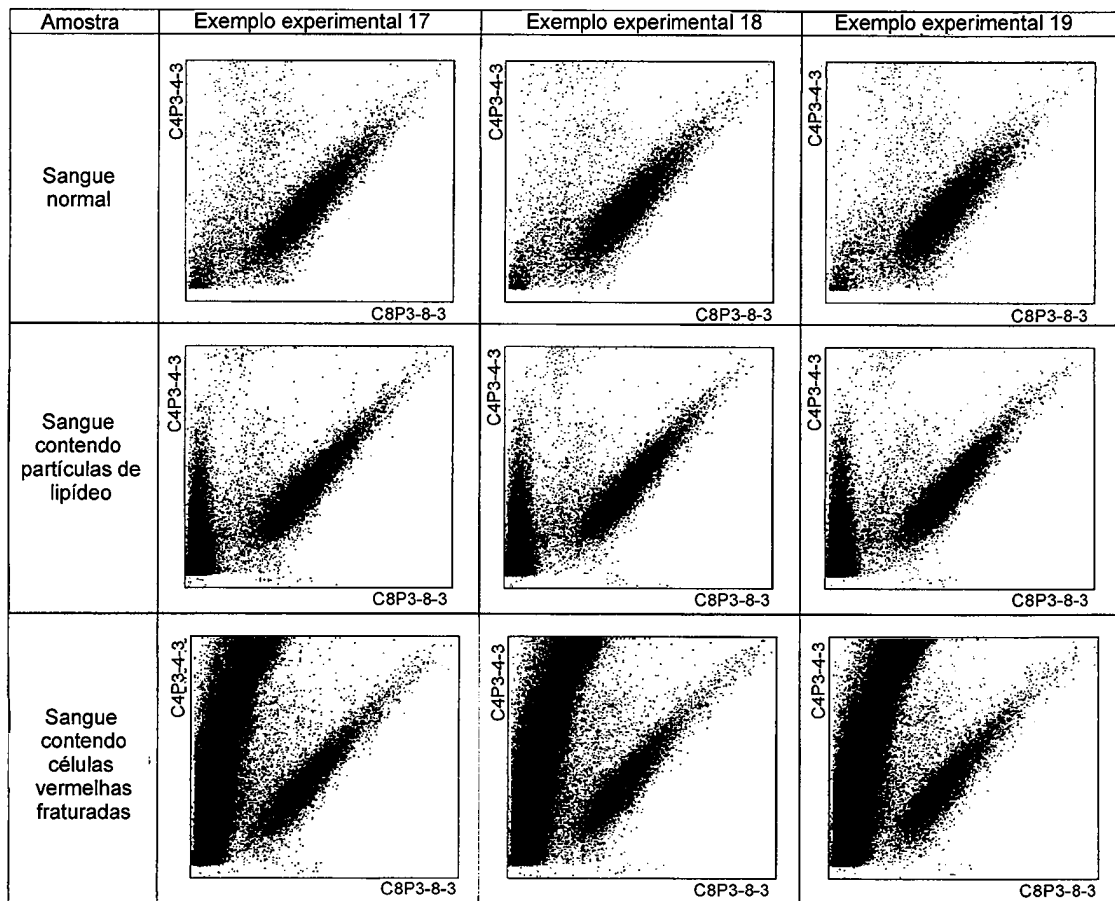
[Fig. 13]



