

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

10-27823

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO **"EQUIPO DE REACTIVOS PARA ANÁLISIS DE MUESTRA Y MÉTODO DE ANÁLISIS DE MUESTRA"**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **G01N 33/49**

71. SOLICITANTE **SYSMEX CORPORATION**

DOMICILIO **HYOGO, JAPÓN**

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. **53.215**

(FORMA P 10)

T.B.
27-01-2010
7 No. Ench

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-027823- -00000-0000

Fecha: 2010-03-09 16:49:22 Dep. 2020 DIR NULVASCH
Tra. 11 PATENTEIYII Eje: 378 FASE NACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 136

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: **SYSMEX CORPORATION**

Dirección: 5-1, Wakinoama-kaigandori
1-chome, Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo
651-0073, Japón.

Nacionalidad o Domicilio: Hyogo, Japón.

Lugar de Constitución: Japón.

Teléfono: 8264270 Fax: 8069701

E-mail: jlloco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá, Colombia

Teléfono: 8264270 Fax: 8069701

E-mail: jlloco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 89.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: Tatsuya NARIKAWA; Tomohiro TSUJI; Keiko MORIYAMA; Yuji
ITOSE; Shinichiro OGUNI; Ayumu YOSHIDA; Saori SUZUKI y Toshihiro
MIZUKAMI.

Dirección: 5-1, Wakinoama-kaigandori 1-chome, Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo
651-0073.

Nacionalidad o Domicilio: Japón.

⑤ PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/JP2008/067507

Fecha: 26/09/08

Publicación Internacional No. WO 2009/041626 A1

Fecha: 02/04/09

⑥ Título (54)

**"EQUIPO DE REACTIVOS PARA ANÁLISIS DE MUESTRA Y MÉTODO DE
ANÁLISIS DE MUESTRA"** (Folio 140)

⑦

Clasificación Internacional (51) G01N 33/49 E 01N 21/78, 601N 33/48

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

JP
JP

27/09/07
24/03/08

2007-252666
2008-076606

⑨

Comprobante de Pago No. 09-95,963 y 10-569

Fecha: 21/12/09 y 05/01/10

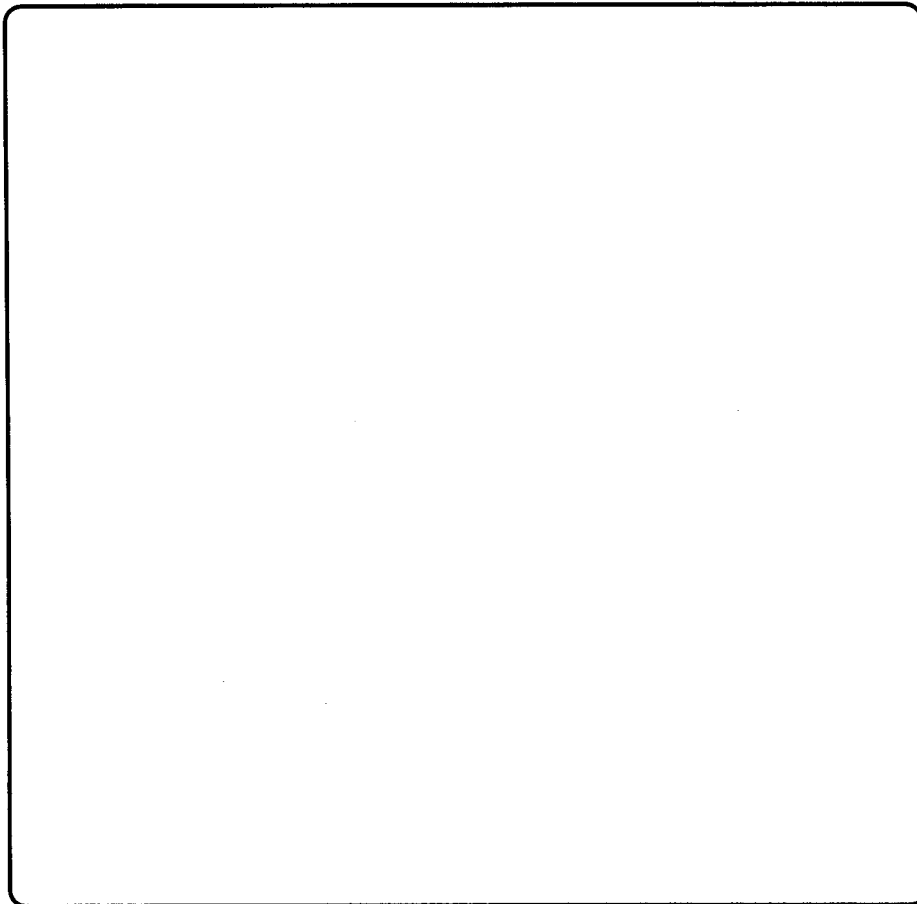
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del Reporte Preliminar Internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del Reporte Preliminar Internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: reporte de búsqueda internacional y publicación.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-027823- -00000-0000

Fecha: 2010-03-09 16:49:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCH
 Tra. 11 PATENTECIYII Lve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 136

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

AIT : 600176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 -- 75.763
 FECHA : DICIEMBRE 21 DE 2009

***** C O A S I D N A C I O N A *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
FLORIDA Y CIA S. A	RECIBO DE CAJA			95846	21/12/2009	2.762,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005 01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITE DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 000176000-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-027823- -00000-0000

Fecha: 2010-03-09 16:49:22 Dep. 2020 DIR.NULVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 136

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 567
FECHA : MARZO 5 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	NO. PAGO	FECHA PAGO	VALOR PAGO
LOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062784387	36907964	05/01/2010	\$ 270.400.00

***** CONSIGNACION *****

CANT.	DETALLE	VALOR	TOTAL CONSIGNADO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	770 VALOR COMPLEMENTO TARIFA A+B ANTR	14.000.00
		TOTAL :	14.000.00

SON: CATORCE MIL TRES

RESPONSABLE 

RECIBO DE CAJA ALIADO AL EXPEDIENTE AL _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.



ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No. 2010-02-26-107
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Japón
Este documento público
2. ha sido firmado por Rikio UDAGAWA
3. actuando como Notario Público de la Oficina de Asuntos Legales de Osaka
4. lleva el sello/estampilla de Rikio UDAGAWA, Notario Público

Certificado

5. en Osaka
6. el 10 de febrero de 2010
7. por el Ministerio de Asuntos Exteriores
8. No. 0733
Sello/estampilla
Ministerio de Asuntos
Exteriores de Japón
10. Firma: (ilegible)
Naomi ASANO
Por el Ministerio de Asuntos Exteriores

NO ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

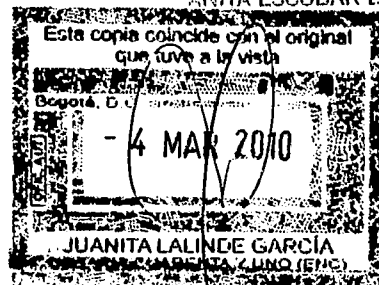
2010 MAR 02
JEFE DE LEGALIA
BOGOTÁ, D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES
EXTERIORES

155632
ANITA ESCOBAR
CUYA FIRMA APOYARÁ EL
DOCUMENTO DESEMPLEA
LAS FUNCIONES INDICADAS

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



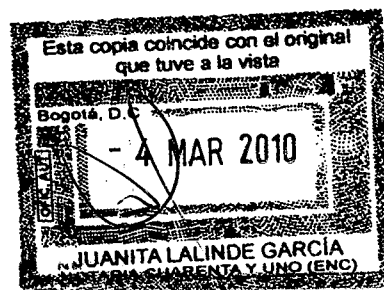
Registro No. 156 / 2010

CERTIFICADO NOTARIAL

Por el presente certifico que el señor Hisayuki ITO, representante del señor Hisashi IETSUGU, Presidente de SYSMEX CORPORATION, quien está autorizado para firmar el documento adjunto en nombre de dicha sociedad constituida y existente de conformidad con las leyes de Japón, domiciliada en 5-1, Wakinohama-kaigandori 1-chome, Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo, Japón, ha afirmado en mi presencia que el señor Hisashi IETSUGU reconoció haber firmado el documento adjunto.

Fechado este día 10 de febrero de 2010

(firma: ilegible)
RIKIO UDAGAWA
Notario



Oficina de Asuntos Legales de Osaka
1-2, Hirano-Machi, 2—Chome,
Chuo-ku, Osaka, Japón

Oficina de Asuntos Legales de Osaka :
"NOTARIO,"
1-2, HIRANO-MACHI, 2-CHOME,
CHUO-KU, OSAKA, JAPON

Registro No.

CERTIFICADO

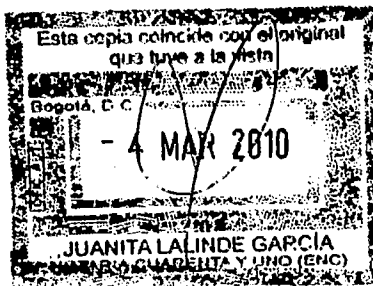
Por el presente certifico que el Certificado Notarial adjunto al presente ha sido ejecutado por Notario, debidamente autorizado y ejerciendo en Osaka, Japón, y que el Sello Oficial que aparece en el mismo es auténtico.

Fecha 10 de febrero de 2010

Director de la Oficina de Asuntos Legales de Osaka

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 26 de febrero de 2010, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



Los abajo firmados,

Hisashi IETSUGU,
Presidente de SYSMEX CORPORATION

con domicilio en

5-1, Wakinohama-Kaigandori 1-Chome
Chuo-Ku, Kobe-Shi, Hyogo
651-0073, Japon.

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

The undersigned,

Hisashi IETSUGU,
President of SYSMEX CORPORATION

domiciled at

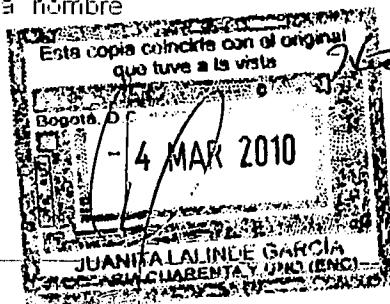
5-1, Wakinohama-Kaigandori 1-chome,
Chuo-Ku, Kobe-shi, Hyogo
651-0073, Japan,

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, (of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this





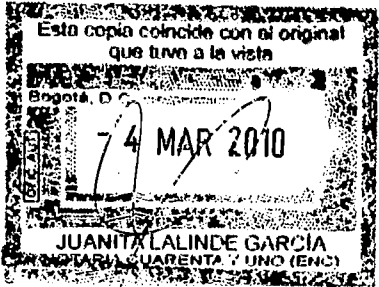
CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Estado de {ss
Condado de
Hoy de de 200 , compareció
a quien conozco y
de quien me consta que firmó el anterior documento,
y quien debidamente juramentado declaró y dijo que
él es
de.
la compañía nombrada en
el documento que antecede, una sociedad
debidamente organizada y existente conforme a las
leyes del Estado
de , domiciliada
en la ciudad de , Condado de
Estado de
legalmente constituida para un período de duración
que aún no ha terminado, que ejerce su objeto
social; conforme a las leyes del Estado de
que el declarante está autorizado por dicha
Compañía para conferir este poder; que el sello
estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en
representación de la expresada Compañía, es el
sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se
confiere este instrumento está comprendido dentro
del de la sociedad.
El suscrito Notario ha visto los Estatutos de
incorporación firmados en
Estado de , con fecha , y
certifica que de conformidad con la legislación de
dicho Estado la anterior declaración juramentada es
prueba suficiente de que los hechos sobre que ella
versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

State of {ss
County of
On this day of , 200 ,
personally
came
to me known, and known to me to be the person who
signed the foregoing instrument, who being by me
duly sworn did depose and say that he is the
of
the company named
within, a Corporation organized and existing under
the laws of the State of ,
domiciled at the City of
County of , State of
legally constituted for a period
of tenure not yet expired, which exercises its
corporate purposes according to the laws of the State
of ; that the
deponent is authorized by said Company to confer
this power of attorney; that the seal affixed hereunto
by the deponent in the name and on behalf of said
Corporation is the corporate seal thereof; and that
the purpose for which this instrument is granted is
included within the corporate purposes of the
Company.
The undersigned Notary Public has seen the articles
of Incorporation of said Corporation executed at
State of , under date of
and hereby
certifies that under the laws of said State the
foregoing acknowledgment is sufficient proof that the
facts therein contained are true, which he attests.

Notary Public (Notario Público).





APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: **JAPAN**

This public document

2. has been signed by

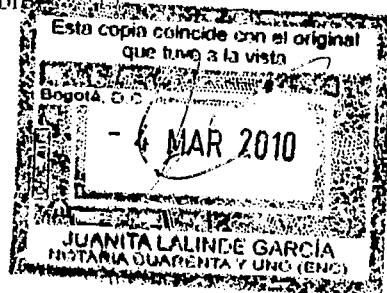
Rikio UDAGAWA

3. acting in the capacity of

Notary Public of the Osaka
Legal Affairs Bureau

4. bears the seal/stamp of

Rikio UDAGAWA, Notary Public



Certified

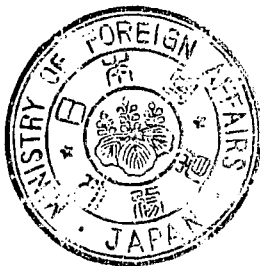
5. at **Osaka**

6. **FEB. 10. 2010**

7. by **the Ministry of Foreign Affairs**

8. No. **0773**

9. Seal/stamp:



10. Signature:

Naomi ASANO

For the Minister for Foreign Affairs

印



登簿平成 22 年 第 156 号

日本国法律に従い設立され、日本国 兵庫県神戸市
中央区脇浜海岸通一丁目 5 番 1 号に所在する
シスメックス株式会社の代表取締役であり、代表取締



役として添付書類に署名する権限を付与されている

家次 恒は、代理人 井東 久幸を通じて、当公証人の

面前でこの証書が自己のものに相違ない旨自認した。

よってこれを認証する。——

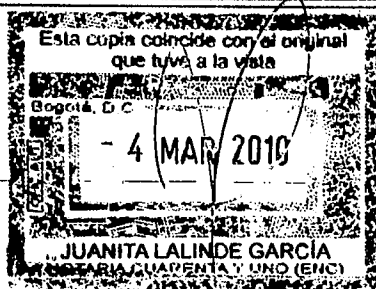
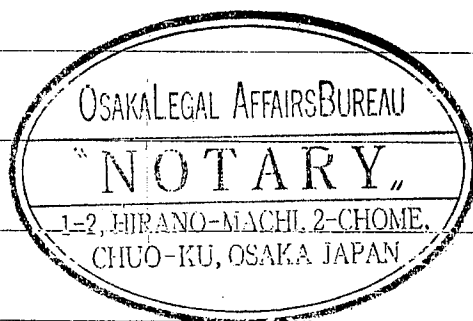
平成 22 年 2 月 10 日当公証人役場において

大阪府中央区平野町 2 丁目 1 番 2 号 (沢の鶴ビル内)

大阪法務局所属

公証人

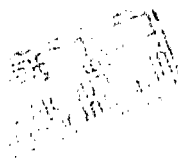
宇田川 力雄



大阪法務局所属 公証人役場



Registered No. 156 -2010



NOTARIAL CERTIFICATE

This is to certify that Mr. Hisayuki ITO an agent of Mr. Hisashi IETSUGU, President of SYSMEY CORPORATION who has been authorized to sign the attached document on behalf of the said company organized and existing according to the law of Japan, located at 5-1, Wakino-hama-kaigandori 1-chome, Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo, Japan has stated in my very presence that Mr. Hisashi IETSUGU acknowledged himself to have signed to the attached document.

Dated this 10th day of February, 2010

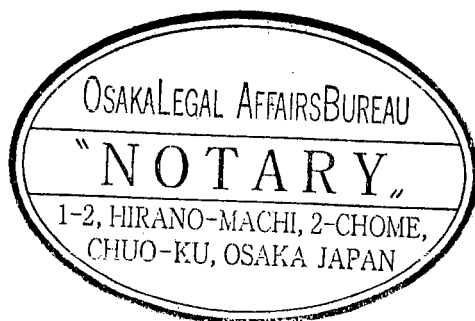
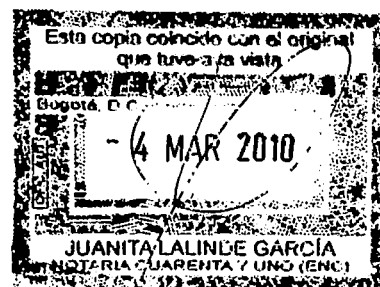
Rikio Udagawa

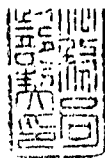


RIKIO UDAGAWA

Notary

Osaka Legal Affairs Bureau
1-2, Hirano-Machi, 2-Chome,
Chuo-ku, Osaka, Japan



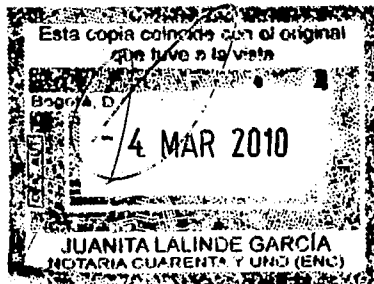


第 617 号



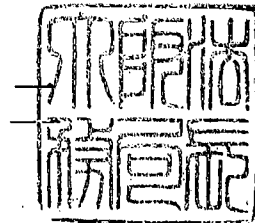
証 明

この認証の付与は、在職中の公証人が
その権限に基づいてしたものであり、
かつ、その押印は、真実のものであること
を証明する。



平成 22 年 2 月 10 日
平成 年 月 日

大阪法務局長 白石 研



Registration No.

CERTIFICATE

This is to certify that the annexed Notarial Certificate has
been executed by Notary, duly authorized and practising in Osaka,
Japan, and that the Official seal appearing on the same is genuine.

Date FEB. 10. 2010

Director of the Osaka Legal Affairs Bureau

(21) N° de solicitud:				(51) Int Cl: G01N 33/49	
(22) Fecha de solicitud: 09-03-10				(71) Solicitante(s): SYSMEX CORPORATION	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País	(72) Inventor(es): Tatsuya NARIFAWA; Tomohiro TSUJI; Keiko MORIYAMA; Yuji ITOSE; Shinichiro OGUNI; Ayumu YOSHIDA; Saori SUZUKI y Toshihiro MIZUKAMI.	
	2007-252666	27-09-07	JP		
	2008-076606	24-03-08	JP		
				(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 27-04-10				(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT				Fecha: 02-04-09	
Fecha de presentación de la solicitud: 26-09-08				N° publicación: WO 2009/041626 A1	
No. de solicitud: PCT/JP2008/067507					
(54) Título: EQUIPO DE REACTIVOS PARA ANÁLISIS DE MUESTRA Y MÉTODO DE ANÁLISIS DE MUESTRA					

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Equipo de reactivos para analizar una muestra para medir basófilos y/o eritrocitos nucleados en la muestra, que comprende: un primer reactivo que contiene un agente tensioactivo catiónico, un agente tensioactivo no iónico y un ácido carboxílico aromático, que puede lisar eritrocitos y puede dañar la membrana celular de los leucocitos de modo que se pueda permear a través de la misma un tinte fluorescente, y un segundo reactivo que contiene el tinte fluorescente capaz de teñir ácido nucleico.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

SUPERINTENDENCIA

PATENTE DE INVENCION ____ **PCT** ☒ **MODELO DE UTILIDAD** ____ **DISEÑO INDUSTRIAL** ____

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 09-03-10

(51) Clasificación Internacional: G01N 33/49

(71) Solicitante(s): **SYSMEX CORPORATION**

(72) Inventor(es): Taisuya NARIKAWA; Tomohiro TSUJI; Keiko MORIYAMA; Yuji ITOSE; Shinichiro OGUNI; Ayumu YOSHIDA; Eiori SUZUKI y Toshihiro MIZUKAMI.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	2007-252666	27-09-07	JP
	2008-076606	24-03-08	JP

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 27-04-10

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha de presentación de la solicitud: 26-09-08

No. de solicitud: **PCT/JP2008/067507**

(87) Publicación internacional

Fecha: **02-04-09**

N° publicación: **WO 2009/041626 A1**

(54) Título: **EQUIPO DE REACTIVOS PARA ANÁLISIS DE MUESTRA Y MÉTODO DE ANÁLISIS DE MUESTRA**



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud: 09-03-10	
(51) Clasificación Internacional: G01N 33/49			
(71) Solicitante(s): SYSMEX CORPORATION			
(72) Inventor(es): Tatsuya NARIFAWA; Tomohiro TSUJI; Keiko MORIYAMA; Yuji ITOSE; Shinichiro OGUNI; Ayumu YOSHIDA; Saori SUZUKI y Toshihiro MIZUKAMI.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	2007-252666	27-09-07	JP
	2008-076606	24-03-08	JP
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 27-04-10		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solici. PCT		Fecha: 02-04-09	
Fecha de presentación de la solicitud: 26-09-08		No. Publicación: WO 2009/041626 A1	
No. de solicitud: PCT/JP2008/067507			

FIGURA CARACTERISTICA
6 x 6 cm

(54) Título:

EQUIPO DE REACTIVOS PARA ANÁLISIS DE MUESTRA Y MÉTODO DE ANÁLISIS DE MUESTRA

(57) Resumen:

Reivindicación número 1.-

Equipo de reactivos para analizar una muestra para medir basófilos y/o eritrocitos nucleados en la muestra, que comprende: un primer reactivo que contiene un agente tensioactivo catiónico, un agente tensioactivo no iónico y un ácido carboxílico aromático, que puede lisar eritrocitos y puede dañar la membrana celular de los leucocitos de modo que se pueda permear a través de la misma un tinte fluorescente, y un segundo reactivo que contiene el tinte fluorescente capaz de teñir ácido nucleico.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/067507

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/49(2006.01) i, G01N21/64(2006.01) i, G01N21/78(2006.01) i, G01N33/49(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/49, G01N21/64, G01N21/78, G01N33/49

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Tokoku Koho	1996-2008
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2008	Tokoku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2008

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-148261 A (Sysmex Corp.), 22 May, 2002 (22.05.02), (Family: none)	1-19
Y	JP 7-294518 A (Toa Medical Electronics Co., Ltd.), 10 November, 1995 (10.11.95), & US 5538893 A & EP 678743 A1 & DE 69521553 T & AU 685232 B & CA 2147237 A & CN 1114422 A	1-19
Y	JP 2006-105625 A (Sysmex Corp.), 20 April, 2006 (20.04.06), & US 2006/73601 A1 & EP 1643247 A1 & CN 1755348 A	2

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 October, 2008 (14.10.08)Date of mailing of the international search report
21 October, 2008 (21.10.08)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/067507

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 6-232059 A (Ibiden Co., Ltd.), 12 August, 1994 (12.08.94), (Family: none)	2-4
Y	US 6027703 A (GARFICK MURRAY LITTLE), 22 February, 2000 (22.02.00), & AU 6020698 A	2-4

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009 年 4 月 2 日 (02.04.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/041626 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/49 (2006.01) G01N 21/78 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/067507
- (22) 国際出願日: 2008 年 9 月 26 日 (26.09.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2007-232666 2007 年 9 月 27 日 (27.09.2007) JP
特願2008-076606 2008 年 3 月 24 日 (24.03.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): シスメックス株式会社 (SYSMEX CORPORATION) [JP/JP]; 〒6510073 兵庫県神戸市中央区臨浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 Hyogo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 成川 隆也

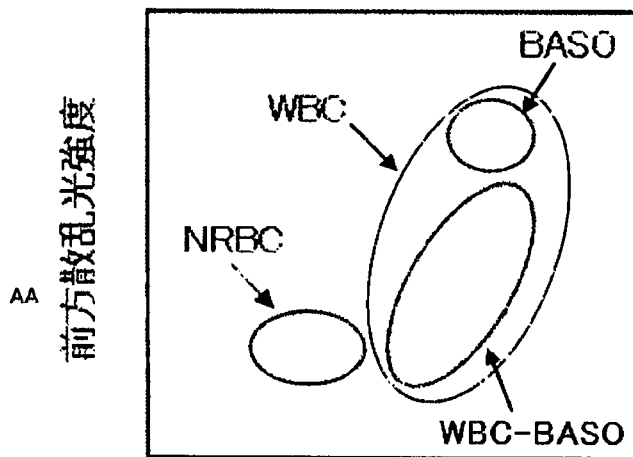
(NARIKAWA, Tatsuya) [JP/JP]; 〒6510073 兵庫県神戸市中央区臨浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス株式会社内 Hyogo (JP). 辻 智悠 (TSUJI, Tomohiro) [JP/JP]; 〒6510073 兵庫県神戸市中央区臨浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス株式会社内 Hyogo (JP). 森山 啓子 (MORIYAMA, Keiko) [JP/JP]; 〒6510073 兵庫県神戸市中央区臨浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス株式会社内 Hyogo (JP). 糸瀬 裕司 (ITOSE, Yoji) [JP/JP]; 〒6510073 兵庫県神戸市中央区臨浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス株式会社内 Hyogo (JP). 小国 操一郎 (OGUNI, Shinichiro) [JP/JP]; 〒6510073 兵庫県神戸市中央区臨浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス株式会社内 Hyogo (JP). 吉田 歩 (YOSHIDA, Ayumu) [JP/JP]; 〒6510073 兵庫県神戸市中央区臨浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス株式会社内 Hyogo (JP). 鈴木 佐緒里 (SUZUKI, Saori) [JP/JP]; 〒6510073 兵庫県神戸市中央区臨浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス株式会社内 Hyogo

(続業有)

(54) Title: REAGENT KIT FOR SAMPLE ANALYSIS AND SAMPLE ANALYSIS METHOD

(54) 発明の名称: 試料分析用試薬キット及び試料分析方法

[図1]



蛍光強度

BB

AA FORWARD SCATTER INTENSITY
BB FLUORESCENCE INTENSITY

(57) Abstract: Disclosed is a reagent kit for sample analysis, which contains a first reagent containing a cationic surfactant, a nonionic surfactant and an aromatic carboxylic acid, and a second reagent containing a fluorescent dye capable of dyeing a nucleic acid. Also disclosed is a sample analysis method using the reagent kit.

(57) 要約: 本発明は、カチオン性界面活性剤、ノニオン性界面活性剤及び芳香族カルボン酸を含有する第1試薬と、核酸を染色可能な蛍光色素を含有する第2試薬とを含有する試料分析用試薬キット、及び該キットを用いる試料分析方法を提供する。

WO 2009/041626 A1



(JP). 水上 利洋 (MIZUKAMI, Toshihiro) [JP/JP]; 〒6510073 兵庫県神戸市中央区臨浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスミックス株式会社内 Hyogo (JP).

HO, HE, OM, PG, PH, PL, PT, PO, PS, PU, SC, SD, SE, SG, SH, SL, SM, ST, SY, SZ, TJ, TM, TH, TP, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VI, ZA, ZM, ZW.

(74) 代理人: 野河 信太郎 (NOGAWA, Shintaro); 〒5300047 大阪府大阪市北区西天満 5 丁目 1-5 南森町パークビル 野河特許事務所 Osaka (JP).

(S4) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (EW, GH, GM, HE, LG, MW, ME, HA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TP), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(S1) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BE, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CI, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,

添付公開書類:
— 国際調査報告書

EQUIPO DE REACTIVOS PARA ANÁLISIS DE MUESTRA Y MÉTODO DE
ANÁLISIS DE MUESTRA

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5

La presente invención proporciona un equipo de reactivos para analizar una muestra que comprende un primer reactivo que contiene un agente tensioactivo catiónico, un agente tensioactivo no iónico y un ácido carboxílico aromático y un segundo reactivo que contiene un tinte fluorescente capaz de teñir ácido nucleico, y un método para analizar una muestra usando el equipo.

15

20

25

19

EQUIPO DE REACTIVOS PARA ANÁLISIS DE MUESTRA Y MÉTODO DE
ANÁLISIS DE MUESTRA

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a un equipo de
5 reactivos y método para análisis de células sanguíneas en
una muestra biológica.

Antecedentes de la Invención

En el campo de las pruebas de laboratorio, es muy
importante el análisis de los componentes sanguíneos en
10 muestras cuando se diagnostican varias enfermedades de
órganos circulatorios o similares de sujetos. Dependiendo
del tipo de enfermedades, puede incrementarse o disminuir el
número de células sanguíneas particulares, o en algunos
casos las células sanguíneas que normalmente no existen en
15 la misma aparecen en la sangre periférica.

Recientemente, se comercializan varios contadores
automáticos de células sanguíneas en los cuales se aplican
los principios de citometría de flujo. Al usar estos
contadores automáticos de células sanguíneas, se pueden
20 clasificar y contar de forma automática las células
sanguíneas en las muestras.

Normalmente, los leucocitos se pueden clasificar
en cinco especies, linfocitos, monocitos, neutrófilos,
eosinófilos y basófilos. Entre estos, es pequeño el número
25 de basófilos contenidos en las muestras sanguíneas. Por lo

tanto, se puede mejorar la exactitud de la clasificación al medir los basófilos en las muestras sanguíneas con el tratamiento exclusivo para medición de basófilos, en comparación a la medición de basófilos con el método en el cual los leucocitos se clasifican en cinco especies y en una medición se miden los basófilos. Los basófilos tienen la característica específica tal que están menos dañados en comparación a otros tipos de leucocitos bajo una condición ácida. Al utilizar estas características, la discriminación de basófilos de otros tipos de leucocitos con el tratamiento exclusivo para basófilos se describe en la Publicación de Patente Japonesa No Examinada Número SHO 61(1986)-88896 (Documento 1 de Patente) y la Publicación de Patente Japonesa No Examinada Número HEI 7(1995)-294518 (Documento 2 de Patente).

Una emergencia de eritrocitos nucleados provoca algunas veces problemas en una medición de leucocitos. Los eritrocitos nucleados tienen núcleos. En una medición de leucocitos, aún cuando los eritrocitos se tratan para ser lisados, permanecen los núcleos de los eritrocitos nucleados para provocar una señal similar a leucocitos, que da error positivo falso en la medición del número de leucocitos. A fin de eliminar este efecto y a fin de obtener el número preciso de leucocitos, mediante el tratamiento exclusivo para eritrocitos nucleados se trata una muestra sanguínea

para medir el número de eritrocitos nucleados, y por un método diferente se mide el número de leucocito en la misma muestra sanguínea, y entonces se sustrae el número de eritrocitos nucleados del número obtenido de leucocito. La

5 Publicación de Patente Japonesa No Examinada Número HEI 10(1998)-339729 (Documento 3 de Patente) describe la discriminación de eritrocitos nucleados de los leucocitos al aplicar el tratamiento exclusivo para eritrocitos nucleados a muestras sanguíneas.

10 Sin embargo, la necesidad de tratamientos exclusivos para células sanguíneas respectivas como se describe en los Documentos 1 a 3 de Patente, anteriores, para la clasificación de basófilos o eritrocitos nucleados requiere una gran cantidad de tiempo y hace complicado o

15 aumenta el tamaño del aparato de medición. Además, el uso de múltiples reactivos exclusivos para células sanguíneas respectivas hace costoso el costo total para la prueba sanguínea. Por consiguiente, se prefiere que los tratamientos exclusivos para células sanguíneas sean los

20 menos posibles.

Al tratar las muestras sanguíneas bajo una condición ácida se pueden medir tanto los basófilos como los eritrocitos nucleados. Por lo tanto, existe la posibilidad que tanto los basófilos como los eritrocitos nucleados se

25 puedan medir en una medición cuando una muestra sanguínea se

trata bajo una condición ácida. La Publicación de Patente Japonesa No Examinada Número 2002-148261 (Documento 4 de Patente) describe que se pueden medir los basófilos y los eritroblastos (eritrocitos nucleados) al mezclar una muestra con una solución acuosa que contiene un agente tensioactivo y un agente lisador de eritrocitos que permite que los leucocitos y las células anormales estén en el estado adecuado para tinción, adicionando un agente de tinción que contiene un tinte fluorescente para teñir las células y medir la intensidad fluorescente y la intensidad de la luz dispersada con un citómetro de flujo.

Descripción de la Invención

Problemas que va a Solucionar la Invención

Sin embargo, al usar el método descrito en el Documento 4 de Patente, los basófilos no se separan bien de los leucocitos diferentes de los basófilos, especialmente en una muestra sanguínea para la cual haya transcurrido un periodo de tiempo después de su recolección, en algunos casos.

De esta manera, el objeto de la presente invención es proporcionar un equipo de reactivos y un método para medir una muestra que permite la discriminación más clara y el conteo de eritrocitos nucleados y de basófilos de otros tipos de leucocitos en la muestra.

Medios para Solucionar los Problemas

La presente invención es un equipo de reactivos para analizar una muestra para medir basófilos y/o eritrocitos nucleados en la muestra, que comprende:

5 un primer reactivo que contiene un agente tensioactivo catiónico, un agente tensioactivo no iónico y un ácido carboxílico aromático, que puede lisar eritrocitos y dañar una membrana celular de leucocitos de modo que un tinte fluorescente pueda permear a través de la misma, y

10 un segundo reactivo que contiene el tinte fluorescente capaz de teñir ácido nucleico.

Adicionalmente, la presente invención es un método para analizar una muestra que comprende los siguientes pasos:

15 lisar eritrocitos en la muestra y dañar una membrana celular de células sanguíneas de modo que un tinte fluorescente pueda permear a través de la misma, en virtud del primer reactivo anterior, y teñir las células dañadas en virtud del segundo reactivo anterior,

20 aplicar luz a las células teñidas para obtener información de la luz dispersada e información fluorescente, y

 clasificar y contar los basófilos y/o eritrocitos nucleados en la muestra en base a la información de luz dispersada y la información fluorescente.

25

Efecto de la Invención

De acuerdo a la presente invención, se pueden discriminar más claramente los eritrocitos nucleados y los basófilos de otras células sanguíneas y se pueden contar aún en la muestra de sangre para la cual haya transcurrido un periodo de tiempo después de su recolección, permitiendo pruebas más precisas y diagnósticos más precisos de enfermedades. Aunque la presente invención hace posible contar eritrocitos nucleados y basófilos en una medición, puede ser en algunos casos suficiente si se miden ya sea los eritrocitos nucleados o los basófilos, dependiendo del propósito de la prueba. En este caso, la presente invención también permite estas mediciones.

Breve Descripción de las Figuras

La Figura 1 representa una forma esquemática de un dispersograma cuando se analiza una muestra usando el reactivo de análisis de muestra de la presente invención.

La Figura 2 representa una forma esquemática de un dispersograma cuando se analiza una muestra usando el reactivo de análisis de muestra de la presente invención.

La Figura 3 representa dispersogramas cuando se analizan muestras usando los reactivos de análisis de muestra en el Ejemplo 1.

La Figura 4 representa dispersogramas cuando se analizan muestras usando los reactivos de análisis de

muestra en el Ejemplo 1.

La Figura 5 representa dispersogramas cuando se analizan muestras usando los reactivos de análisis de muestra en el Ejemplo 2.

5 La Figura 6 representa dispersogramas cuando se analizan muestras usando los reactivos de análisis de muestra en el Ejemplo 2.

La Figura 7 representa dispersogramas cuando se analizan muestras usando los reactivos de análisis de muestra en el Ejemplo 3.

La Figura 8 representa dispersogramas cuando se analizan muestras usando los reactivos de análisis de muestra en el Ejemplo 3.

La Figura 9 representa dispersogramas cuando se analizan muestras usando los reactivos de análisis de muestra en el Ejemplo 3.

La Figura 10 representa dispersogramas cuando se analizan muestras usando los reactivos de análisis de muestra en el Ejemplo 3.

20 La Figura 11 representa dispersogramas cuando se analizan muestras usando los reactivos de análisis de muestra en el Ejemplo 4.

La Figura 12 representa dispersogramas cuando se analizan muestras usando los reactivos de análisis de muestra en el Ejemplo 4.

La Figura 13 representa dispersogramas cuando se analizan muestras usando los reactivos de análisis de muestra en el Ejemplo 4.

5 La Figura 14 representa dispersogramas cuando se analizan muestras usando los reactivos de análisis de muestra en el Ejemplo 4.

La Figura 15 representa dispersogramas cuando se analizan muestras usando los reactivos de análisis de muestra en el Ejemplo 5.

10 La Figura 16 representa dispersogramas cuando se analizan muestras usando los reactivos de análisis de muestra en el Ejemplo 5.

La Figura 17 representa dispersogramas cuando se analizan muestras usando los reactivos de análisis de muestra en el Ejemplo 5.

La Figura 18 representa dispersogramas cuando se analizan muestras usando los reactivos de análisis de muestra en el Ejemplo 6.

20 La Figura 19 representa dispersogramas cuando se analizan muestras usando los reactivos de análisis de muestra en el Ejemplo 6.

La Figura 20 representa dispersogramas cuando se analizan muestras usando los reactivos de análisis de muestra en el Ejemplo 6.

25 La Figura 21 representa dispersogramas cuando se

analizan muestras usando los reactivos de análisis de muestra en el Ejemplo 7.

La Figura 22 representa dispersogramas cuando se analizan muestras usando los reactivos de análisis de muestra en el Ejemplo 7.

La Figura 23 representa dispersogramas cuando se analizan muestras usando los reactivos de análisis de muestra en el Ejemplo 8.

La Figura 24 muestra una vista de un equipo de reactivos de ejemplo de la presente invención. A: el segundo reactivo; y B: el primer reactivo.

La Figura 25 representa dispersogramas cuando se analizan muestras usando los reactivos de análisis de muestra en el Ejemplo 9.

La Figura 26 representa dispersogramas cuando se analizan muestras usando los reactivos de análisis de muestra en el Ejemplo 9.

La Figura 27 representa gráficas que presentan correlaciones entre los resultados de análisis de una muestra usando los reactivos de análisis de muestra del Ejemplo 9 y los resultados de análisis de la muestra usando un método convencional para análisis de muestra. (A) Correlación del número de leucocitos totales; (B) correlación de la relación de basófilos; y (C) correlación de la relación de eritrocitos nucleados.

Mejor Modo para Llevar a Cabo la Invención

Los basófilos son una especie de leucocitos y tienen grandes gránulos ácidos que se tiñen con tintes básicos. Los eritrocitos nucleados también se llaman
5 eritroblastos normalmente e incluyen proeritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromatófilos y eritroblastos ortocromatófilos.

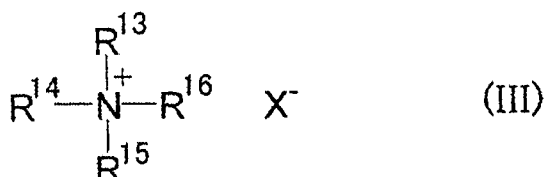
Como se usa en la presente, una "muestra" se refiere a una muestra de fluido corporal tomada de
10 mamíferos, preferentemente humanos, que incluye sangre, fluido de médula ósea, urea, una muestra tomada en aféresis y similares.

Los presentes inventores, como resultado de estudio extensivo, han encontrado que se puedan discriminar
15 más claramente los eritrocitos nucleados y los basófilos de otros tipos de leucocitos al usar el primer reactivo que contiene un agente tensioactivo aromático, un agente tensioactivo no iónico y un ácido carboxílico aromático y el segundo reactivo que contiene un tinte fluorescente capaz de
20 teñir ácido nucleico.

De acuerdo a una modalidad de la presente invención, el equipo de reactivos para análisis de muestra es el equipo de reactivos que comprende el primer reactivo que contiene un agente tensioactivo catiónico, un agente
25 tensioactivo no iónico y un ácido carboxílico aromático y el

segundo reactivo que contiene un tinte fluorescente capaz de teñir ácido nucleico. Al tratar la muestra con el primer reactivo que contiene el agente tensioactivo catiónico, el agente tensioactivo no iónico y el ácido carboxílico aromático, se pueden lisar los eritrocitos en la muestra y se pueden dañar las membranas células de los leucocitos y de los eritrocitos nucleados a un grado tal que el tinte fluorescente puede permear las membranas. Debido a esto, en las membranas celulares se dañan los leucocitos diferentes de los basófilos y de los eritrocitos nucleados y se encogen o generan núcleos desnudos, en tanto que los basófilos se dañan menos en las membranas celulares que los leucocitos diferentes de los basófilos y eritrocitos nucleados. Por lo tanto, se considera que los basófilos se encogen menos en comparación a los leucocitos diferentes de los basófilos y eritrocitos nucleados. Por consiguiente, los basófilos se pueden discriminar de los leucocitos diferentes de los basófilos y de los eritrocitos nucleados en base a las diferencias en la forma o tamaño celular. Adicionalmente, al tratar la muestra con el segundo reactivo que contiene el tinte fluorescente capaz de teñir ácido nucleico, los eritrocitos nucleados se pueden discriminar de los leucocitos diferentes de los basófilos y los basófilos en base a la diferencia en la tinción apropiada con el tinte fluorescente.

El agente tensioactivo catiónico puede lisar los eritrocitos y dañar las membranas celulares de los leucocitos y de los eritrocitos nucleados. El agente tensioactivo catiónico es preferentemente un tipo de una sal de amonio cuaternario o sal de piridinio. El agente tensioactivo catiónico del tipo de sal de amonio cuaternario es preferentemente una sal de amonio cuaternario que tiene la siguiente fórmula general (III):



En la fórmula (III) anterior, R^{13} , R^{14} y R^{15} pueden ser los mismos o diferentes, y son un átomo de hidrógeno, un grupo C_{1-8} alquilo o un grupo C_{6-8} aralquilo. R^{16} es un grupo C_{8-18} alquilo, un grupo C_{8-18} alquenilo o un grupo C_{6-18} aralquilo. X^{-} es un anión.

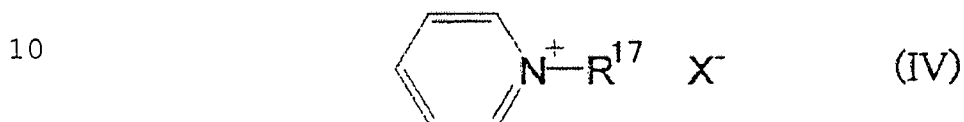
El grupo C_{1-8} alquilo para R^{13} , R^{14} y R^{15} incluye metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo y similares. El grupo C_{6-8} aralquilo para R^{13} , R^{14} y R^{15} incluye bencilo, fenetilo y similares. De manera preferente, R^{13} , R^{14} y R^{15} son un grupo C_{1-8} alquilo tal como metilo, etilo y similares.

El grupo C_{8-18} alquilo para R^{16} incluye octilo, decilo, dodecilo, tetradecilo y similares. El grupo C_{8-18} alquenilo para R^{16} incluye octenilo, decenilo, oleilo y

similares. El grupo C₆₋₁₈alquilo para R¹⁶ incluye bencilo, fenetilo y similares. De manera preferente, R¹⁶ es un grupo alquilo de cadena recta de 10 a 18 átomos de carbono tal como decilo, dodecilo, tetradecilo y similares.