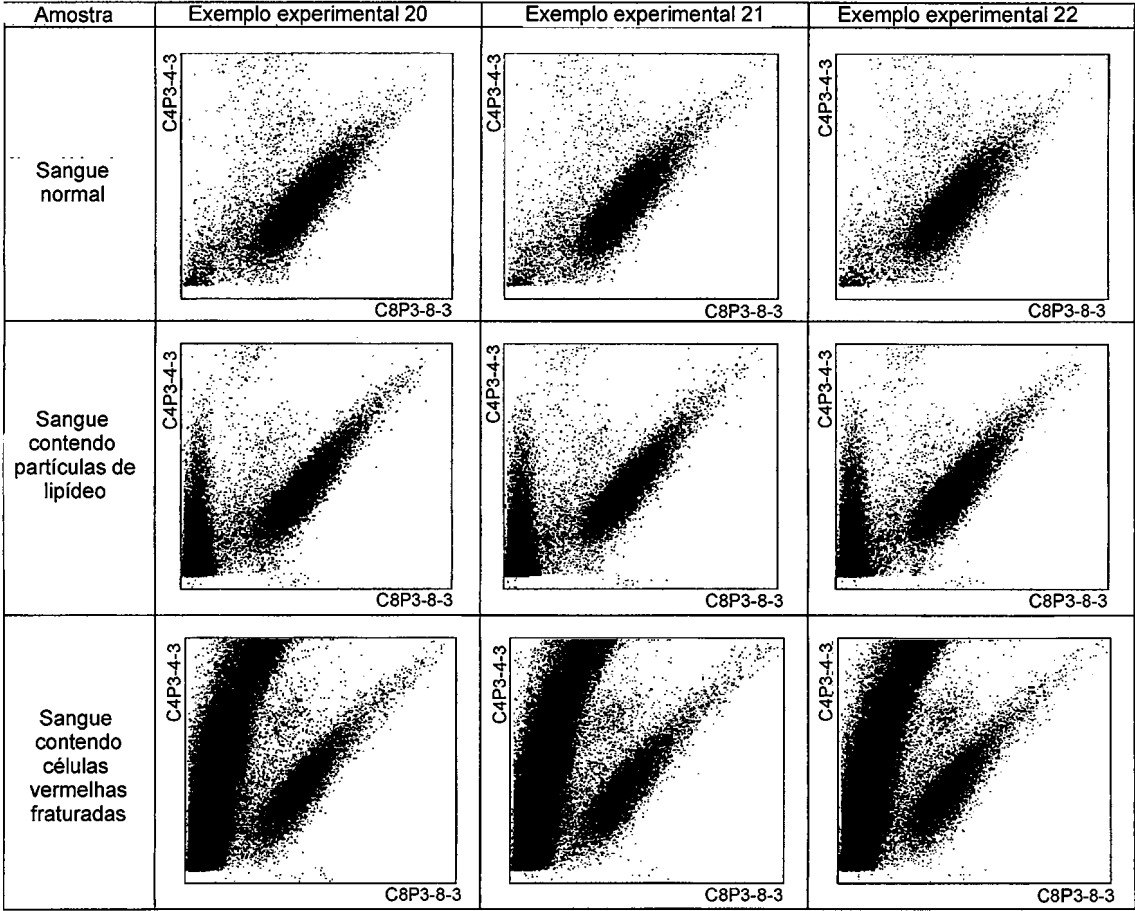
[Fig. 14-1]