5 El anión X⁻ incluye iones de halógeno tal como F⁻, Cl⁻, Br e I⁻, CF₃SO₃⁻, BF₄⁻, ClO₄⁻ y similares.

El agente tensioactivo catiónico del tipo de sal de piridinio es preferentemente la sal de piridinio que tiene la siguiente fórmula (IV):



En la fórmula (IV) anterior, R¹⁷ es un grupo C₈₋₁₈alquilo. X⁻ es un anión.

15 El grupo C₈₋₁₈alquilo incluye un grupo C₁₀₋₁₈alquilo de cadena recta tal como decilo, dodecilo, tetradecilo y similares. El anión X⁻ incluye iones de halógeno tal como F⁻, Cl⁻, Br e I⁻, CF₃SO₃⁻, BF₄⁻, ClO₄⁻ y similares.

20 Los ejemplos específicos del agente tensioactivo catiónico incluyen bromuro de deciltrimetilamonio, cloruro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de octiltrimetilamonio, cloruro de octiltrimetilamonio, bromuro de lauriltrimetilamonio, cloruro de lauriltrimetilamonio, bromuro de miristiltrimetilamonio, cloruro de miristiltrimetilamonio, cloruro de laurilpiridinio y
25 similares.

El agente tensioactivo catiónico se usa en la concentración que es suficiente para lisar los eritrocitos y para dañar las membranas celulares de los leucocitos y de los eritrocitos nucleados. Esta concentración preferible se puede determinar fácilmente, por ejemplo, al observar el estado de las membranas celulares o similares bajo un microscopio óptico convencional. De manera específica, la concentración del agente tensioactivo catiónico es preferentemente de 300 a 9000 mg/L, de manera más preferente de 400 a 8000 mg/L, y de manera más preferente de 500 a 7000 mg/L. Sin embargo, la concentración se puede ajustar de manera apropiada de acuerdo al tipo del agente tensioactivo catiónico usado.

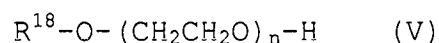
Cuando es demasiado baja la concentración del agente tensioactivo catiónico, puede no ser posible, en algunos casos, la discriminación exacta entre los basófilos y los leucocitos diferentes de los basófilos. La razón de esto se considera que es que los leucocitos no se dañan de manera suficiente cuando es demasiado baja la concentración del agente tensioactivo catiónico, de modo que es pequeña la diferencia en el tamaño o forma entre los basófilos y leucocitos diferentes de los basófilos. Por otra parte, cuando es demasiado alta la concentración del agente tensioactivo catiónico, puede no ser posible en algunos casos la discriminación exacta entre los eritrocitos

nucleados y los leucocitos diferentes de los basófilos. La razón de esto se considera que es que las membranas celulares particularmente de los eritrocitos nucleados y de los leucocitos diferentes de los basófilos no se dañan de manera excesiva cuando es demasiado alta la concentración del agente tensioactivo catiónico, de modo que no es posible la discriminación exacta entre los eritrocitos nucleados y los leucocitos diferentes de los basófilos. Por consiguiente, cuando la concentración está dentro del intervalo anterior, los eritrocitos se pueden lisar de manera eficiente sin dañar de manera excesiva las membranas celulares de los leucocitos y de los eritrocitos nucleados. El poder de la hemólisis del agente tensioactivo catiónico depende de la longitud de la cadena principal. Los agentes tensioactivos catiónicos que tienen una cadena principal larga tienen mayor poder de hemólisis, proporcionando de esta manera efecto suficiente con una cantidad más pequeña en comparación a los que tienen una cadena corta.

En la muestra sanguínea para la cual ha transcurrido un intervalo de tiempo después de su recolección, las células sanguíneas tal como los leucocitos son susceptibles a daño debido a su cambio morfológico. Cuando el agente tensioactivo catiónico se usa para esta muestra, se dañan de manera excesiva las membranas celulares de, particularmente, los eritrocitos nucleados y los

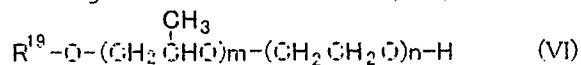
leucocitos diferentes de los basófilos, de modo que en algunos casos no es posible la discriminación exacta entre los eritrocitos nucleados y los leucocitos diferentes de los basófilos. En estos casos, el uso del agente tensioactivo no iónico conjuntamente con el agente tensioactivo catiónico permite la discriminación más exacta entre los eritrocitos nucleados y los leucocitos diferentes de los basófilos al suprimir el daño excesivo en los leucocitos y similares. El agente tensioactivo no iónico es preferentemente un polioxietilen-alquil-éter, un polioxietilen-polioxipropilen-alquil-éter, un aceite de ricino polioxietilenado, un aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado, un estero10 l polioxietilenado o un estero1 hidrogenado polioxietilenado.

El agente tensioactivo no iónico tipo polioxietilen-alquil-éter es preferentemente uno que tiene la siguiente fórmula (V):



En la formula anterior, R^{18} es un grupo C_{12-22} alquilo o un grupo C_{12-22} alquenilo. n es de 10 a 30.

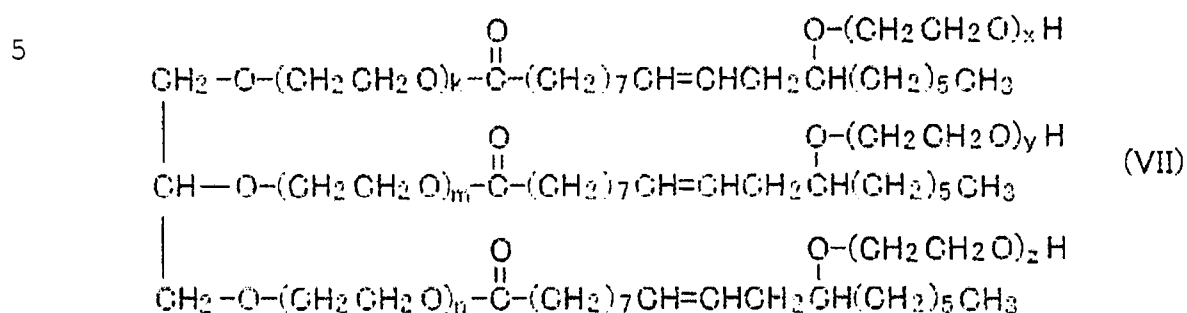
El agente tensioactivo no iónico tipo polioxietilen-polioxipropilen-alquil-éter es preferentemente uno que tiene la siguiente fórmula (VI):



En la fórmula anterior, R^{19} es un grupo C_{10-30} alquilo o un grupo C -alquenilo. m es de 1 a 10. n es de

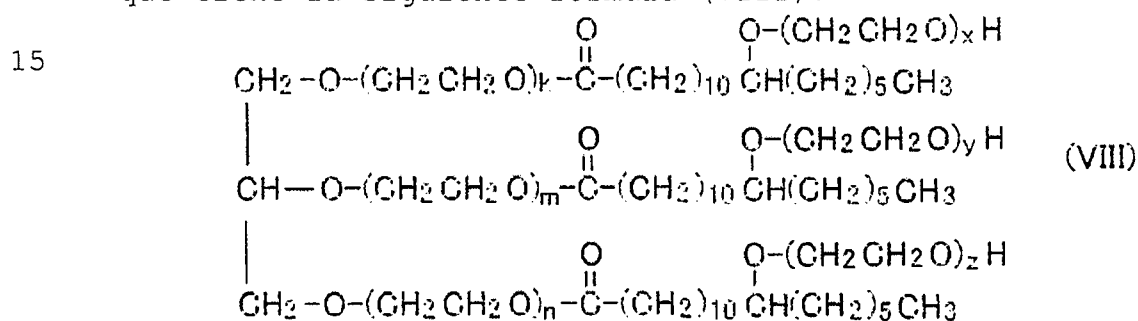
10 a 30.

El agente tensioactivo no iónico tipo aceite de ricino polioxiestileno es preferentemente uno que tiene la siguiente fórmula (VII):



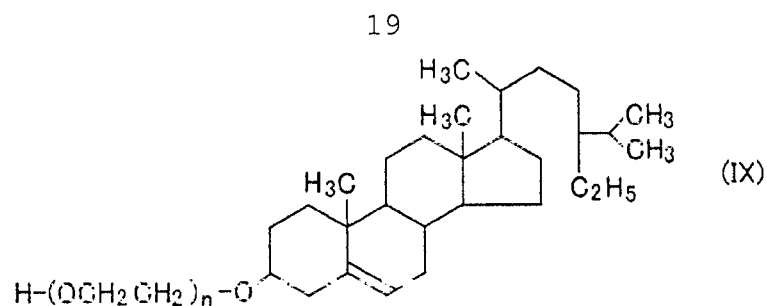
En la fórmula anterior, la suma de k, n, m, x, y, y z es de 10 a 60.

El agente tensioactivo no iónico tipo aceite de ricino hidrogenado polioxiestileno es preferentemente uno que tiene la siguiente fórmula (VIII):



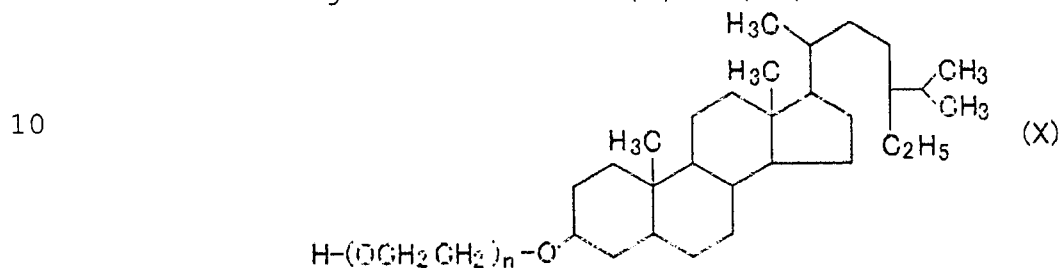
En la fórmula anterior, la suma de k, n, m, x, y, y z es de 10 a 60.

El agente tensioactivo no iónico tipo esteroide polioxiestileno es preferentemente uno que tiene la siguiente fórmula (IX):

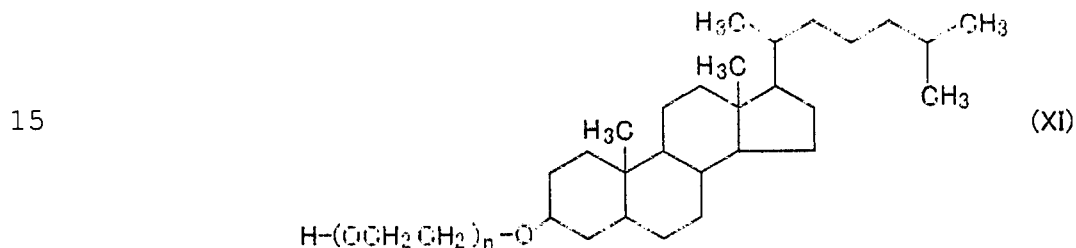


5 En la fórmula anterior, n es de 10 a 30.

El agente tensioactivo no iónico tipo esterol hidrogenado polioxiestilenado es preferentemente uno que tiene la siguiente fórmula (X) o (XI):



en donde n es de 20 a 30;



en donde n es de 20 a 30.

20 El grupo C₁₂₋₂₂alquilo incluye dodecilo, hexadecilo y grupos similares. El grupo C₁₂₋₂₂alquenilo incluye oleilo y grupos similares. Cuando n en las fórmulas anteriores (V), (VI) y (IX) a (XI) es demasiado bajo, se dañan de manera excesiva las membranas de las células sanguíneas; y cuando n es demasiado alto, no se dañan de manera suficiente las

25 membranas de las células sanguíneas. De manera similar,

cuando la suma de k, n, m, x, y, y z en las fórmulas (VII) y (VIII) anteriores es demasiado bajo, se dañan de manera excesiva las membranas de las células sanguíneas; y cuando es demasiado alto, las membranas de las células sanguíneas no se dañan de manera suficiente.

El agente tensioactivo no iónico incluye de manera específica polioxietileno(16)-oleil-éter, polioxietileno(20)-cetil-éter, polioxietileno(20)-polioxipropileno(8)-cetil-éter, polioxietileno(30)-polioxipropileno(6)-deciltetradecil-éter, aceite de ricino polioxietilenado(20), aceite de ricino hidrogenado polioxietileno(20), aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado(50), fitoestanol polioxietilenado(25) y similares. Entre estos, son particularmente preferidos polioxietileno(16)-oleil-éter y polioxietileno(20)-polioxipropileno(8)-cetil-éter.

La concentración del agente tensioactivo no iónico es preferentemente de 500 a 7000 mg/L, de manera más preferente de 800 a 6000 mg/L, y de manera más preferente de 1000 a 5000 mg/L. Sin embargo, la concentración se puede ajustar de manera apropiada de acuerdo al tipo usado del agente tensioactivo no iónico.

Cuando es demasiado baja la concentración del agente tensioactivo no iónico, en algunos casos puede no ser posible la discriminación exacta entre, particularmente, los

eritrocitos nucleados y los leucocitos diferentes de los basófilos, debido a que no se puede suprimir el daño excesivo a las membranas celulares de los leucocitos y de los eritrocitos nucleados por el agente tensioactivo catiónico. Por otra parte, cuando es demasiado alta la concentración del agente tensioactivo no iónico, en algunos casos puede no ser posible la discriminación exacta entre, particularmente, los basófilos y los leucocitos diferentes de los basófilos, debido a que se suprime el daño por el agente tensioactivo catiónico a las membranas celulares de los leucocitos y de los eritrocitos nucleados. Por consiguiente, cuando la concentración está dentro del intervalo anterior, se pueden discriminar de forma exacta los eritrocitos nucleados y los leucocitos diferentes de los basófilos aún cuando ha transcurrido un periodo de tiempo para la sangre después de su recolección.

El primer reactivo comprende de manera preferente al menos un ácido carboxílico que tiene al menos un anillo aromático en la molécula (referido más adelante en la presente como "ácido carboxílico aromático") o una sal del mismo. Al usar el ácido carboxílico aromático, se pueden lisar de manera efectiva los eritrocitos en un tiempo breve.

Cuando el primer reactivo sin el ácido carboxílico aromático se usa en mediciones, se detectan basófilos en una cantidad falsamente alta dependiendo de las muestras

sanguíneas, en algunos casos. No se conoce la razón de este valor falsamente alto, sin embargo, se puede tener como hipótesis que las células sanguíneas diferentes de los basófilos u otros componentes en las muestras sanguíneas presentan tamaño, forma o intensidad fluorescente similar como los basófilos. Al probar las muestras sanguíneas con el primer reactivo que contiene el ácido carboxílico aromático, se puede impedir este fenómeno de un alto valor falso.

10 El ácido carboxílico aromático usado se selecciona de manera indistinta de ácidos orgánicos que tienen al menos un anillo aromático en la molécula o sales de los mismos. El ácido carboxílico aromático preferido incluye ácido salicílico, ácido ftálico, ácido benzoico, ácido
15 hidroxibenzoico, ácido aminobenzoico y sales de los mismos.

La concentración del ácido carboxílico aromático o una sal del mismo en el primer reactivo no se limitan de manera específica en tanto que el pH del primer reactivo esté dentro del intervalo descrito más adelante, y de manera
20 preferente es de 0.1 a 100 mM y de manera más preferente de 0.5 a 50 mM.

Cuando es demasiado baja la concentración del ácido carboxílico aromático, no puede ser posible la discriminación exacta de los basófilos debido a que no se
25 ejerce de manera suficiente el efecto anterior. Por otra

parte, cuando es demasiado alta la concentración del ácido carboxílico aromático, en algunos casos puede no ser posible la discriminación exacta entre los eritrocitos nucleados y los leucocitos diferentes de los basófilos. Por consiguiente, cuando la concentración está dentro del intervalo anterior, se discriminan de forma exacta los eritrocitos nucleados y los basófilos de otras células sanguíneas.

Cuando se trata la muestra con el primer reactivo, los eritrocitos se lisan de manera preferente, que perturban la medición de eritrocitos nucleados y basófilos. En general, los eritrocitos se perforan en la membrana celular de los mismos a una presión osmótica de aproximadamente 150 mOsm/kg o menor y llegan a ser ópticamente transparentes después de la fuga de hemoglobina del interior de los eritrocitos (hemólisis). Los eritrocitos ópticamente transparentes no perturban sustancialmente la medición usando citometría de flujo. Para la lisis de los eritrocitos se prefieren condiciones con baja presión osmótica y bajo pH. La presión osmótica que satisface estos dos requerimientos es de 20 mOsm/kg a 150 mOsm/kg. Al ajustar la presión osmótica del primer reactivo en este intervalo, se pueden lisar de manera eficiente los eritrocitos, que perturban la medición de los eritrocitos nucleados y de los basófilos.

Los basófilos tienen una característica tal que son difíciles de ser destruidos en comparación a otros leucocitos bajo una condición ácida. Por consiguiente, el pH del primer reactivo es preferentemente de 2.0 a 4.5, de manera más preferente de 2.0 a 3.5. Dentro de este intervalo de pH, son estables los gránulos de los basófilos. Además, dentro de este intervalo de pH, los eritrocitos se pueden lisar de manera eficiente sin afectar de manera excesiva a los leucocitos, a los eritrocitos nucleados y similares. Debido a esto, puede ser baja la luz dispersada y la fluorescencia de los eritrocitos sin núcleo, de modo que los eritrocitos no afectan de manera sustancial la medición de los eritrocitos nucleados ni de los leucocitos.

El pH del primer reactivo se puede ajustar con un agente amortiguador. El agente amortiguador preferido es el que tiene una pKa dentro de ± 2.0 del pH deseado, e incluye, por ejemplo, ácido málico, ácido tartárico, ácido malónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido diglicólico y similares. La concentración del agente amortiguador en el primer reactivo no se limita de manera específica en tanto que se pueda mantener el intervalo anterior de pH.

Adicionalmente, es adecuado combinar el ácido carboxílico aromático y el agente amortiguador debido a que se puede mejorar el desempeño para la discriminación de los eritrocitos nucleados. La combinación del agente

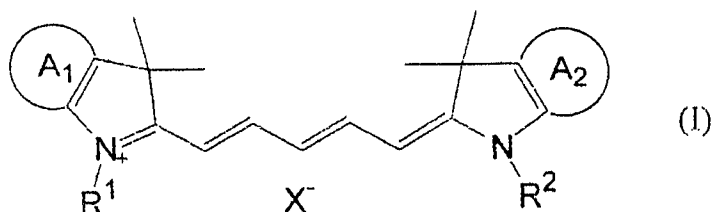
amortiguador y ácido carboxílico aromático incluye, por ejemplo, ácido málico y ácido salicílico o una sal de los mismos, ácido málico y ácido ftálico o una sal de los mismos, ácido cítrico y ácido salicílico o una sal de los mismos, ácido cítrico y ácido ftálico o una sal de los mismos, ácido málico y ácido benzoico o una sal de los mismos, ácido málico y ácido ftálico o una sal de los mismos y un ácido benzoico o una sal del mismo.

A fin de ajustar la presión osmótica del primer reactivo en un intervalo adecuado para la lisis de eritrocitos, se puede usar un electrolito tal como NaCl, KCl, o un sacárido. La presión osmótica también se puede ajustar por medio de la concentración del agente amortiguador.

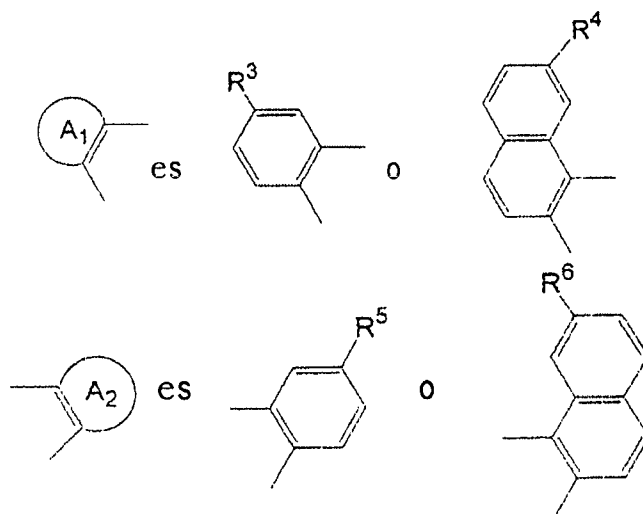
El primer reactivo se puede obtener al disolver los agentes tensioactivos y el ácido carboxílico aromático o una sal del mismo así como el agente amortiguador opcional en un solvente apropiado de modo que se puedan obtener las concentraciones anteriores, y opcionalmente ajustar el pH con NaOH, HCl o similar. El solvente apropiado no se limita de manera específica en tanto que pueda disolver los componentes anteriores, e incluye, por ejemplo, agua, solventes orgánicos, mezclas de los mismos y similares. Los solventes orgánicos incluyen alcoholes, etilenglicol y dimetilsulfóxido (referido más adelante como "DMSO").

El segundo reactivo comprende el tinte fluorescente capaz de teñir ácido nucleico. Cuando las células sanguíneas tratadas con el primer reactivo se tiñen con el tinte fluorescente capaz de teñir ácido nucleico, los leucocitos se tiñen de manera intensa y emiten fluorescencia intensa. Por otra parte, los eritrocitos nucleados se tiñen débilmente y emiten fluorescencia débil. Debido a la diferencia en la susceptibilidad a ser teñido con el tinte fluorescente, se pueden discriminar los eritrocitos nucleados de los basófilos o leucocitos diferentes de los basófilos. No está claro el mecanismo para la producción de la diferencia en la intensidad fluorescente entre leucocitos y eritrocitos nucleados, sin embargo, puede ser debido a que la incorporación del tinte en el núcleo celular se inhibe debido a la condensación del núcleo (ADN) de los eritrocitos nucleados.