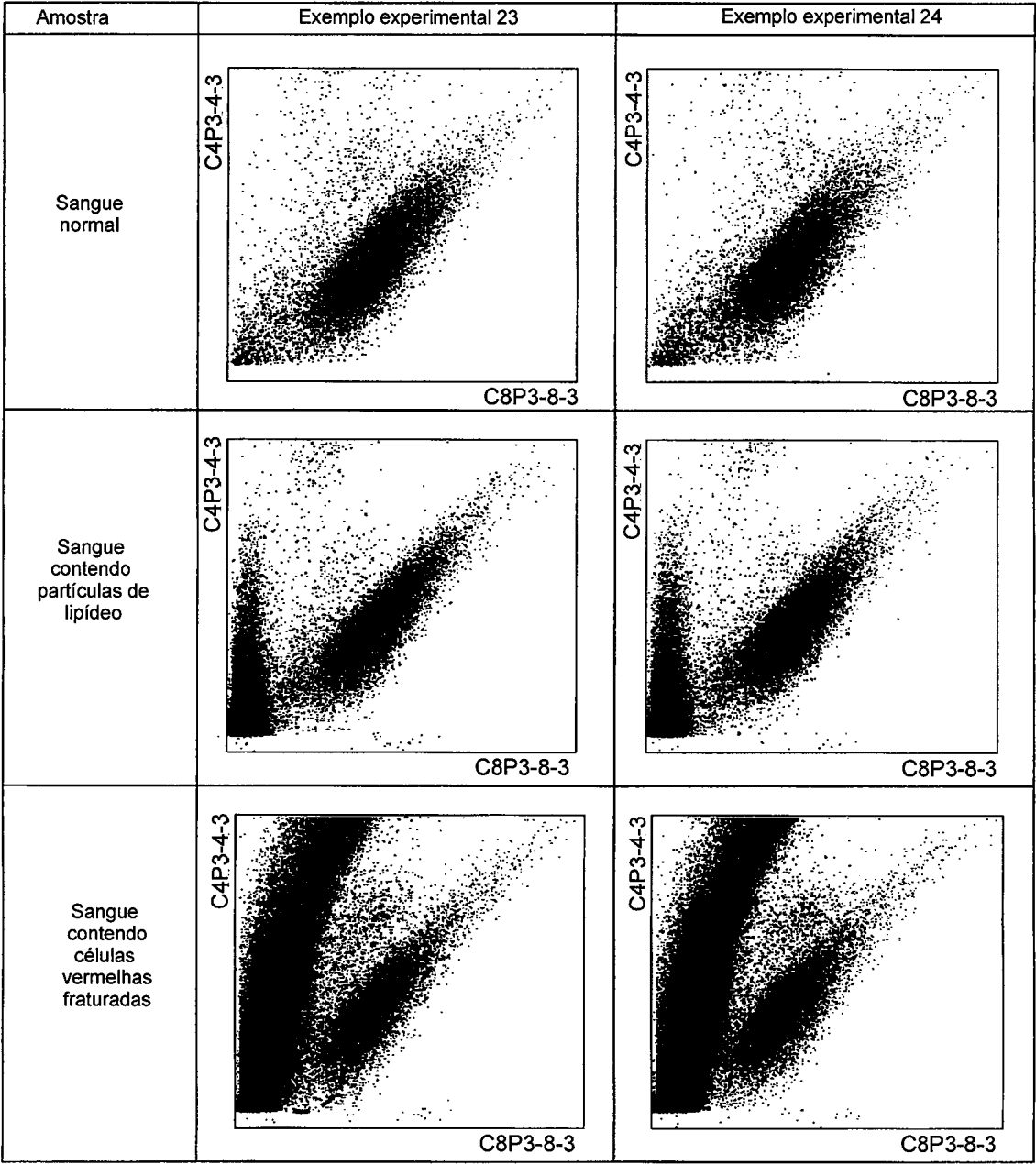
[Fig. 14-2]



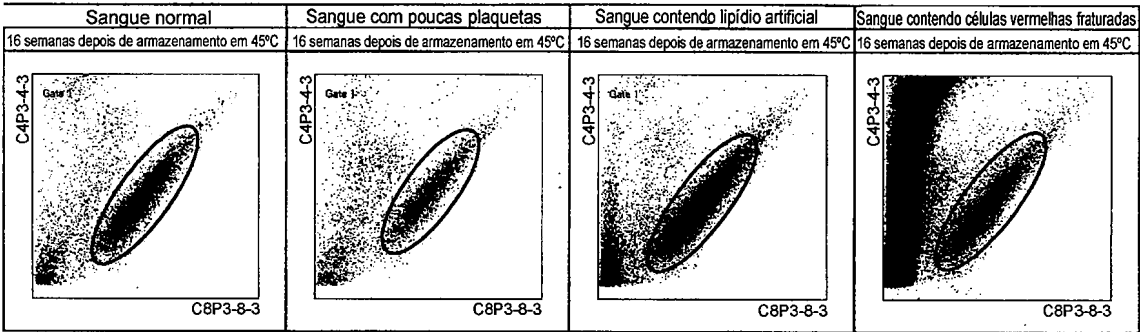
[Fig. 14-3]



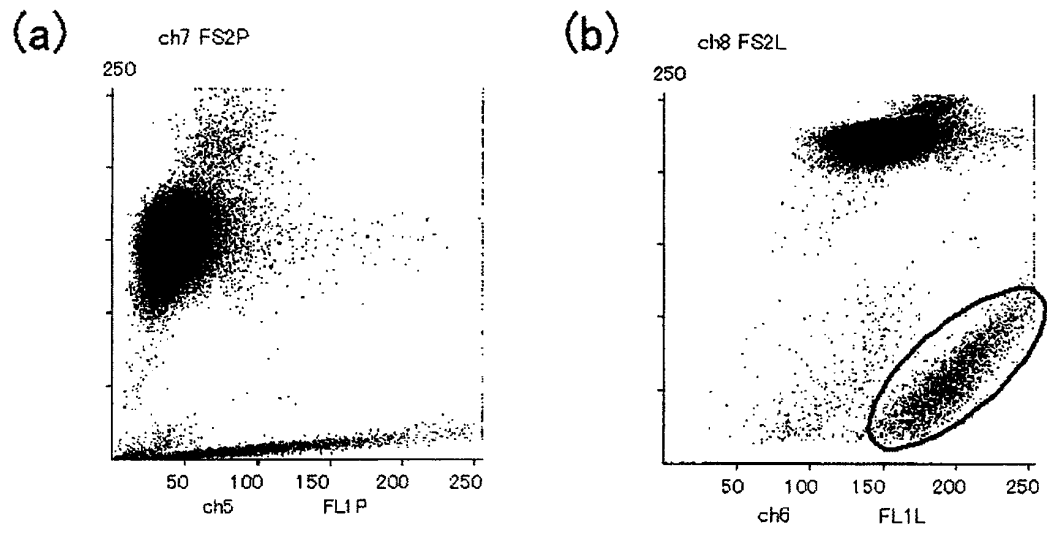
[Fig. 14-4]