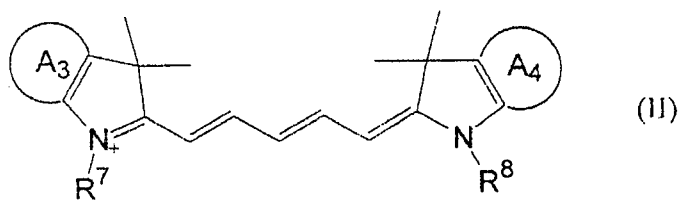
El tinte fluorescente no se limita de manera específica en tanto que pueda teñir ácido nucleico, e incluye uno que se usa en general en la técnica. El tinte fluorescente contenido en el segundo reactivo incluye los tintes fluorescentes en las siguientes fórmulas (I) y (II):



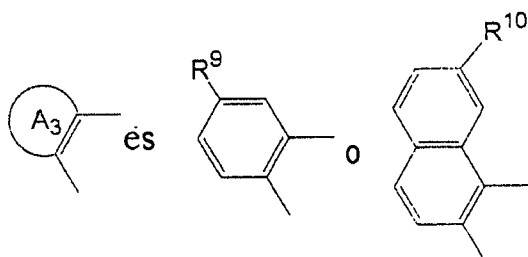
en donde R^1 y R^2 son, los mismos o diferentes entre sí, un grupo alquilo;

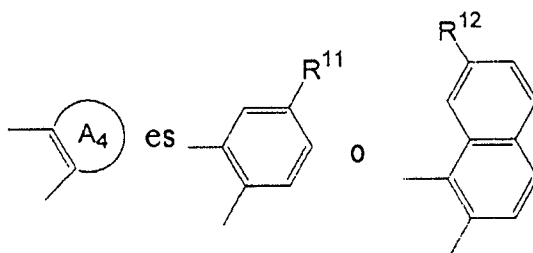


R^3 , R^4 , R^5 y R^6 son, los mismos o diferentes entre sí, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo; y X^- es un anión;



en donde R^7 y R^8 son, los mismos o diferentes entre sí, un grupo alquilo que contiene opcionalmente un grupo ácido;





5 y R^9 , R^{10} , R^{11} y R^{12} son, los mismos o diferentes entre sí, un átomo de hidrógeno o un grupo ácido, con la condición que uno de R^7 a R^{12} sea/tenga un grupo ácido; y el grupo ácido que puede presentarse en R^7 a R^{12} puede formar una sal, con la condición que cualquiera de los grupos ácidos que pueda
 10 presentarse en R^7 a R^{12} es un grupo del cual se ha liberado un protón.

En la presente especificación, el grupo alquilo en las fórmulas (I) y (II) anteriores puede ser ya sea de una cadena recta o una cadena ramificada. El número de átomos de
 15 carbono del grupo alquilo es en general de 1 a 20 y de manera preferente de 1 a 10. Es más preferible de 1 a 6 en vista de la solubilidad en agua del tinte fluorescente. Los ejemplos preferidos del grupo alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo y similares.

20 X^- en la fórmula (I) incluye iones de halógeno tal como F^- , Cl^- , Br^- y I^- , $CF_3SO_3^-$, BF_4^- , ClO_4^- y similares.

Como se usa en la presente, el grupo ácido que puede estar presente en la fórmula (II) incluye tanto un grupo capaz de libera un protón como un grupo capaz de
 25 liberar un protón del cual se ha liberado el protón. El

grupo capaz de liberar un protón incluye un grupo carboxilo, sulfónico, fosfórico o similar y es preferentemente un grupo sulfónico.

El grupo ácido puede formar una sal. La sal incluye una sal de metal alcalino tal como sal de sodio, potasio o similar. De manera preferente es una sal de sodio

El tinte fluorescente de las fórmulas (I) y (II) usado, puede ser una o más especies. El tinte fluorescente se puede obtener de Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc.

La concentración del tinte en el reactivo de análisis de muestra de la presente invención se puede seleccionar de manera apropiada de acuerdo al tipo del tinte, y en general es de 0.01 a 100 mg/L, de manera preferente de 0.1 a 10 mg/L y de manera más preferente de 0.2 a 6.0 mg/L.

El tinte fluorescente de las fórmulas (I) y (II) comprendido en el segundo reactivo tiñe los leucocitos de manera intensa debido a que tiene mayor afinidad hacia los leucocitos que hacia los eritrocitos nucleados. Por consiguiente, en base a la diferencia en la fluorescencia emitida de células teñidas con el tinte fluorescente, los eritrocitos nucleados se pueden discriminar de manera más precisa de los leucocitos diferentes de los basófilos y los basófilos.

El segundo reactivo se puede obtener al disolver el tinte fluorescente en un solvente apropiado de modo que se puede obtener la concentración anterior. El solvente apropiado no se limita de manera específica en tanto que pueda disolver el tinte fluorescente, e incluye agua, solventes orgánicos, y mezclas de los mismos y similares. Los solventes orgánicos incluyen alcoholes, etilenglicol, DMSO y similares. Algunos sitios fluorescentes tienen baja estabilidad a largo plazo en soluciones acuosas, y en estos casos, se disuelven de manera preferente en los solventes orgánicos.

El equipo de reactivos para análisis de muestra se mezcla preferentemente con la muestra en una cantidad tal que se obtiene la relación en volumen de primer reactivo: segundo reactivo: muestra de 10 a 500 : 1 a 10 : 1, de manera más preferente 20 a 100 : 2 a 5 : 1. Al emplear esta relación para mezclar el primer reactivo, segundo reactivo, la muestra para obtener una muestra de medición, los eritrocitos se lisan suavemente y se tiñen de manera satisfactoria los componentes de las células sanguíneas. La cantidad de muestra de unos pocos mililitros a 100 µl permite mediciones suaves.

El método para análisis de muestra de acuerdo a una modalidad de la presente invención comprenden los pasos de:

lisan eritrocitos en la muestra y dañar una membrana celular de las células sanguíneas de modo que el tinte fluorescente pueda permear a través de las mismas, en virtud del primer reactivo anterior, y teñir las células sanguíneas dañadas en virtud del segundo reactivo anterior,

5 aplicar luz a las células sanguíneas teñidas para obtener información de la luz dispersada e información fluorescente, y

10 clasificar y contar los basófilos y/o eritrocitos nucleados en la muestra en base a la información de la luz dispersada y de la información fluorescente.

En el paso de tinción, se mezclan el primer reactivo, el segundo reactivo y la muestra. En este paso, el agente tensioactivo catiónico, el agente tensioactivo no iónico y el ácido carboxílico aromático en el primer reactivo lisan los eritrocitos en la muestra y dañan las membranas celulares de las células sanguíneas de modo que un tinte fluorescente puede permear a través de las mismas. Por consiguiente, al mezclar el primer reactivo, el segundo reactivo y la muestra, las células sanguíneas objetivo se pueden teñir de manera efectiva con el tinte fluorescente.

20 En el paso de tinción, se puede emplear cualquier orden para el mezclado del primer reactivo, el segundo reactivo y la muestra. El primer reactivo y el segundo reactivo se pueden mezclar, y entonces esta mezcla se puede

mezclar con la muestra. De manera alternativa, el primer reactivo y la muestra se pueden mezclar, y entonces esta mezcla se puede mezclar con el segundo reactivo. Se pueden obtener resultados similares de medición con cualquier
5 orden.

En el paso de tinción, la mezcla del primer reactivo, el segundo reactivo y la muestra se hace reaccionar de manera preferente a 15 a 50°C, preferentemente de 30 a 45°C durante 5 a 120 segundos, de manera preferente
10 de 5 a 30 segundos.

Las células sanguíneas teñidas en el paso de tinción se pueden analizar con un citómetro de flujo. Ahora se explica el análisis de las células sanguíneas usando un citómetro de flujo. Las células sanguíneas teñidas se aplican con luz cuando se hacen pasar a través de una celda
15 de flujo del citómetro de flujo, permitiendo de este modo que se obtenga información de la luz dispersada e información fluorescente. La información de la luz dispersada no se limita de manera específica en tanto que la luz dispersada sea medible por un citómetro convencional,
20 comercial de flujo, e incluye el ancho del impulso, la intensidad y similares de la luz dispersada tal como luz dispersada directa (es decir, ángulo de recepción de luz de aproximadamente 0 a 20 grados), luz dispersada lateral (por
25 ejemplo, ángulo de recepción de luz de aproximadamente 90

grados). En general, la luz dispersada lateral refleja información interna tal como núcleos y gránulos de las células, y la luz dispersada directa refleja información de tamaño de las células. En el método de la presente
5 modalidad, se prefiere que la información de luz dispersada incluya la intensidad de la luz dispersada directa e intensidad de la luz dispersada lateral.

La información fluorescente se obtiene al aplicar luz que tiene una longitud de onda apropiada a la muestra de
10 medición y al medir la fluorescencia excitada. De acuerdo al tinte fluorescente usado, se puede seleccionar la longitud de onda de recepción apropiada. La fluorescencia se emite del ácido nucleico y los gránulos en las células que se tiñen con el tinte fluorescente.

15 La fuente de luz del citómetro de flujo usado no se limita de manera específica y se selecciona entre las fuentes de luz que tienen una longitud de onda adecuada para excitación del tinte fluorescente. Por ejemplo, se puede usar láser rojo de semiconductor, láser azul de
20 semiconductor, láser de argón, láser de He-Ne. De manera particular, los láseres del semiconductor son baratos en comparación a los láseres de gas y por lo tanto son preferibles.

En base a la luz dispersada y a la fluorescencia,
25 medidas de esta manera, se pueden discriminar los

eritrocitos nucleados y los basófilos y otros componentes y se pueden contar. Este paso comprende de manera preferente, por ejemplo (1) obtener un dispersograma que tiene dos ejes de la información fluorescente y la información de luz dispersada directa, (2) obtener un dispersograma que tiene dos ejes de la información de luz dispersada directa y la información de luz dispersada lateral, y (3) analizar los dispersogramas obtenidos, respectivos con un software analítico apropiado.

En el dispersograma que tiene el eje x para la intensidad fluorescente y el eje y para la luz dispersada directa, como se muestra en la Figura 1 por ejemplo, los eritrocitos nucleados, los basófilos y los leucocitos diferentes de los basófilos se distribuyen para formar agrupaciones, respectivamente. En esta figura, NRBC representa la agrupación de eritrocitos nucleados, BASO representa la agrupación de basófilos, WBC-BASO representa la agrupación de leucocitos diferentes de los basófilos y WBC representa la agrupación de leucocitos. En este dispersograma, los eritrocitos nucleados aparecen en la región cuya intensidad fluorescente es menor que aquella de los leucocitos. Por consiguiente, se pueden discriminar de forma clara los leucocitos de los eritrocitos nucleados. Adicionalmente, los basófilos aparecen en la región cuyo tamaño es más grande, es decir, cuya intensidad fluorescente

es mayor que aquella de los leucocitos diferentes de los basófilos. Por consiguiente, se pueden discriminar los basófilos de los leucocitos diferentes de los basófilos. Cuando se miden muestras sanguíneas que contienen altas cantidades de leucocitos o muestras sanguíneas para las cuales ha transcurrido un período de tiempo después de esta recolección, no se pueden discriminar de manera precisa los basófilos y los leucocitos diferentes de los basófilos en los dispersogramas empleando intensidad fluorescente e intensidad de luz dispersada directa. En estos casos, se puede usar la información de luz dispersada directa y la información de luz dispersada lateral. En el dispersograma que tiene el eje x para la intensidad de luz dispersada lateral y el eje y para la intensidad de luz dispersada directa, como se muestra en la Figura 2 por ejemplo, los basófilos y los leucocitos diferentes de los basófilos se distribuyen para formar agrupaciones, respectivamente. En esta figura, BASO representa la agrupación de basófilos y WBC-BASO representa la agrupación de leucocitos diferentes de los basófilos. En este dispersograma, los basófilos aparecen en la región cuya intensidad de luz dispersada lateral e intensidad dispersada directa es mayor que aquella de otros leucocitos. Por consiguiente, se pueden discriminar los basófilos de otros leucocitos. Adicionalmente, como se describe anteriormente, se pueden discriminar los

eritrocitos nucleados de otros leucocitos de acuerdo a la Figura 1. Por lo tanto, las células que se incluyen en ambas regiones en las Figuras 1 y 2 se pueden calcular como basófilos, de modo que se puede llevar a cabo una medición
5 más precisa de los basófilos.

Las posiciones de las agrupaciones para cada una de las células sanguíneas que aparecen en los dispersogramas se pueden identificar al tratar las muestras respectivamente que contienen cada célula sanguínea con el equipo de
10 reactivo de la presente modalidad y llevar a cabo las mediciones.

El número y la relación de eritrocitos nucleados y basófilos se pueden calcular al analizar las agrupaciones en dispersogramas con un software analítico apropiado. De
15 manera específica, cuando se identifica una agrupación celular en un dispersograma en una posición donde ciertas células se suponen que aparecen, se identifica el centro de esta agrupación. El límite de esta agrupación celular se puede identificar como un área que está entre el centro y un
20 área en la cual aparece otra agrupación celular y es hasta una parte en la cual aparece cierta agregación celular concentrada. Las células que aparecen en esta área identificadas se pueden contar como las ciertas células relacionadas. Además, al contar los leucocitos diferentes de
25 los basófilos, se puede calcular la relación de los

basófilos a los leucocitos totales (basófilos / leucocitos totales; referido más adelante en la presente como "la relación de basófilos") y la relación de eritrocitos nucleados a leucocitos totales (eritrocitos nucleados / leucocitos totales, referida más adelante en la presente como "la relación de eritrocitos nucleados"). La relación de eritrocitos nucleados se representa en general como un porcentaje de los eritrocitos nucleados aparecidos por 100 leucocitos y se explica como la unidad "células / 100 WBC".

Al usar el equipo de reactivos y el método para análisis de muestra de acuerdo a las presentes modalidades, las agrupaciones formadas por eritrocitos nucleados y basófilos, respectivamente, se separan de manera clara de las agrupaciones formadas por otras células sanguíneas de modo que se puede llevar a cabo un conteo más preciso.

La presente invención se explica adicionalmente por los siguientes ejemplos. Sin embargo, se debe reconocer que se pueden efectuar varias alteraciones y modificaciones en la presente invención y el alcance de la misma no se limita a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Los agentes tensioactivos catiónicos usados en los siguientes Ejemplos son bromuro de deciltrimetilamonio (DTAB) y cloruro de dodeciltrimetilamonio (LTAC).

Los agentes tensoactivos no iónicos usados en los

siguientes Ejemplos son como sigue:

Polioxiestileno(16)-oleil-éter (nombre de producto:
 NIKKOL BO-16); Poloxietileno(20)-cetil-éter (nombre de
 producto: NIKKOL BC-20TX); Polioxiestileno(20)
 5 polioxipropileno(8)-cetil-éter (nombre de producto: NIKKOL
 PBC-44); Polioxiestileno(30) polioxipropileno(6)-
 deciltetradecil-éter (nombre de producto: NIKKOL PEN-4630);
 Aceite de resino polioxiestileno(20) (nombre de producto:
 NIKKOL CO-20TX); Aceite de resino hidrogenado
 10 polioxiestileno(20) (nombre de producto: NIKKOL HCO-20);
 Aceite de resino hidrogenado polioxiestileno(50) (nombre de
 producto: NIKKOL HCO-50); Fitoestanol polioxiestileno(25)
 (nombre de producto: NIKKOL BPSH-25).

Todos lo anterior se puede obtener de Nikko
 15 Chemicals Co., Ltd.

Los ácidos carboxílicos aromáticos usados en los
 siguientes Ejemplos son ácido salicílico, ácido ftálico,
 ácido benzoico, ácido hidroxibenzoico y ácido aminobenzoico.

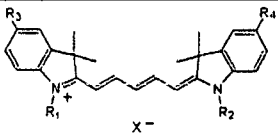
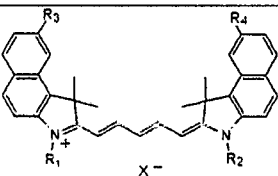
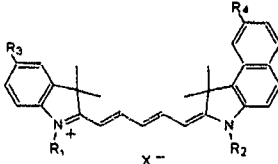
Los tintes fluorescentes usados en los siguientes
 20 Ejemplos son NK-529, NK-2670, NK-3750, NK-3383, NK-1840, NK-
 9001, NK-9003, NK-2929, NK-3375, NK-5056, NK-3266 y NK-3620.
 Todos estos se pueden obtener de Hayashibara Biochemical
 Laboratories, Inc. Las fórmulas químicas de estos tintes se
 presentan en la Tabla 1.

25 Tabla 1

5

10

15

Fórmula general	Nombre de tinte	estructura				
		R1	R2	R3	R4	X
	NK-529	CH3	CH3	H	H	I ⁻
	NK-2670	CH3	CH3	H	H	ClO ₄ ⁻
	NK-3750	CH3	CH3	H	H	BF ₄ ⁻
	NK-3383	C ₄ H ₉	C ₄ H ₉	H	H	ClO ₄ ⁻
	NK-1840	(CH ₂) ₃ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₃ SO ₃ Na	H	H	-
	NK-9001	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₄ SO ₃ Na	H	H	-
	NK-9003	C ₄ H ₉	C ₄ H ₉	SO ₃ Na	SO ₃ ⁻	-
	NK-2929	CH3	CH3	H	H	ClO ₄ ⁻
	NK-3375	CH3	CH3	H	H	I ⁻
	NK-5056	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻ N(H)(C ₂ H ₅) ₃	H	H	-
	NK-3265	CH3	CH3	H	H	ClO ₄ ⁻
	NK-3620	C ₄ H ₉	C ₄ H ₉	H	H	ClO ₄ ⁺

Ejemplo Comparativo 1

20

25

En este Ejemplo Comparativo, las muestras sanguíneas para las cuales han transcurrido cerca de 8 horas después de su recolección se analizaron al usar el método convencional.

Las muestras sanguíneas tomadas respectivamente de tres sujetos se midieron en el contador automático de células sanguíneas XE-2100 (Sysmex Corporation: equipado con láser rojo de semiconductor (633 nm)) para contar el número

57

de leucocitos totales y el número de basófilos. En base a estos resultados de conteo, se calculó la relación de basófilos. Se usó Stromatolyser-FBII (Sysmex Corporation) como el reactivo. Se midieron las muestras sanguíneas para las cuales han transcurrido aproximadamente 8 horas después de su recolección.

Como resultado, se confirmó que los contenidos de los basófilos en estas muestras estuvieron por arriba del valor normal (más adelante en la presente estas muestras se refieren como muestras 1, 2 y 3 de BASO, respectivamente). La relación de basófilos en las muestras 1, 2 y 3 de BASO fue de 0.8%, 3.4% y 1.6%, respectivamente. Estos resultados se usaron como referencias para Ejemplos 1 y 2.

Los eritrocitos nucleados contenidos en las muestras sanguíneas tomadas de tres sujetos diferentes de los sujetos descritos anteriormente se midieron con el contador automático de células sanguíneas XE-2100 para contar el número de leucocitos totales y el número de eritrocitos nucleados. En base a los resultados del conteo, se calculó la relación de eritrocitos nucleados. Se usó Stromatolyser-NR (Sysmex Corporation) como el reactivo. Se midieron las muestras sanguíneas para las cuales han transcurrido aproximadamente 8 horas después de su recolección.

Como resultado, se confirmó que los eritrocitos

nucleados estuvieron presentes en estas muestras (más adelante estas muestras se refieren como muestras 1, 2 y 3 de NREC, respectivamente). La relación de eritrocitos nucleados en las muestras 1, 2 y 3 de NREC fue de 4.4
5 células/100 WBC, 1.9 células/100 WBC y 1.3 células/100 WBC, respectivamente. Estos resultados se usaron como referencias para los Ejemplos 1 y 2.

Ejemplo 1

En este ejemplo, se prepararon el primero y
10 segundo reactivos que comprenden las siguientes composiciones y se midieron con estos reactivos las muestras sanguíneas para las cuales han transcurrido aproximadamente 8 horas después de su recolección.

El pH del primer reactivo es 3.0.

15 Primer reactivo A:

Es la solución acuosa que contiene 0.5 mM de salicilato de sodio, 10 mM de ácido DL-málico, 2000 ppm de LTAC, y 1000 ppm de BO-16.

Primer reactivo B:

20 Es la solución acuosa que contiene 0.5 mM de salicilato de sodio, 10 mM de DL-málico, 1500 ppm de LTAC, y 1000 ppm de PBC-44.

Primer reactivo C:

25 Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 2000 ppm de LTAC, y 1000 ppm de BO-16.

Primer reactivo D:

Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 1500 ppm de LTAC, y 1000 ppm de PBC-44.

Primer reactivo E:

5 Es la solución acuosa que contiene 0.5 mM de ftalato ácido de potasio, 10 mM de ácido DL-málico, 2000 ppm de LTAC, y 1000 ppm de BO-16.

Primer reactivo F:

10 Es la solución acuosa que contiene 2 mM de ftalato ácido de potasio, 10 mM de ácido DL-málico, 1500 ppm de LTAC, y 1000 ppm de PBC-44.