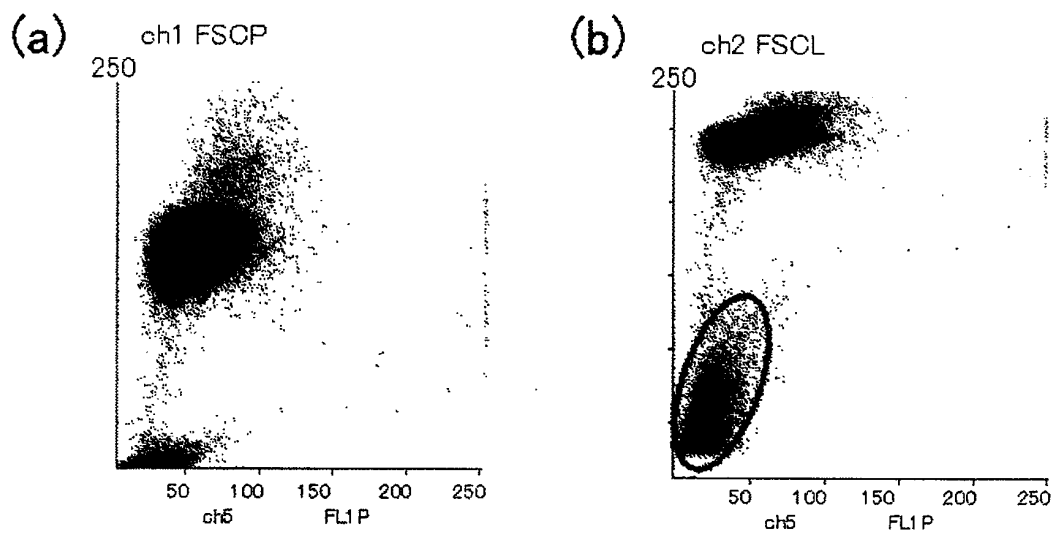
[Fig. 15]



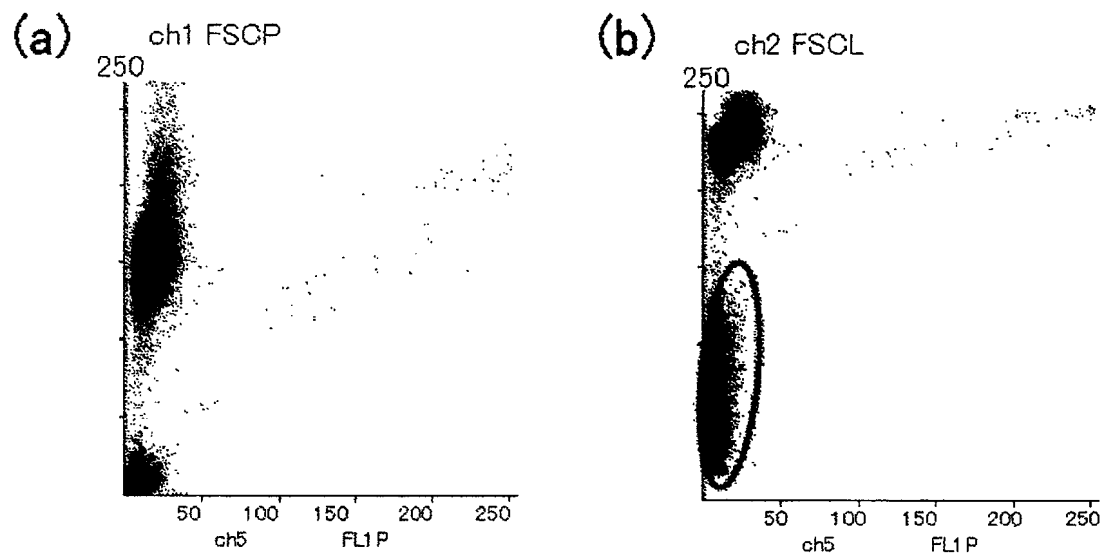
[Fig. 16]



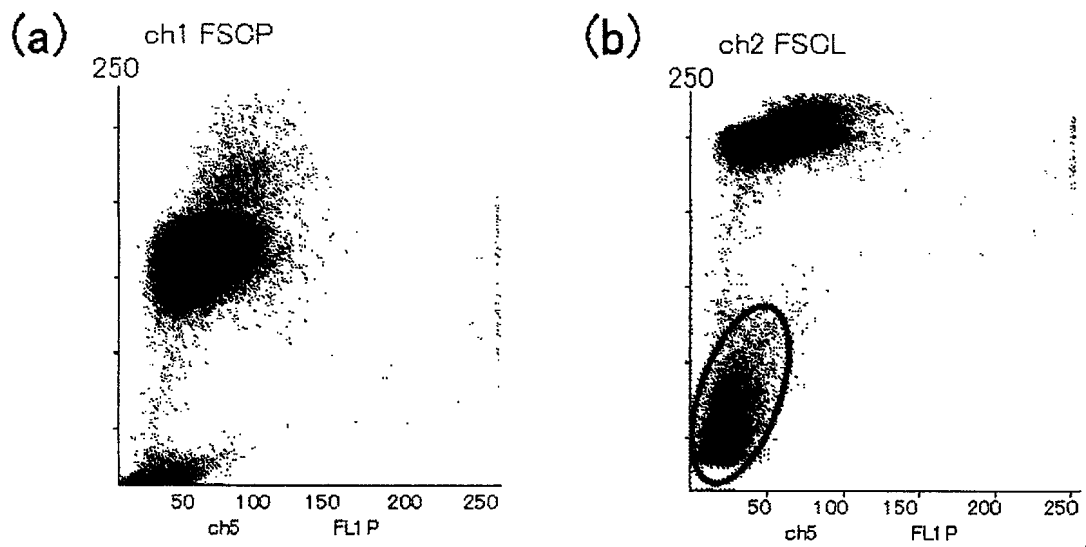
[Fig. 17]



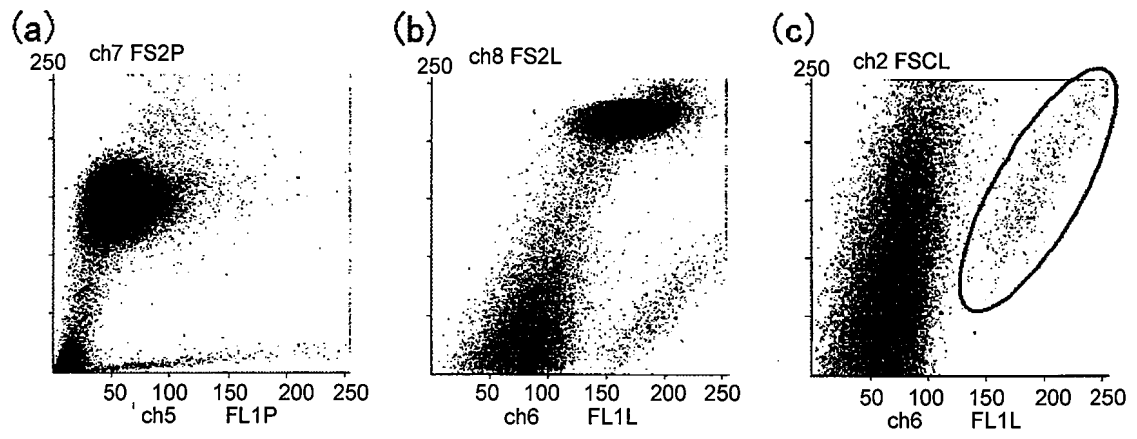
[Fig. 18]



[Fig. 19]



[Fig. 20]



[Fig. 21]