Segundo reactivo:

Es uno en el cual se disolvieron 15 mg de NK-3383 en 100 mL de etilenglicol.

15 El primer reactivo (1 mL), 20 μ L del segundo reactivo y 20 μ L de la muestra sanguínea (muestra 1, 2 y 3 de BASO o muestra 1, 2 y 3 de NRBC) se mezclaron completamente, y la mezcla obtenida de esta manera se dejó reaccionar a 40°C durante 10 segundos para obtener la
20 muestra de medición. La muestra de medición se introdujo a una parte detectora del citómetro de flujo que tiene una fuente de luz de excitación con 633 nm, y una luz de excitación se aplicó a las células en la muestra de medición. La señal de la luz dispersada y la señal
25 fluorescente emitida de las células se detectaron y

analizaron para medir los basófilos, los eritrocitos nucleados y los leucocitos totales en la muestra de medición. Esta medición se llevó a cabo con el contador automático de células sanguíneas XE-2100.

5 Se examinaron las muestras 1 y 2 de BASO y las muestras 1 y 2 de NRBC para las cuales han transcurrido aproximadamente 8 horas después de su recolección.

10 Para la muestra de medición se obtuvieron un primer dispersograma que tiene dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad fluorescente y un segundo dispersograma que tiene dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad de luz dispersada lateral. La Figura 3 muestra los segundos dispersogramas obtenidos en las mediciones de las muestras 1 y 2 de BASO para las cuales han pasado aproximadamente 8 horas después de su recolección, y la Figura 4 muestra los primeros dispersogramas obtenidos en las mediciones de las muestras 1 y 2 de NRBC para las cuales han pasado aproximadamente 8 horas después de su recolección.

20 En base a estos dispersogramas, se contaron los leucocitos totales, los basófilos y los eritrocitos nucleados y se calculó la relación de basófilos y la relación de eritrocitos nucleados. La Tabla 2 muestra las relaciones de basófilos de las muestras 1 y 2 de BASO para las cuales han transcurrido 8 horas después de su

recolección, que se calcula Ejemplo 1 Comparativo y el presente Ejemplo. La Tabla 3 muestra las relaciones de los eritrocitos nucleados de las muestras 1 y 2 de NRBC para las cuales han pasado 8 horas después de su recolección, que se calcularon en el Ejemplo 1 Comparativo y el presente Ejemplo.

Tabla 2

Muestras usadas	Ejemplo		Relación de basófilos en el Ejemplo Comparativo (%)
	Reactivos usados	Relación de basófilos (%)	
Muestra 2 de BASO (8 horas después de recolección sanguínea)	Primer reactivo A y segundo reactivo	1.1	0.8
	Primer reactivo B y segundo reactivo	1.1	
	Primer reactivo C y segundo reactivo	1.2	
	Primer reactivo D y segundo reactivo	1.1	
	Primer reactivo E y segundo reactivo	1.2	
	Primer reactivo F y segundo reactivo	1.2	
	Primer reactivo A y segundo reactivo	3.5	3.4
Muestra 2 de BASO (8 horas después de recolección sanguínea)	Primer reactivo B y segundo reactivo	3.8	
	Primer reactivo C y segundo reactivo	3.5	
	Primer reactivo D y segundo reactivo	3.6	
	Primer reactivo E y segundo reactivo	3.7	
	Primer reactivo F y segundo reactivo	3.7	
	Primer reactivo A y segundo reactivo	3.5	
	Primer reactivo B y segundo reactivo	3.8	

Tabla 3

5

10

15

20

Muestras usadas	Ejemplo		Relación de eritrocitos nucleados en Ejemplo Comparativo (células/100 WBC)
Muestra 1 de NRBC (8 horas después de recolección sanguínea)	Reactivos usados	Relación de eritrocitos nucleados (células/100 WBC)	4.4
	Primer reactivo A y segundo reactivo	5.3	
	Primer reactivo B y segundo reactivo	4.6	
	Primer reactivo C y segundo reactivo	4.2	
	Primer reactivo D y segundo reactivo	4.5	
	Primer reactivo E y segundo reactivo	4	
	Primer reactivo F y segundo reactivo	4.2	
Muestra 2 de NRBC (8 horas después de recolección sanguínea)	Primer reactivo A y segundo reactivo	1.8	1.9
	Primer reactivo B y segundo reactivo	1.8	
	Primer reactivo C y segundo reactivo	2.1	
	Primer reactivo D y segundo reactivo	1.8	
	Primer reactivo E y segundo reactivo	2	
	Primer reactivo F y segundo reactivo	2	

25

La Figura 3 muestra que los basófilos se discriminan de manera clara de los leucocitos diferentes de los basófilos cuando se usaron los reactivos de muestra de acuerdo a la presente modalidad. La Figura 4 muestra que se discriminan claramente los eritrocitos nucleados de los

63

basófilos y los leucocitos diferentes de los basófilos cuando se usaron los reactivos de análisis de muestra de acuerdo a la presente modalidad. De esta manera, debido a que se discriminan de manera clara los basófilos y los eritrocitos nucleados respectivamente, se obtuvieron de manera precisa el número y la relación de los mismos a los leucocitos totales al identificar células que parecen en ciertas áreas en los dispersogramas como se muestra en las Figuras 3 y 4 como basófilos y eritrocitos nucleados.

Las Tablas 2 y 3 muestran que las relaciones calculadas en el Ejemplo 1 estuvieron cercanamente análogas a las relaciones calculadas en el Ejemplo Comparativo 1. Por lo tanto, se confirmó que se pueden medir los eritrocitos nucleados y los basófilos con los reactivos de análisis de muestra del presente ejemplo tan de forma precisa como el caso cuando se usó otro reactivo para las mediciones.

Ejemplo 2

En este Ejemplo, se usaron el primero y segundo reactivo del Ejemplo 1 para medir las muestras sanguíneas para las cuales han pasado aproximadamente 50 horas después de su recolección. El método de medición fue el mismo como el Ejemplo 1 excepto por las muestras sanguíneas usadas. En este ejemplo se midieron la muestra 2 o 3 de BASO y la muestra 2 o 3 de NRBC para las cuales han pasado aproximadamente 50 horas después de su recolección.

Entre los primeros reactivos A a F en el Ejemplo 1, se usaron los primeros reactivos A, B, E y F para las mediciones de la muestra 2 de BASO y la muestra 2 de NRBC, y se usaron los primeros reactivos C y D para las mediciones de la muestra 3 de BASO y la muestra 3 de NRBC.

Similar al Ejemplo 1, para la muestra de medición se obtuvieron un primer dispersograma que tiene dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad fluorescente y un segundo dispersograma que tiene dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad de luz dispersada lateral. La Figura 5 muestra los primeros y segundos dispersogramas obtenidos por las mediciones en las muestras 2 de BASO para las cuales han transcurrido aproximadamente 50 horas después de su recolección, y el primer dispersograma obtenido por las mediciones en las muestras 2 de NRBC para las cuales han transcurridos aproximadamente 50 horas después de su recolección. La Figura 6 muestra el primero y segundo dispersogramas obtenidos por las mediciones en las muestras 3 de BASO para las cuales han transcurrido aproximadamente 50 horas después de su recolección, y el primer dispersograma obtenido por las mediciones en las muestras 3 de NRBC para las cuales han transcurrido aproximadamente 50 horas después de su recolección.

En base a estos dispersogramas, se contaron los

leucocitos totales, los basófilos y los eritrocitos nucleados y se calculó la relación de basófilos y la relación de eritrocitos nucleados. La Tabla 4 muestra las relaciones de basófilos de la muestra 2 y 3 de BASO para las cuales han transcurrido aproximadamente 50 horas después de su recolección, que se calcularon en este Ejemplo. La Tabla 4 representa las relaciones respectivas de los basófilos, calculadas de acuerdo al primer dispersograma (la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad fluorescente) y el segundo dispersograma (la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad de luz dispersada lateral). La Tabla 5 muestra las relaciones de los eritrocitos nucleados de las muestras 2 y 3 de NRBC para las cuales han transcurrido aproximadamente 50 horas después de su recolección, que se calcularon en este Ejemplo.

Tabla 4

Muestras usadas	Reactivos usados	Relación de basófilos (%)	
		Intensidad de luz dispersada directa, intensidad de luz dispersada lateral	Intensidad de luz dispersada directa, intensidad fluorescente
Muestra 2 de BASO (50 horas después de recolección de sangre)	Primer reactivo A y segundo reactivo	3.6	3.3
	Primer reactivo B y segundo reactivo	3.6	3.6
	Primer reactivo E y segundo reactivo	3.6	3.5
Muestra 3 de BASO (50 horas después de recolección de sangre)	Primer reactivo F y segundo reactivo	3.4	3.4
	Primer reactivo C y segundo reactivo	1.6	1.6
	Primer reactivo D y segundo reactivo	1.8	1.9

Tabla 5

Muestras usadas	Reactivos usados	Relación de eritrocitos nucleados (células/100 WBC)
Muestra 2 de NRBC (50 horas después de recolección de sangre)	Primer reactivo A y segundo reactivo	1.9
	Primer reactivo B y segundo reactivo	1.8
	Primer reactivo E y segundo reactivo	1.8
	Primer reactivo F y segundo reactivo	1.8
Muestra 3 de NRBC (50 horas después de recolección de sangre)	Primer reactivo C y segundo reactivo	1.1
	Primer reactivo D y segundo reactivo	1.2

Las Figuras 5 y 6 muestran que los basófilos en las muestras para las cuales han transcurrido aproximadamente 50 horas después de su recolección se discriminan claramente de los leucocitos diferentes de los basófilos cuando se usaron los reactivos de análisis de muestra de acuerdo a este ejemplo. Adicionalmente, se muestra que los eritrocitos nucleados en las muestras para las cuales han transcurrido aproximadamente 50 horas después de su recolección se discriminan de manera clara de los basófilos y leucocitos diferentes de los basófilos cuando se

67

usaron los reactivos de análisis de muestra de acuerdo a la presente modalidad. De esta manera, debido a que se discriminan claramente los basófilos y los eritrocitos nucleados, respectivamente, aun en las muestras para las cuales ha transcurrido un período de tiempo después de su recolección, se obtuvieron de manera precisa el número y la relación de los mismos a los leucocitos totales al identificar células que aparecen en ciertas áreas en los dispersogramas como se muestra en las Figuras 5 y 6 como basófilos y eritrocitos nucleados.

Cuando las mediciones se llevaron a cabo por el método del Ejemplo 1 Comparativo, las relaciones de los basófilos de las muestras 2 y 3 de BASO para las cuales han transcurrido aproximadamente 8 horas después de su recolección fueron 3.4% y 1.6%, respectivamente. Las relaciones de los eritrocitos nucleados de las muestras 2 y 3 de NRBC para las cuales han transcurrido aproximadamente 8 horas después de su recolección fueron 1.9 y 1.3 células/100 WBC, respectivamente. En base a estos resultados en el Ejemplo 1 Comparativo y en las Tablas 4 y 5, las relaciones calculadas en el Ejemplo 2 fueron cercanamente análogas a las relaciones calculadas en el Ejemplo Comparativo 1. Por lo tanto, se confirmó que se pueden medir los eritrocitos nucleados y los basófilos, aún en las muestras de sangre para las cuales ha transcurrido un período de tiempo después

68

de su recolección, con los reactivos de análisis de muestra del presente ejemplo tan precisamente como el caso cuando se usó otro reactivo para las mediciones.

Adicionalmente, de acuerdo a los resultados de la muestra 2 de BASO en las Tablas 2 y 4, la relación de los basófilos calculados para la muestra para la cual han transcurrido aproximadamente 50 horas después de su recolección fue cercanamente análoga a la relación de los basófilos calculada para la muestra para la cual han transcurrido aproximadamente 8 horas después de su recolección. De acuerdo a los resultados de la muestra 2 de NRBC en las Tablas 3 y 5, la relación de eritrocitos nucleados calculada para la muestra para la cual han transcurrido aproximadamente 50 horas después de su recolección fue cercanamente análoga a la relación de los eritrocitos nucleados calculada para la muestra para la cual han transcurrido aproximadamente 8 horas después de su recolección.

Por consiguiente, se confirmó que se pueden llevar a cabo mediciones altamente precisas con los reactivos de análisis de muestra de este ejemplo aún cuando se use la muestra para la cual ha transcurrido un período de tiempo después de su recolección.

Ejemplo 3

En este Ejemplo, se estudiaron las combinaciones

del agente tensioactivo catiónico, DTAB, y varios agentes tensioactivos no iónicos. Se prepararon el primero y segundo reactivos que tienen las siguientes composiciones. El pH del primer reactivo es 3.0.

5 Primer reactivo A:

Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 3000 ppm de BO-16 y 3000 ppm de DTAB.

Primer reactivo B:

10 Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 7000 ppm de BO-16 y 7000 ppm de DTAB.

Primer reactivo C:

Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 25 3000 ppm de PBC-44 y 5000 ppm de DTAB.

15 Primer reactivo D:

Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 7000 ppm de PBC-44 y 7000 ppm de DTAB.

Primer reactivo E:

20 Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 2000 ppm de BC-20TX y 3000 ppm de DTAB.

Primer reactivo F:

Es la solución acuosa que contiene salicilato de sodio 10 mM, 2000 ppm de BC-20TX y 5000 ppm de DTAB.

Primer reactivo G:

25 Es la solución acuosa que contiene 10 mM de

salicilato de sodio, 3000 ppm de BPSH-25 y 7000 ppm de DTAB.

Primer reactivo H:

Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 7000 ppm de BPSH-25 y 7000 ppm de DTAB.

5 Primer reactivo I:

Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 5000 ppm de HCO-50 y 5000 ppm de DTAB.

Primer reactivo J:

10 Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 7000 ppm de HCO-50 y 7000 ppm de DTAB.

Primer reactivo K:

Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 3000 ppm de HCO-20 y 5000 ppm de DTAB.

Primer reactivo L:

15 Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 7000 ppm de HCO-20 y 7000 ppm de DTAB.

Primer reactivo M:

Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 3000 ppm de CO-20TX y 5000 ppm de DTAB.

20 Primer reactivo N:

Es la solución acuosa que contiene salicilato de sodio 10 mM, 7000 ppm de CO-20TX y 7000 ppm de DTAB.

Primer reactivo O:

25 Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 3000 ppm de PEN-4630 y 5000 ppm de

DTAB.

Primer reactivo P:

Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 5000 ppm de PEN-4630 y 7000 ppm de DTAB.

Segundo reactivo:

Es etilenglicol que contiene 300 ppm de NK-3383.

El primer reactivo (1 mL), 20 μ L del segundo reactivo y 20 μ L de la muestra de sangre para la cual se ha confirmado la presencia de BASO o NRBC (muestra 4 de BASO o muestra 4 de NRBC) se mezclaron completamente, y la mezcla obtenida de esta manera se dejó alcanzar 41°C durante 10 segundos para obtener la muestra de medición. Similar a Ejemplo 1, se midieron los basófilos, los eritrocitos nucleados y los leucocitos totales en la muestra de medición usando el contador automático de células sanguíneas XE-2100. Se examinaron las muestras sanguíneas para las cuales han transcurrido aproximadamente 8 horas después de su recolección.

Para la muestra de medición preparada de la muestra 4 de BASO, se obtuvieron un primer dispersograma que tiene dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad fluorescente y un segundo dispersograma que tiene dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad de luz dispersada lateral. Para la muestra de

medición preparada de la muestra 4 de NRBC, se obtuvo un dispersograma que tiene dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad fluorescente. Las Figuras 7 a 10 muestran los dispersogramas respectivos.

5 Las Figuras 7 a 10 muestran que los basófilos se discriminan claramente de los leucocitos diferentes de los basófilos cuando se usan los reactivos de análisis de muestra en las cuales se combinan DTAB y el agente tensioactivo no iónico. Además, se muestra que se discrimina
10 de manera clara los eritrocitos nucleados de los basófilos y de los leucocitos diferentes de los basófilos cuando se usan los reactivos de análisis de muestra en los cuales se combinan DTAB y el agente tensioactivo no iónico.

También se mostró que se discriminaron en forma
15 clara los basófilos contenidos en la muestra 4 de BASO usada en este Ejemplo de los leucocitos diferentes de los basófilos en cualquiera del segundo y primer dispersograma que tienen dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad de luz dispersada lateral, y dos
20 ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad fluorescente, respectivamente.

De esta manera, debido a que se discriminan de manera clara los basófilos y los eritrocitos nucleados, respectivamente, se puede obtener de manera precisa el
25 número y la relación de los mismos a los leucocitos totales

al identificar células que aparecen en ciertas áreas en los dispersogramas, como se muestra en las Figuras 7 a 10, como basófilos y eritrocitos nucleados.

Ejemplo 4

5 En este Ejemplo, se estudiaron las combinaciones del agente tensioactivo catiónico, LTAC, y varios agentes tensioactivos no iónicos. Se prepararon el primero y segundo reactivos que tienen las siguientes composiciones. El pH del primer reactivo es 3.0.

10 Primer reactivo A:

Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 1000 ppm de BO-16 y 1000 ppm de LTAC.

Primer reactivo B:

15 Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 5000 ppm de BO-16 y 2000 ppm de LTAC.

Primer reactivo C:

Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 1000 ppm de PEC-44 y 1000 ppm de LTAC.

Primer reactivo D:

20 Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 5000 ppm de PBC-44 y 2000 ppm de LTAC.

Primer reactivo E:

Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 1000 ppm de BC-20TX y 1000 ppm de LTAC.

25 Primer reactivo F:

Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 5000 ppm de BC-20TX y 2000 ppm de LTAC.

Primer reactivo G:

5 Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 1000 ppm de BPSH-25 y 1500 ppm de LTAC.

Primer reactivo H:

Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 5000 ppm de BPSH-25 y 2000 ppm de LTAC.

Primer reactivo I:

10 Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 1000 ppm de HCO-50 y 1000 ppm de LTAC.

Primer reactivo J:

Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 7000 ppm de HCO-50 y 2000 ppm de LTAC.

15 Primer reactivo K:

Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 1000 ppm de HCO-20 y 1000 ppm de LTAC.

Primer reactivo L:

20 Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 7000 ppm de HCO-20 y 2000 ppm de LTAC.

Primer reactivo M:

Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 1000 ppm de PEN-4630 y 1000 ppm de LTAC.

25 Primer reactivo N:

Es la solución acuosa que contiene 10 mM de salicilato de sodio, 5000 ppm de PEN-4630 y LTAC 1800 ppm.

Segundo reactivo:

Es etilenglicol que contiene 300 ppm de NK-3383.

5 El primer reactivo (1 mL), 20 μ L del segundo reactivo y 20 μ L de la muestra de sangre para la cual se ha confirmado la presencia de BASO o NRBC (muestra 5 de BASO o muestra 5 de NRBC) se mezclaron completamente, y la mezcla obtenida de esta manera se dejó reaccionar a 41°C durante 10
10 segundos para obtener la muestra de medición. Similar al Ejemplo 1, se midieron los basófilos, los eritrocitos nucleados y los leucocitos totales y la muestra de medición usando el contador automático de células sanguíneas XE-2100. Se midieron las muestra sanguíneas para las cuales han
15 transcurrido aproximadamente 8 horas después de su recolección.

Para la muestra de medición preparada del ejemplo 5 de BASO, se obtuvieron un primer dispersograma que tiene dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la
20 intensidad fluorescente y un segundo dispersograma que tiene dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad de luz dispersada lateral. Para la muestra de medición preparada de la muestra 5 de NRBC, se obtuvo un dispersograma que tiene dos ejes de la intensidad de luz
25 dispersada directa y la intensidad fluorescente. Las Figuras

11 a 14 muestran los dispersogramas respectivos.

Las Figuras 11 a 14 muestran que se discriminan claramente los basófilos de los leucocitos diferentes de los basófilos cuando se usan los reactivos de análisis de muestra en los cuales se combinaron LTAC y el agente tensioactivo no iónico. Además, se muestra que los eritrocitos se discriminan claramente de los basófilos y de los leucocitos diferentes de los basófilos cuando se usan los reactivos de análisis de muestra en los cuales se combinan LTAC y el agente tensioactivo no iónico.

También se muestra que se discriminaron claramente los basófilos contenidos en la muestra 5 de BASO usada en este Ejemplo de los leucocitos diferentes de los basófilos en cualquiera del segundo y primer dispersograma que tiene dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad de luz dispersada lateral, y dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad fluorescente, respectivamente.

De esta manera, debido a que se discriminan claramente los basófilos y los eritrocitos nucleados, respectivamente, se pueden obtener de manera precisa el número y la relación de los mismos a los leucocitos totales al identificar células que aparecen en ciertas áreas en los dispersogramas, como se muestra en las Figuras 11 a 14, como basófilos y eritrocitos nucleados.

Los Ejemplos 3 y 4 muestran que los eritrocitos nucleados y los basófilos en las muestras sanguíneas se pueden discriminar claramente de otros leucocitos y contar al usar los reactivos de análisis de muestra en las cuales se combinan los agente tensioactivos y agentes tensioactivos no iónicos.

Ejemplo 5

En este Ejemplo, se estudiaron las combinaciones de ácidos carboxílicos aromáticos y agentes amortiguadores. Se prepararon el primero y segundo reactivos que tienen las siguientes composiciones. El pH del primer reactivo es 3.0.

Primer reactivo A:

Es la solución acuosa que contiene 10 mM ftalato ácido de potasio, 0 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de BO-16, y 2000 ppm de LTAC.

Primer reactivo B:

Es la solución acuosa que contiene 5 mM ftalato ácido de potasio, 5 mM de ácido DL-málico 5mM, 1000 ppm de BO-16 y 2000 ppm de LTAC.

Primer reactivo C:

Es la solución acuosa que contiene 1 mM ftalato ácido de potasio, 9 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de BO-16 y 2000 ppm de LTAC.

Primer reactivo D:

Es la solución acuosa que contiene 0.3 mM ftalato

ácido de potasio, 9.7 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de BO-16 y 2000 ppm de LTAC.

Primer reactivo E:

Es la solución acuosa que contiene 5 mM de salicilato de sodio, 5 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de PBC-44 y 1500 ppm de LTAC.

Primer reactivo F:

Es la solución acuosa que contiene 1 mM de salicilato de sodio, 9 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de PBC-44 y 1500 ppm de LTAC.

Primer reactivo G:

Es la solución acuosa que contiene 0.22 mM de salicilato de sodio, 10 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de PBC-44 y 1500 ppm de LTAC.

15 Primer reactivo H:

Es la solución acuosa que contiene 5 mM de salicilato de sodio, 5 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de BO-16 y 2000 ppm de LTAC.

Primer reactivo I:

20 Es la solución acuosa que contiene 1 mM de salicilato de sodio, 9 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de BO-16 y 2000 ppm de LTAC.

Primer reactivo J:

25 Es la solución acuosa que contiene 0.24 mM de salicilato de sodio, 10 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de

BO-16 y 2000 ppm de LTAC.

Segundo reactivo:

Es etilenglicol que contiene 300 ppm de NK-3383.

El primer reactivo (1 mL), 20 μ L del segundo
5 reactivo y 20 μ L de la muestra de sangre para la cual se ha
confirmado la presencia de BASO o NRBC (muestra 6 de BASO o
muestra 6 de NRBC) se mezclaron completamente, y la mezcla
obtenida de esta manera se dejó reaccionar a 41°C durante 10
segundos para obtener la muestra de medición. Similar al
10 Ejemplo 1, se midieron los basófilos, los eritrocitos
nucleados y los leucocitos totales y la muestra de medición
usando el contador automático de células sanguíneas XE-2100.
Se midieron las muestras sanguíneas para las cuales han
transcurrido aproximadamente 8 horas después de su
15 recolección.

Para la muestra de medición preparada de la
muestra 6 de BASO, se obtuvieron un primer dispersograma que
tiene dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y
la intensidad fluorescente y un segundo dispersograma que
20 tiene dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y
la intensidad de luz dispersada lateral. Para la muestra de
medición preparada de la muestra 6 de NRBC, se obtuvo un
dispersograma que tiene dos ejes de la intensidad de luz
dispersada directa y la intensidad fluorescente. Las Figuras
25 15 a 17 muestran los dispersogramas respectivos.

Las Figuras 15 a 17 muestran que los basófilos se discriminan claramente de los leucocitos diferentes de los basófilos cuando se usan los reactivos de análisis de muestra en los cuales se combinan ácido carboxílico aromático y el agente amortiguador. Además, se muestra que se discrimina claramente los eritrocitos nucleados de los basófilos y de los leucocitos diferentes de los basófilos cuando los reactivos de análisis de muestra se usan en los cuales se combinan el ácido carboxílico aromático y el agente amortiguador.

También se mostró que los basófilos contenidos en la muestra 6 de BASO usada en este Ejemplo se discriminaron claramente de los leucocitos diferentes de los basófilos en cualquiera del segundo y primer dispersograma que tienen dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad de luz dispersada lateral, y dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad fluorescente, respectivamente.

De esta manera, debido a que se discriminan claramente los basófilos y los eritrocitos nucleados, respectivamente, se pueden obtener de manera precisa en número y relación de los mismos a leucocitos totales al identificar células que aparecen en ciertas áreas en los dispersogramas, como se muestra en las Figuras 15 a 17, como basófilos y eritrocitos nucleados.

En la Figura 15, se identificaron los baricentros de las agrupaciones de eritrocitos nucleados, basófilos y leucocitos diferentes de los basófilos, se obtuvieron los valores de la intensidad fluorescente que corresponden a los baricentros respectivos, y se compararon los valores obtenidos (datos no mostrados). Las baricentros de las agrupaciones respectivas se obtuvieron por un método conocido (ver Publicación de Patente Japonesa No Examinada HEI 5(1993)-149863). Como resultado, se mostró que la diferencia entre la intensidad fluorescente de los eritrocitos nucleados y la intensidad fluorescente de los basófilos o leucocitos diferentes de los basófilos es mayor cuando se usaron los reactivos de análisis de muestra que contienen tanto ácido ftálico como ácido málico (primeros reactivos B a D) en comparación a los reactivos de análisis de muestra que contiene sólo ácido ftálico (primer reactivo A). También se mostró que, entre los reactivos de análisis de muestra que contiene tanto ácido ftálico como ácido málico (primeros reactivos B a D), la diferencia entre la intensidad fluorescente de los eritrocitos nucleados y la intensidad fluorescente de los basófilos o leucocitos diferentes de los basófilos es mayor para el reactivo con mayor concentración de ácido málico (primeros reactivos C y D).

Se observó una tendencia similar a las Figuras 16

y 17 para los reactivos de análisis de muestra que contienen ácido salicílico y ácido málico (primeros reactivos E a J). Como resultado, se mostró que se mejora el desempeño de discriminación de particularmente eritrocitos nucleados al
5 combinar el ácido carboxílico aromático y el agente amortiguador.

Ejemplo 6

En este Ejemplo, se usaron varios tintes fluorescentes como el tinte fluorescente en el segundo
10 reactivo. Se prepararon el primero y segundo reactivos que tienen las siguientes composiciones. El pH del primer reactivo es 3.0.

Primer reactivo:

Es la solución acuosa que contiene 0.5 mM de
15 ftalato ácido de potasio, 10 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de BO-16 y 2000 ppm de LTAC.

Segundo reactivo A:

Es etilenglicol que contiene 150 ppm de NK-529.

Segundo reactivo B:

20 Es etilenglicol que contiene 150 ppm de NK-2670.

Segundo reactivo C:

Es etilenglicol que contiene 150 ppm de NK-3750.

Segundo reactivo D:

Es etilenglicol que contiene 150 ppm de NK-3383.

25 Segundo reactivo E:

Es etilenglicol que contiene 150 ppm de NK-1840.

Segundo reactivo F:

Es etilenglicol que contiene 150 ppm de NK-9001.

Segundo reactivo G:

5 Es etilenglicol que contiene 300 ppm de NK-9003.

Segundo reactivo H:

Es etilenglicol que contiene 150 ppm de NK-2929.

Segundo reactivo I:

Es etilenglicol que contiene 150 ppm de NK-3375.

10 Segundo reactivo J:

Es etilenglicol que contiene 300 ppm de NK-5056.

Segundo reactivo K:

Es etilenglicol que contiene 150 ppm de NK-3266.

Segundo reactivo L:

15 Es etilenglicol que contiene 150 ppm de NK-3620.

El primer reactivo (1 mL), 20 µL del segundo reactivo y 20 µL de la muestra de sangre para la cual se ha confirmado la presencia de BASO o NRBC (muestra 7 de BASO o muestra 7 de NRBC) se mezclaron completamente, y la mezcla obtenida de esta manera se dejó reaccionar a 41°C durante 10 segundos para obtener la muestra de medición. Similar al Ejemplo 1, se midieron basófilos, eritrocitos nucleados y leucocitos totales en la muestra de medición usando el contador automático de células sanguíneas XE-2100.

25 Se examinaron las muestras sanguíneas para las

cuales han transcurrido aproximadamente 8 horas después de su recolección.

Para la muestra de medición preparada de la muestra 7 de BASO, se obtuvieron un primer dispersograma que tiene dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad fluorescente y un segundo dispersograma que tiene dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad de luz dispersada lateral. Para la muestra de medición preparada de la muestra 7 de NREC, se obtuvo un dispersograma que tiene dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad fluorescente. Las Figuras 18 a 20 muestran los dispersogramas respectivos.

Las Figuras 18 a 20 muestran que se discriminan claramente los basófilos de los leucocitos diferentes de los basófilos al usar los reactivos de análisis de muestra que contienen cualquiera de los tintes fluorescentes. Además, se muestra que se discriminan claramente los eritrocitos nucleados de los basófilos y de los leucocitos diferentes de los basófilos al usar los reactivos de análisis de muestra que contienen cualquiera de los tintes fluorescentes.

También se mostró que se discriminaron claramente los basófilos contenidos en la muestra 7 BASO usada en este Ejemplo de los leucocitos diferentes de los basófilos en cualquiera del segundo y primer dispersograma que tiene dos

ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad de luz dispersada lateral, y dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad fluorescente, respectivamente.

5 De esta manera, debido a que se discriminan claramente los basófilos y los eritrocitos nucleados, respectivamente, se puede obtener de manera precisa el número y relación de los mismos a leucocitos totales al
10 identificar células que aparecen en ciertas áreas en los dispersogramas, como se muestra en las Figuras 18 a 20, como basófilos y eritrocitos nucleados.

Ejemplo 7

Estudio del tipo de ácidos benzoicos

En este Ejemplo, se usaron benzoato de potasio, 4-
15 hidroxibenzoato de sodio, 3-hidroxibenzoato de sodio y 4-aminobenzoato de potasio como ácidos carboxílicos aromáticos. Se prepararon los primeros y segundos reactivos que tienen las siguientes composiciones. El pH del primer reactivo es 3.0.

20 Primer reactivo A:

Es la solución acuosa que contiene 2 mM de benzoato de potasio, 8 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de PBC-44 y 2500 ppm de LTAC.

Primer reactivo B:

25 Es la solución acuosa que contiene 3 mM de

benzoato de potasio, 7 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de PBC-44 y 2500 ppm de LTAC.

Primer reactivo C:

5 Es la solución acuosa que contiene 4 mM de benzoato de potasio, 6 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de PBC-44 y 2500 ppm de LTAC.

Primer reactivo D:

10 Es la solución acuosa que contiene 7 mM de 4-hidroxibenzoato de sodio, 3 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de PBC-44 y 2500 ppm de LTAC.

Primer reactivo E:

Es la solución acuosa que contiene 8 mM de 4-hidroxibenzoato de sodio, 2 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de PBC-44 y 2500 ppm de LTAC.

15 Primer reactivo F:

Es la solución acuosa que contiene 4 mM de 3-hidroxibenzoato de sodio, 6 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de PBC-44 y 2500 ppm de LTAC.

Primer reactivo G:

20 Es la solución acuosa que contiene 5 mM 3-hidroxibenzoato de sodio, 5 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de PBC-44 y 2500 ppm de LTAC.

Primer reactivo H:

25 Es la solución acuosa que contiene 1 mM de benzoato de potasio, 9 mM de ácido DL-málico, 2000 ppm de

BO-16 y 2800 ppm de LTAC.

Primer reactivo I:

Es la solución acuosa que contiene 2 mM de 4-aminobenzoato de potasio, 8 mM de ácido DL-málico, 2000 ppm de BO-16 y 2800 ppm de LTAC.

La solución acuosa que contiene 2 mM de ftalato ácido de potasio, 10 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de PBC-44 y 2500 ppm de LTAC se usó como una referencia para los primeros reactivos A hasta G, y la solución acuosa que contiene 0.5 mM de ftalato ácido de potasio, 10 mM de ácido DL-málico, 2000 ppm de BO-16 y 2800 ppm de LTAC se usó como una referencia para los primeros reactivos H e I.

Segundo reactivo:

Es etilenglicol que contiene 150 ppm de NK-3383.

El primer reactivo (1 mL), 20 µL del segundo reactivo y 20 µL de la muestra de sangre para la cual se ha confirmado la presencia de BASO o NRBC (muestras 8 y 9 de BASO o muestras 8 y 9 de NRBC) se mezclaron completamente, y la mezcla obtenida de esta manera se dejó reaccionar a 41°C durante 7 segundos para obtener la muestra de medición. Similar al Ejemplo 1, se midieron los basófilos, los eritrocitos nucleados y los leucocitos totales en la muestra de medición usando el contador automático de células sanguíneas XE-2100. Se examinaron las muestras sanguíneas para las cuales han transcurrido aproximadamente 8 horas

después de su recolección.

Para las muestras de medición preparadas de las muestras 8 y 9 de BASO, se obtuvo un primer dispersograma que tiene dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad fluorescente y un segundo dispersograma que tiene dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad de luz dispersada lateral. Para las muestras de medición preparadas de las muestras 8 y 9 de NRBC, se obtuvo un dispersograma que tiene dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad fluorescente. Las Figuras 21 y 22 muestran los dispersogramas respectivos.

Las Figuras 21 y 22 muestran que se discriminan claramente los basófilos de los leucocitos diferentes de los basófilos en cualquier caso. Además, se muestra que se discriminan claramente los eritrocitos nucleados de los basófilos y de los leucocitos diferentes de los basófilos en cualquier caso.

También se mostró que se discriminaron claramente los basófilos contenidos en las muestras 8 y 9 de BASO usadas en este Ejemplo de los leucocitos diferentes de los basófilos en cualquiera del segundo y primer dispersogramas que tienen dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad de luz dispersada lateral, y dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la

intensidad fluorescente, respectivamente.

De esta manera, debido a que se discriminan claramente los basófilos y los eritrocitos nucleados, respectivamente, el número y relación de los mismos a los leucocitos totales se puede obtener de manera precisa al identificar células que aparecen en ciertas áreas en los dispersogramas, como se muestra en las Figuras 21 a 22, como basófilos y eritrocitos nucleados.

Ejemplo 8

10 Combinación de ftalato ácido de potasio y benzoato de potasio

En este ejemplo, se estudiaron las combinaciones de ftalato ácido de potasio y benzoato de potasio como los ácidos carboxílicos aromáticos. Se prepararon el primero y
15 segundo reactivos que tienen las siguientes composiciones. El pH del primer reactivo es 3.0.

Primer reactivo A:

Es la solución acuosa que contiene 2 mM de ftalato ácido de potasio, 10 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de PBC-
20 44 y 2500 ppm de LTAC.

Primer reactivo B:

Es la solución acuosa que contiene 1.5 mM de ftalato ácido de potasio, 0.5 mM de benzoato de potasio, 10 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de PBC-44 y 2500 ppm de
25 LTAC.

Primer reactivo C:

Es la solución acuosa que contiene 1.33 mM de ftalato ácido de potasio, 0.66 mM de benzoato de potasio, 10 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de PBC-44 y 2500 ppm de LTAC.

Primer reactivo D:

Es la solución acuosa que contiene 1 mM de ftalato ácido de potasio, 1 mM de benzoato de potasio, 10 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de PBC-44 y 2500 ppm de LTAC.

Primer reactivo E:

Es la solución acuosa que contiene 0.66 mM de ftalato ácido de potasio, 1.33 mM de benzoato de potasio, 10 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de PBC-44 y 2500 ppm de LTAC.

Primer reactivo F:

Es la solución acuosa que contiene 0.5 mM de ftalato ácido de potasio, 1.5 mM de benzoato de potasio, 10 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de PBC-44 y 2500 ppm de LTAC.

Primer reactivo G:

Es la solución acuosa que contiene 2 mM de benzoato de potasio, 10 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de PBC-44 y 2500 ppm de LTAC.

Segundo reactivo:

Es etilenglicol que contiene 150 ppm de NK-3383.

El primer reactivo (1 mL), 20 μ L del segundo reactivo y 20 μ L de la muestra de sangre para la cual se ha confirmado la presencia de BASO o NRBC (muestra 10 de BASO o muestra 10 de NRBC) se mezclaron completamente, y la mezcla
5 obtenida de esta manera se dejó reaccionar a 41°C durante 7 segundos para obtener la muestra de medición. Similar al Ejemplo 1, se midieron los basófilos, los eritrocitos nucleados y los leucocitos totales en la muestra de medición usando el contador automático de células sanguíneas XE-2100.
10 Se examinaron las muestras de sangre para las cuales han transcurrido aproximadamente 8 horas después de su recolección.

Para la muestra de medición preparada de la muestra 10 de BASO, se obtuvo un primer dispersograma que
15 tiene dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad fluorescente y un segundo dispersograma que tiene dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad de luz dispersada lateral. Para la muestra de medición preparada de la muestra 10 de NRBC, se
20 obtuvo un dispersograma que tiene dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad fluorescente. La Figura 23 muestra los dispersogramas respectivos.

La Figura 23 muestra que se discriminan claramente
25 los basófilos de los leucocitos diferentes de los basófilos

en cualquier caso. Además, se muestra que los eritrocitos nucleados se discriminan claramente de los basófilos y de los leucocitos diferentes de los basófilos en cualquier caso.

5 También se mostró que los basófilos contenidos en la muestra 10 de BASO usada en este ejemplo se discriminaron claramente de los leucocitos diferentes de los basófilos en cualquiera del segundo y primer dispersogramas que tienen dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la
10 intensidad de luz dispersada lateral, y dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad fluorescente, respectivamente.

 Se encontró que la cantidad de fantasmas se reduce de manera ventajosa cuando se usa ftalato ácido de potasio y
15 que la fracción de WBC y la fracción de NRBC se discriminan claramente con benzoato de potasio. Al usarlos en combinación, se discriminan más claramente los basófilos y los eritrocitos nucleados, respectivamente.

 De esta manera, debido a que se discriminan
20 claramente los basófilos y los eritrocitos nucleados, respectivamente, se puede obtener de manera precisa el número y relación de los mismos a leucocitos totales al identificar células que aparecen en ciertas áreas en los dispersogramas, como se muestra en la Figura 23, como
25 basófilos y eritrocitos nucleados.

Ejemplo 9Medición de muestra sanguínea para la cual ha transcurrido poco tiempo después de su recolección

En este ejemplo, se midieron tanto NRBC como BASO en muestras sanguíneas para las cuales ha transcurrido poco tiempo después de su recolección con los reactivos de la presente invención, al usar un dispersograma que tiene el eje x de la intensidad fluorescente y el eje y de la intensidad de luz dispersada directa. Se prepararon el primero y segundo reactivos que tienen las siguientes composiciones.

Primer reactivo (agente de hemólisis):

Es la solución acuosa que contiene 2 mM de ftalato ácido de potasio, 10 mM de ácido DL-málico, 1000 ppm de PBC-44 y 2000 ppm de LTAC. El pH del primer reactivo es 3.0.

Segundo reactivo (solución de tinción):

Es etilenglicol que contienen 50 ppm de NK-3383.

Las muestras sanguíneas usadas fueron:

Muestras sanguíneas para las cuales se ha confirmado la presencia de BASO (muestras de BASO): 12 muestras; y

Muestras sanguíneas para las cuales se ha confirmado la presencia de NRBC (muestras de NRBC): 12 muestras.

Todas las muestras de sangre son aquellas para las

cuales han transcurrido aproximadamente de 2 a 7 horas después de su recolección.

El primer reactivo (1 mL), 20 μ L del segundo reactivo y 20 μ L de la muestra de sangre (muestra de BASO o NRBC) se mezclaron completamente, y la mezcla obtenida de esta manera se dejó reaccionar a 41°C durante 7 segundos para obtener la muestra de medición. Similar al Ejemplo 1, se midieron los basófilos, los eritrocitos nucleados y los leucocitos totales en la muestra de medición usando el contador automático de células sanguíneas XE-2100.

Para las muestras de medición preparadas de las muestras de BASO o NRBC, se obtuvieron dispersogramas que tienen dos ejes de la intensidad de luz dispersada directa y la intensidad fluorescente. La Figura 25 muestra uno de los dispersogramas de la medición de muestras de BASO. La Figura 26 muestra uno de los dispersogramas de la medición de muestras de NRBC.

Las Figuras 25 y 26 muestran que los presentes reactivos permiten la separación de NRBC y BASO en las muestras sanguíneas para las cuales ha transcurrido poco tiempo después de su recolección.

En los dispersogramas anteriores, se identificaron los leucocitos totales, los basófilos y los eritrocitos nucleados como las células que aparecen en ciertas regiones y se contaron. Las relaciones de los basófilos y de los

eritrocitos nucleados a los leucocitos totales se obtuvieron de los números obtenidos de células.

Los números de leucocitos totales, de basófilos y de eritrocitos nucleados y las relaciones de basófilos y eritrocitos nucleados a leucocitos totales se obtuvieron como referencias para las mismas muestras sanguíneas por el mismo procedimiento como el Ejemplo Comparativo 1.

La Figura 27 muestra las correlaciones del número de leucocitos totales, la relación de basófilos y la relación de eritrocitos nucleados entre los resultados de las mediciones con los reactivos anteriores (primer reactivo y segundo reactivo) y aquellas de la referencia. Los resultados del número de leucocitos totales para el Ejemplo 9 y la referencia mostrada en la Figura 27 se obtuvieron de la medición de la muestra de BASO.

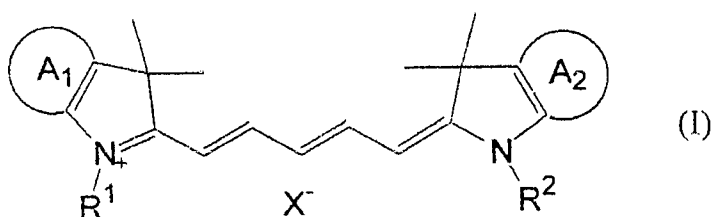
La Figura 27 muestra que los coeficientes (r) de correlación entre los resultados obtenidos con los presentes reactivos y la referencia en cualquiera del número de leucocitos totales, la relación de basófilos y la relación de eritrocitos nucleados fue de 0.9 ó más, que muestra fuerte correlación entre los mismos. Por consiguiente, se encontró que NRBC y BASO se pueden medir con los presentes reactivos en muestras sanguíneas para las cuales ha transcurrido poco tiempo después de su recolección.

La presente solicitud se refiere a las solicitudes

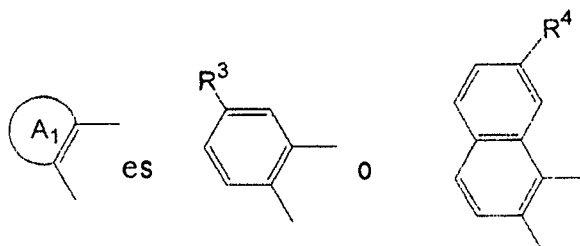
REIVINDICACIONES

1. Equipo de reactivos para analizar una muestra para medir basófilos y/o eritrocitos nucleados en la muestra, que comprende: un primer reactivo que contiene un agente tensioactivo catiónico, un agente tensioactivo no iónico y un ácido carboxílico aromático, que puede lisar eritrocitos y puede dañar la membrana celular de los leucocitos de modo que se pueda permear a través de la misma un tinte fluorescente, y un segundo reactivo que contiene el tinte fluorescente capaz de teñir ácido nucleico.

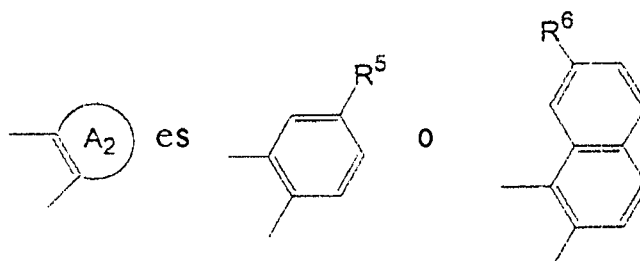
2. Equipo de reactivo según la reivindicación 1, en donde el tinte fluorescente es al menos un tinte seleccionado del grupo que consiste de un tinte fluorescente que tiene la fórmula general (I):



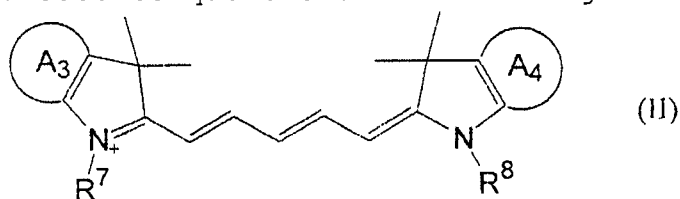
en donde: R^1 y R^2 son, los mismos o diferentes entre sí, un grupo alquilo;



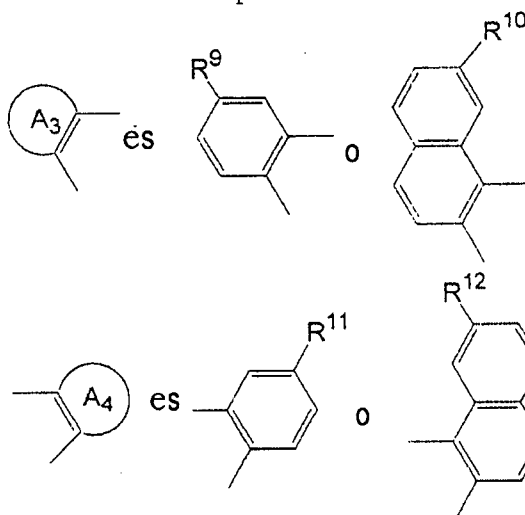
81



5 R^3 , R^4 , R^5 y R^6 son, los mismos o diferentes entre sí, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo; y X^- es un anión; y un tinte fluorescente que tiene la fórmula general (II):



10 en donde: R^7 y R^8 son, los mismos o diferentes entre sí, un grupo alquilo que contiene opcionalmente un grupo ácido;



15 y R^9 , R^{10} , R^{11} y R^{12} son, los mismos o diferentes entre sí, un átomo de hidrógeno o un grupo ácido, con la condición que cualquiera de R^7 a R^{12} sea/tenga un grupo ácido; y el grupo ácido que puede presentarse en R^7 a R^{12} puede formar una sal,

20 con la condición que cualquiera de los grupos ácidos que

25

pueda presentarse en R^7 a R^{12} es un grupo del cual se ha liberado un protón.

3. Equipo de reactivo según la reivindicación 2, en donde el grupo ácido que pueda presentarse en R^7 a R^{12} en la fórmula general (II) es un grupo sulfónico.

4. Equipo de reactivo según la reivindicación 2 ó 3, en donde el grupo ácido que forma la sal que puede presentarse en R^7 a R^{12} en la fórmula general (II) es un grupo de una sal de metal alcalino.

5. Equipo de reactivo según la reivindicación 1, en donde el agente tensioactivo catiónico es un tipo de una sal de amonio cuaternario o una sal de piridinio.

6. Equipo de reactivo según la reivindicación 1, en donde el agente tensioactivo no iónico es al menos uno seleccionado del grupo que consiste de un polioxietilen-alquil-éter, un polioxietilen-polioxipropilen-alquil-éter, un aceite de ricino polioxietilenado, un aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado, un esteroide polioxietilenado y un esteroide hidrogenado polioxietilenado.

7. Equipo de reactivo según la reivindicación 1, en donde el ácido carboxílico aromático es al menos uno seleccionado del grupo que consiste de ácido salicílico, ácido ftálico, ácido benzoico, ácido hidroxibenzoico, ácido aminobenzoico y una sal del mismo.

8. Equipo de reactivo según la reivindicación 1,

en donde el pH del primer reactivo es un ácido.

9. Equipo de reactivo según la reivindicación 1, en donde el primer reactivo comprende un agente amortiguador que tiene una pKa en el intervalo de pH 2.0 a 4.5.

5 10. Equipo de reactivo según la reivindicación 9, en donde el agente amortiguador es al menos uno seleccionado del grupo que consiste de ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido diglicólico, ácido malónico y ácido succínico.

10 11. Método para analizar una muestra que comprende los siguientes pasos: lisar eritrocitos en la muestra y dañar la membrana celular de células sanguíneas de modo que pueda permear a través de las mismas un tinte fluorescente, en virtud del primer reactivo de acuerdo a la reivindicación
15 1, y teñir las células dañadas en virtud del segundo reactivo de acuerdo a la reivindicación 1; aplicar luz a las células teñidas para obtener información de la luz dispersada e información fluorescente, y clasificar y contar los basófilos y/o eritrocitos nucleados en la muestra en
20 base a la información de luz dispersada y la información fluorescente.

 12. Método según la reivindicación 11, en donde la información de luz dispersada es información de luz dispersada directa, y los eritrocitos nucleados en la
25 muestra se cuentan en base a la información de luz

dispersada directa y la información fluorescente en el paso de clasificación y conteo.

5 13. Método según la reivindicación 11 ó 12, en donde la información de luz dispersada es información de luz dispersada directa, y los basófilos en la muestra se cuentan en base a la información de luz dispersada directa y la información fluorescente en el paso de clasificación y conteo.

10 14. Método según la reivindicación 11, en donde la información de luz dispersada es información de luz dispersada directa e información de luz dispersada lateral, y los basófilos en la muestra se cuentan en base a la información de luz dispersada directa y la información de luz dispersada lateral en el paso de clasificación y conteo.

15 15. Método según la reivindicación 11, en donde los leucocitos en la muestra se clasifican adicionalmente y se cuentan en base a la información de luz dispersada y la información fluorescente en el paso de clasificación y conteo.

20 16. Método según la reivindicación 15, en donde la información de luz dispersada es información de luz dispersada directa, y los leucocitos en la muestra se clasifican y cuentan en base a la información de luz dispersada directa y la información fluorescente en el paso
25 de clasificación y conteo.

17. Equipo de reactivos para analizar una muestra para medir leucocitos y eritrocitos nucleados en la muestra, que comprende: un primer reactivo que contiene un agente tensioactivo catiónico, un agente tensioactivo no iónico y un ácido carboxílico aromático, que puede lisar eritrocitos, y un segundo reactivo que contiene un tinte fluorescente capaz de teñir ácido nucleico, en donde los leucocitos y los eritrocitos nucleados se pueden diferenciar en base a la información fluorescente obtenida de la muestra tratada con el primero y segundo reactivos.

18. Equipo de reactivos para analizar una muestra para medir basófilos y leucocitos diferentes de basófilos en la muestra, que comprende: un primer reactivo que contiene un agente tensioactivo catiónico, un agente tensioactivo no iónico y un ácido carboxílico aromático, que puede lisar eritrocitos, y un segundo reactivo que contiene un tinte fluorescente capaz de teñir ácido nucleico, en donde los basófilos y los leucocitos diferentes de los basófilos se pueden diferenciar en base a la información de luz dispersada obtenida de la muestra tratada con el primero y segundo reactivos.

19. Equipo de reactivos para analizar una muestra para medir basófilos, leucocitos diferentes de basófilos, eritrocitos nucleados y leucocitos en la muestra, que comprende: un primer reactivo que contiene un agente

tensioactivo catiónico, un agente tensioactivo no iónico y un ácido carboxílico aromático, que puede lisar eritrocitos, y un segundo reactivo que contiene un tinte fluorescente capaz de teñir ácido nucleico, en donde los basófilos, los leucocitos diferentes de los basófilos, los eritrocitos nucleados y los leucocitos, se pueden diferenciar en base a la información fluorescente y a la información de luz dispersada obtenida de la muestra tratada con el primero y segundo reactivos.

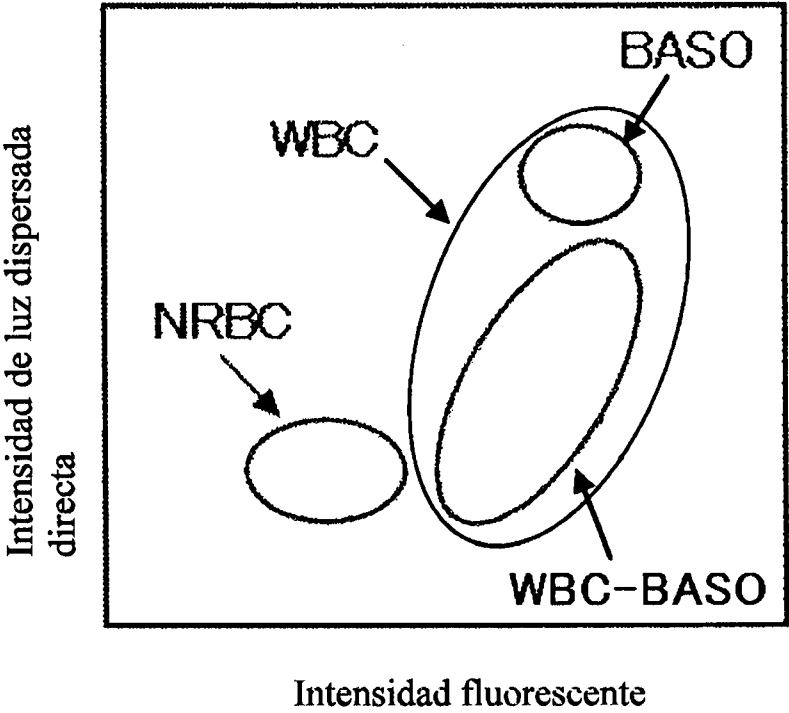
10

15

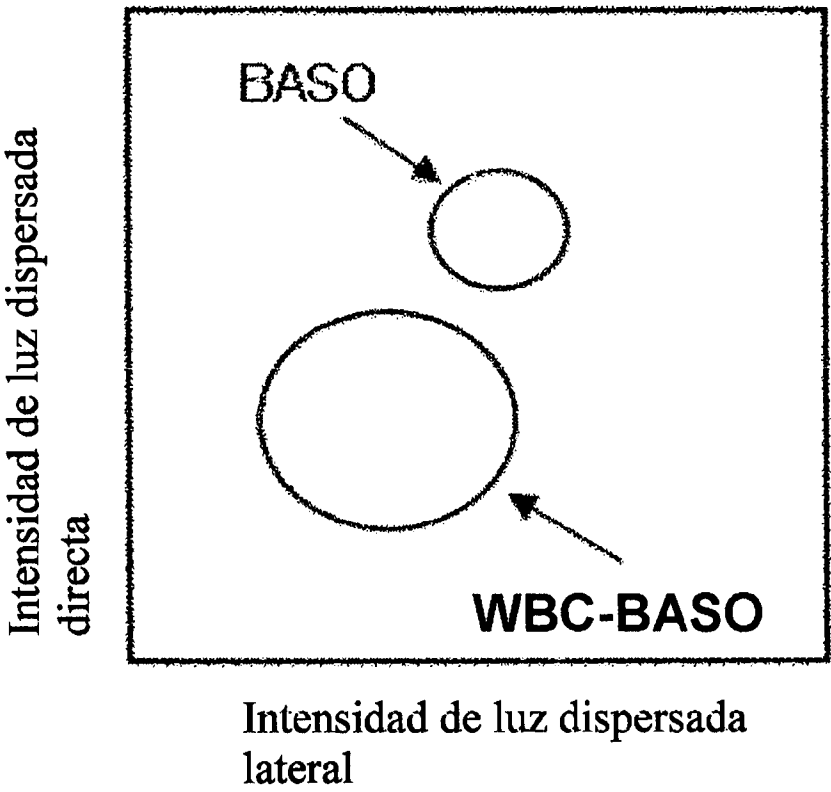
20

25

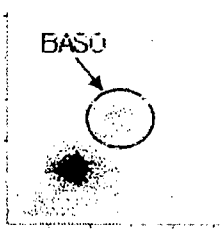
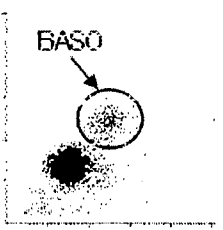
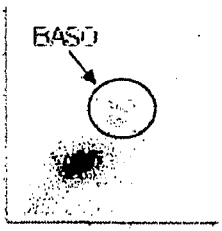
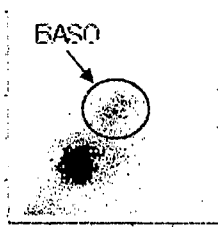
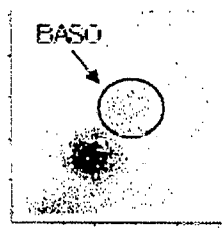
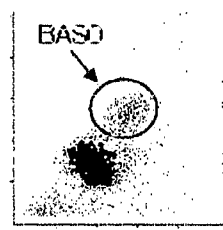
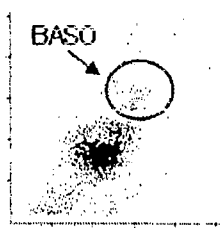
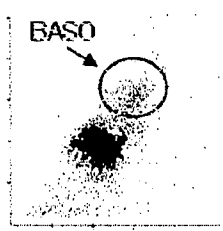
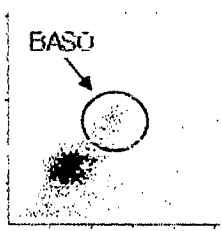
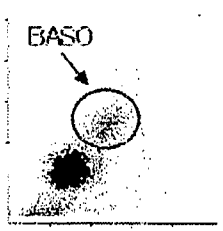
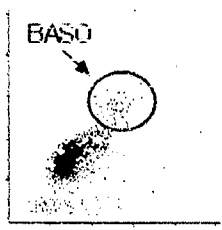
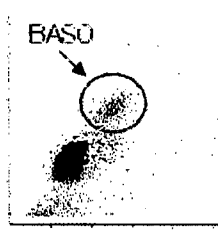
[Fig. 1]



[Fig. 2]

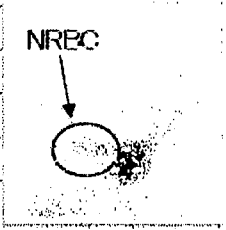
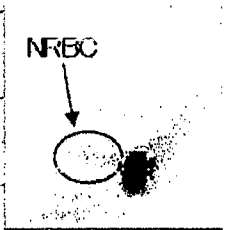
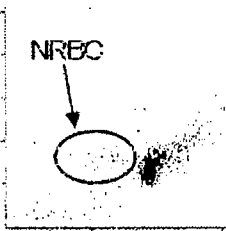
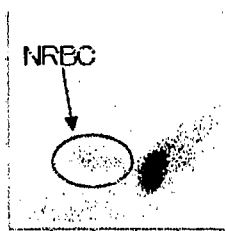
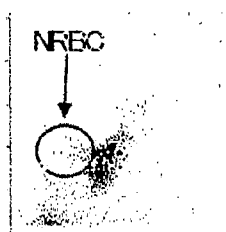
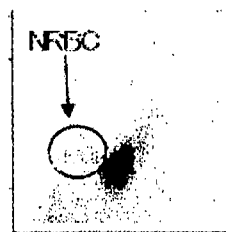
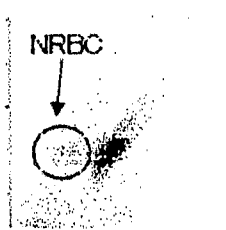
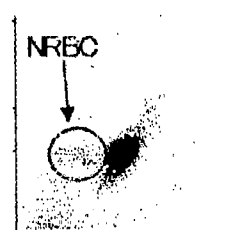
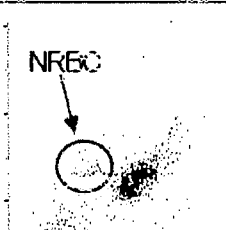
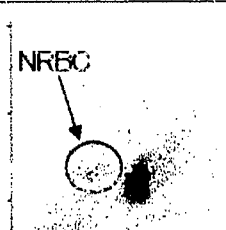
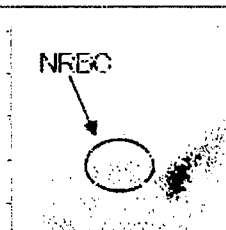
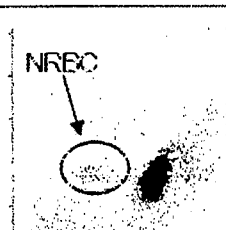


[Fig. 3]

	Muestra 1 de BASO (8 horas después de recolección de sangre)	Muestra 2 de BASO (8 horas después de recolección de sangre)
Primer reactivo A Segundo reactivo		
Primer reactivo B Segundo reactivo		
Primer reactivo C Segundo reactivo		
Primer reactivo D Segundo reactivo		
Primer reactivo E Segundo reactivo		
Primer reactivo F Segundo reactivo		

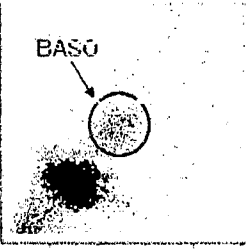
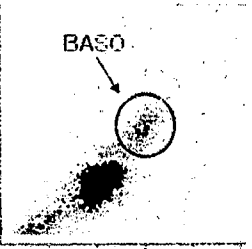
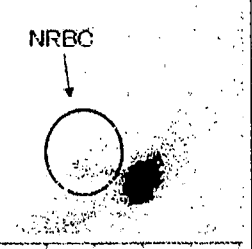
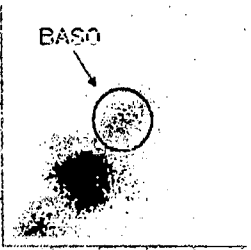
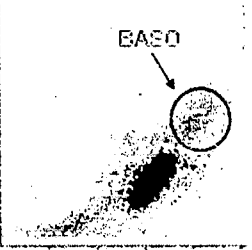
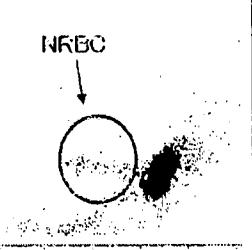
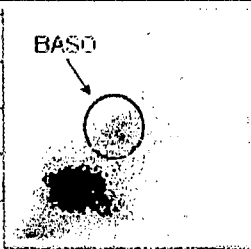
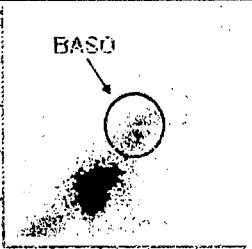
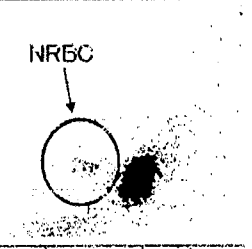
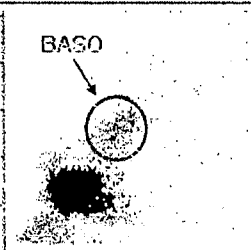
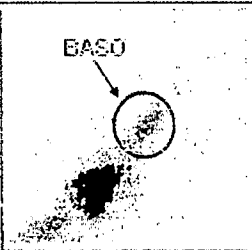
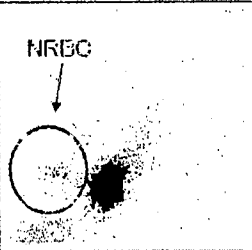
107

[Fig. 4]

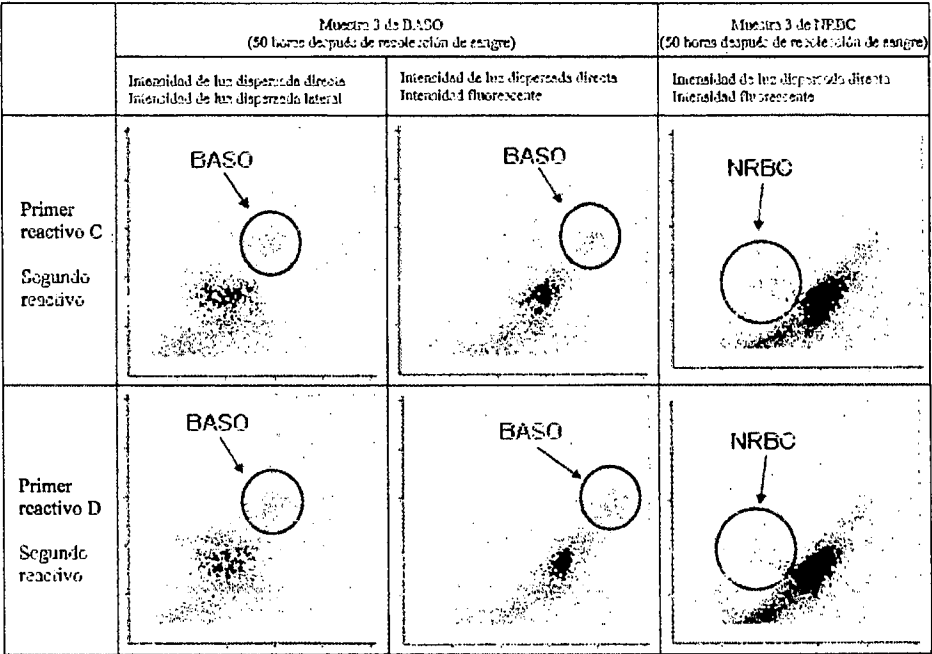
	Muestra 1 de NRBC (8 horas después de recolección de sangre)	Muestra 2 de NRBC (8 horas después de recolección de sangre)
Primer reactivo A Segundo reactivo		
Primer reactivo B Segundo reactivo		
Primer reactivo C Segundo reactivo		
Primer reactivo D Segundo reactivo		
Primer reactivo E Segundo reactivo		
Primer reactivo F Segundo reactivo		

AOB

[Fig. 5]

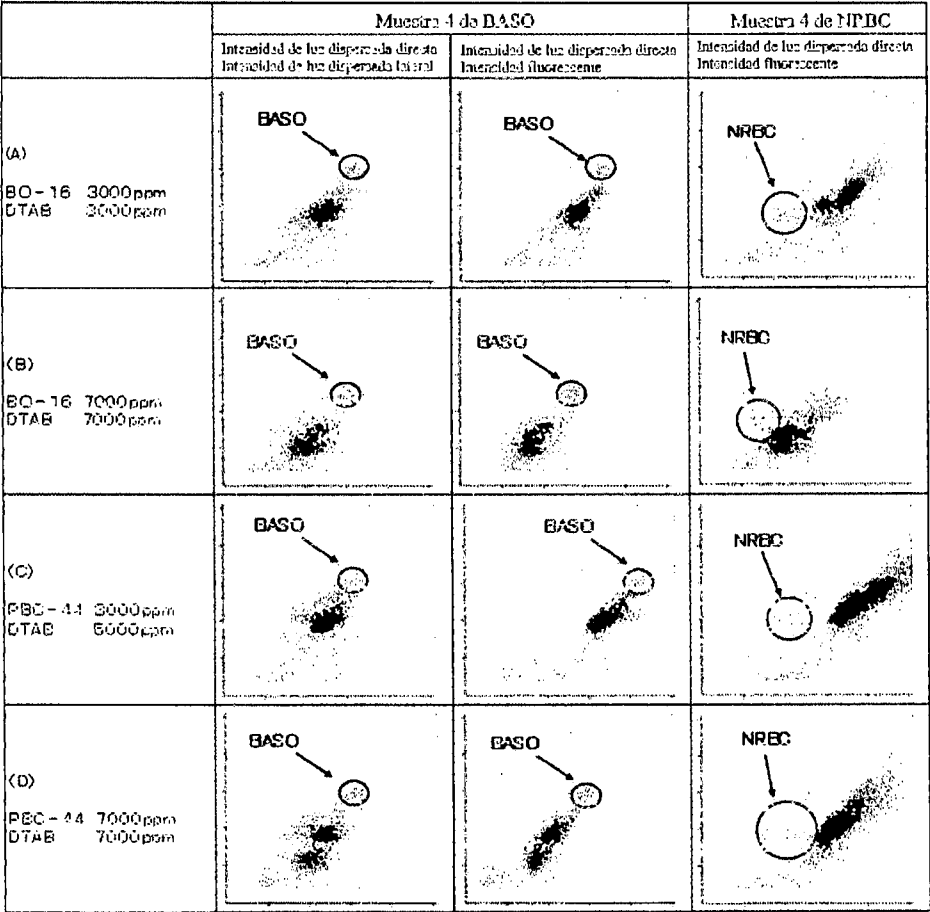
	Muestra 2 de BASO (50 horas después de recolección de sangre)		Muestra 2 de NRBC (50 horas después de recolección de sangre)
	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad de luz dispersada lateral	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad fluorescente	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad fluorescente
Primer reactivo A Segundo reactivo			
Primer reactivo B Segundo reactivo			
Primer reactivo E Segundo reactivo			
Primer reactivo F Segundo reactivo			

[Fig. 6]



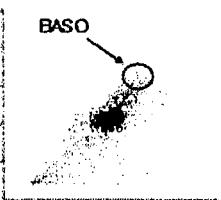
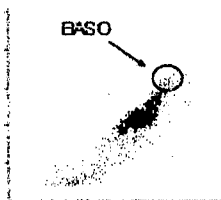
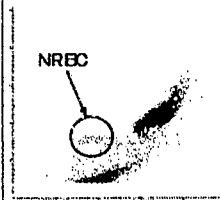
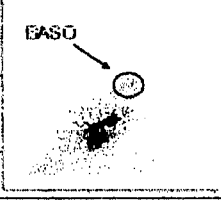
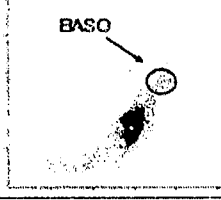
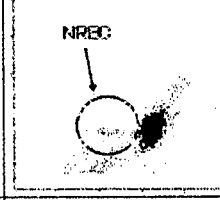
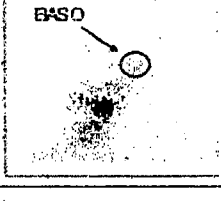
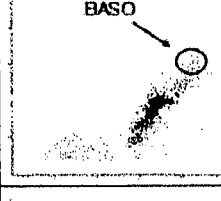
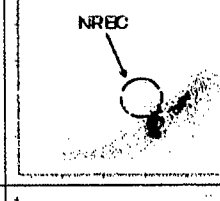
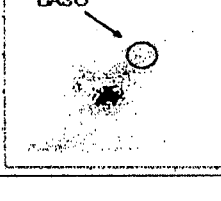
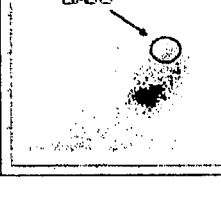
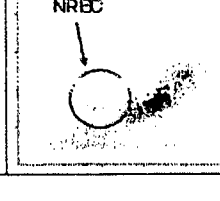
110

[Fig. 7]

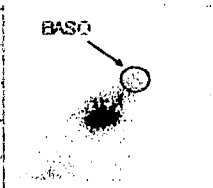
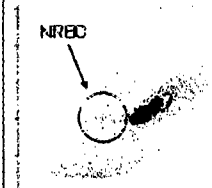
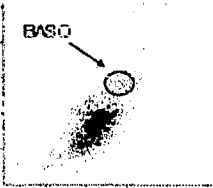
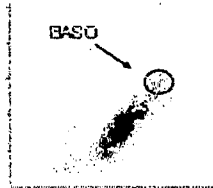
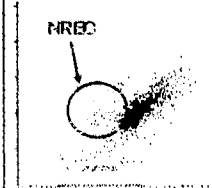
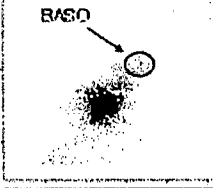
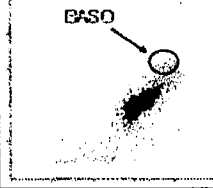
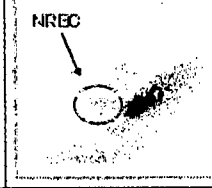
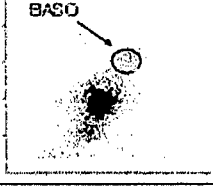
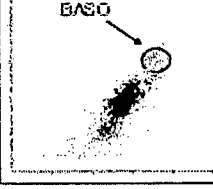


AAA

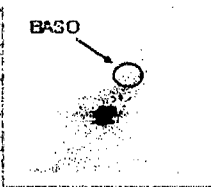
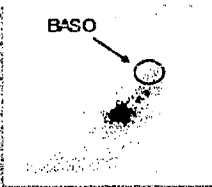
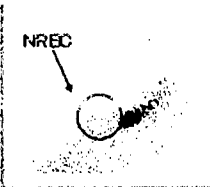
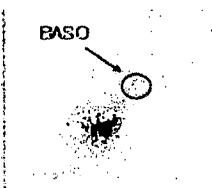
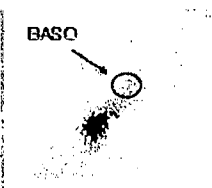
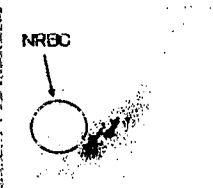
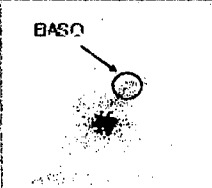
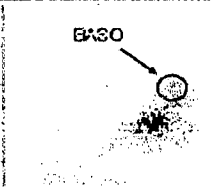
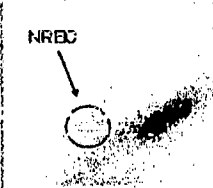
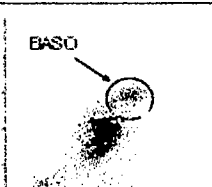
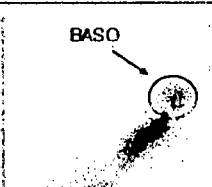
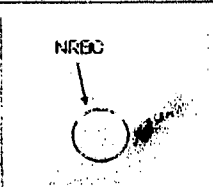
[Fig. 8]

	Muestra 4 de BASO		Muestra 4 de NPBC
	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad de luz dispersada lateral	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad fluorescente	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad fluorescente
(E) BC-20TX 2000 ppm DTAB 3000 ppm			
(F) BC-20TX 2000 ppm DTAB 5000 ppm			
(G) BPSH-25 3000 ppm DTAB 7000 ppm			
(H) BPSH-25 7000 ppm DTAB 7000 ppm			

[Fig. 9]

	Muestra 4 de BASO		Muestra 4 de NRBC
	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad de luz dispersada lateral	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad fluorescente	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad fluorescente
(D) HCO-50 5000ppm DTAB 5000ppm			
(J) HCO-50 7000ppm DTAB 7000ppm			
(K) HCO-20 3000ppm DTAB 5000ppm			
(L) HCO-20 7000ppm DTAB 7000ppm			

[Fig. 10]

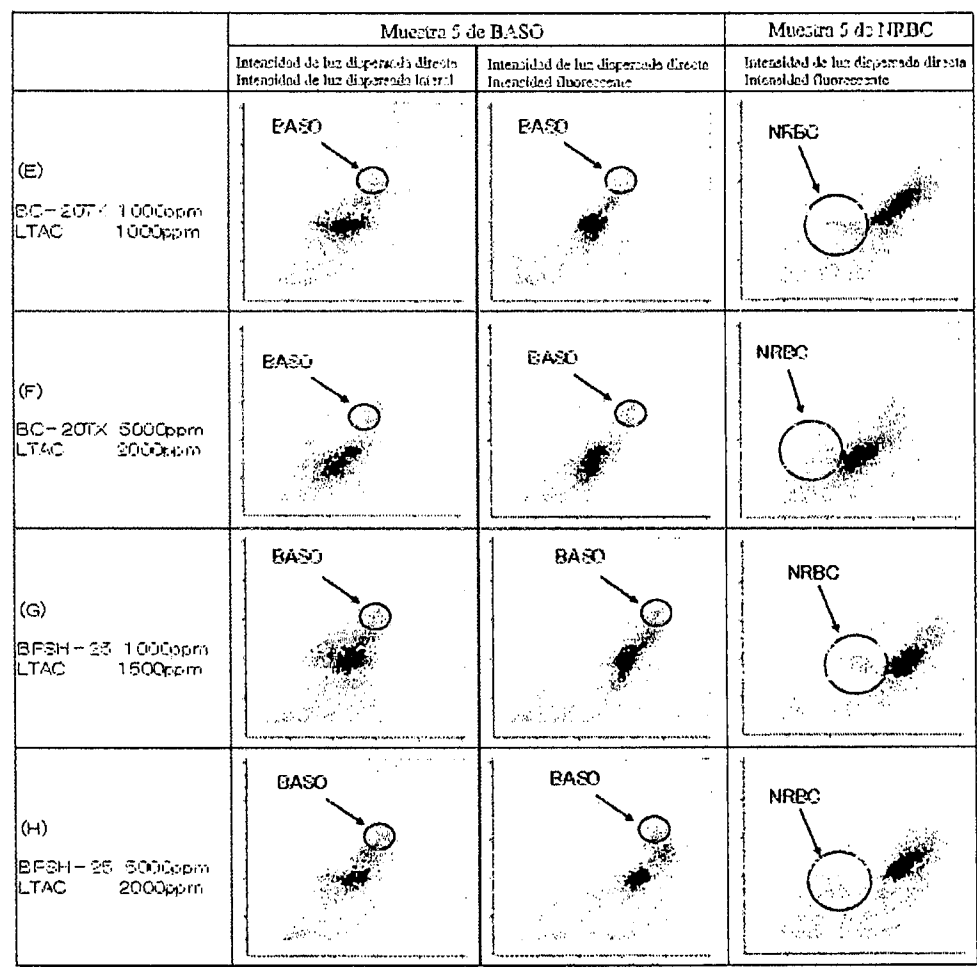
	Muestra 4 de BASO		Muestra 4 de NRBC
	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad de luz dispersada lateral	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad fluorescente	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad fluorescente
(M) CO-20TX 3000ppm DTAB 5000ppm			
(N) CO-20TX 7000ppm DTAB 7000ppm			
(O) PEN-1630 3000ppm DTAB 5000ppm			
(P) PEN-1630 5000ppm DTAB 7000ppm			

[Fig. 11]

	Muestra 5 de BASO		Muestra 5 de NRBC	
	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad de luz dispersada lateral	BASO BASO	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad fluorescente	NRBC NRBC
(A) BO-16 1000ppm LTAC 1000ppm				
(B) BO-16 5000ppm LTAC 2000ppm				
(C) PBC-44 1000ppm LTAC 1000ppm				
(D) PBC-44 5000ppm LTAC 2000ppm				

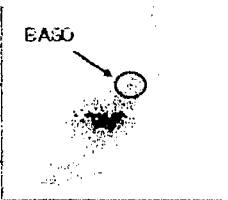
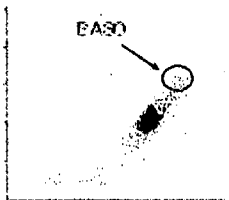
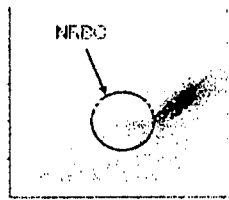
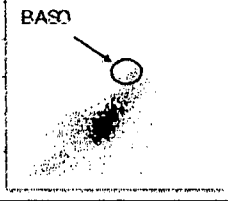
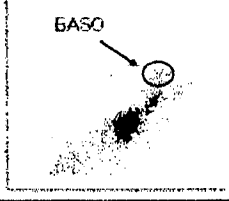
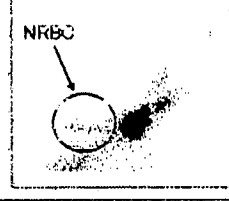
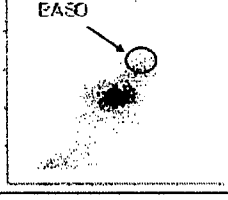
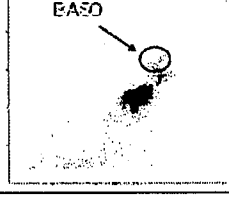
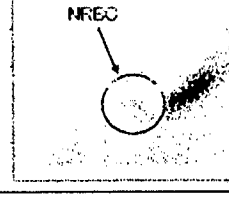
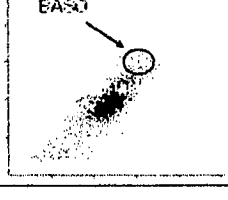
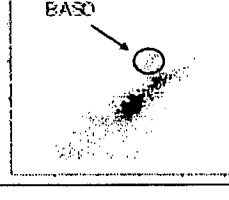
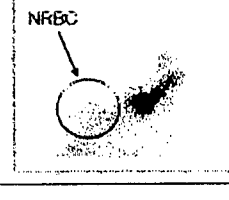
MS

[Fig. 12]

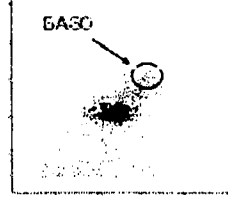
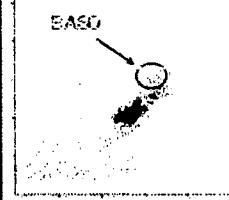
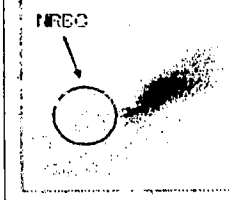
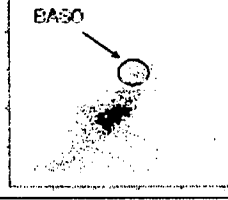
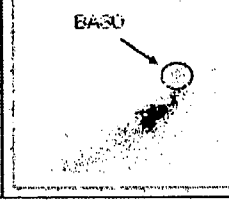
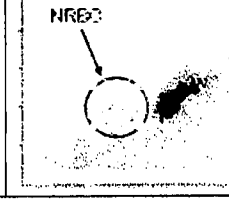


AAB

[Fig. 13]

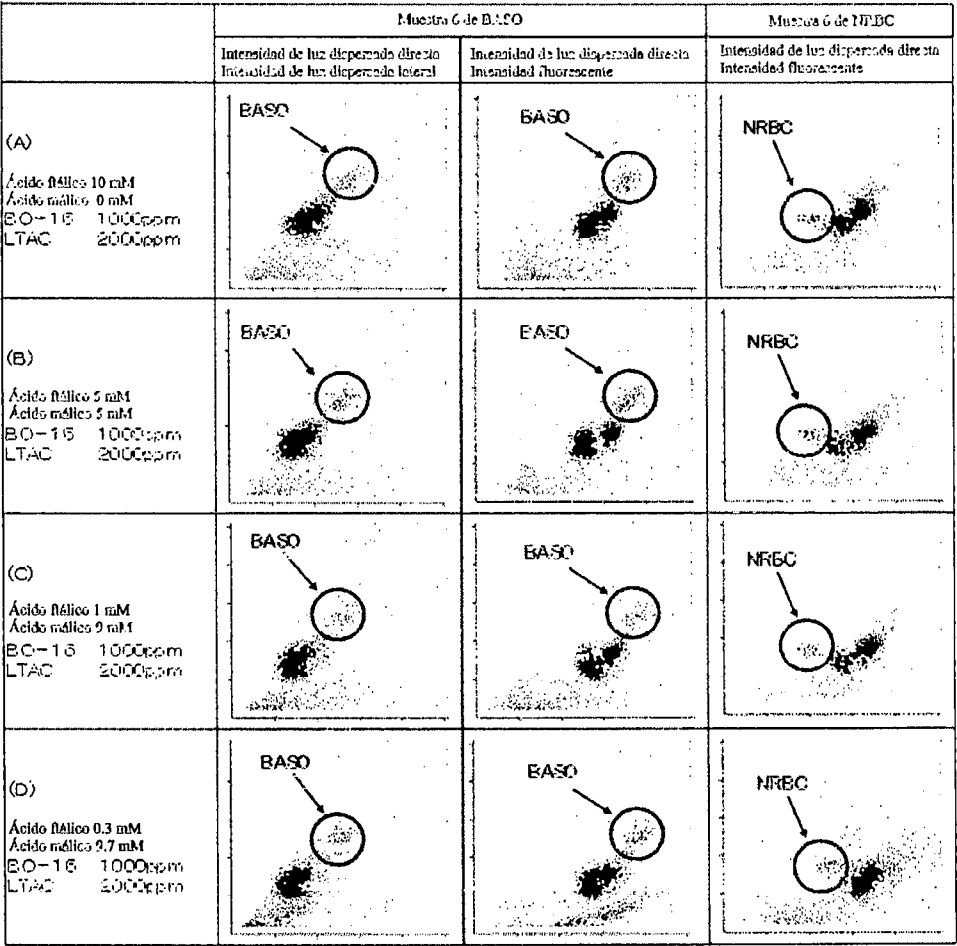
	Muestra 5 de BASO		Muestra 5 de NRBC
	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad de luz dispersada lateral	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad fluorescente	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad fluorescente
(I) HCO-30 1000ppm LTAC 1000ppm			
(J) HCO-30 7000ppm LTAC 2000ppm			
(K) HCO-20 1000ppm LTAC 1000ppm			
(L) HCO-20 7000ppm LTAC 2000ppm			

[Fig. 14]

	Muestra 5 de NRBC		Muestra 5 de NPBC
	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad de luz dispersada lateral	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad fluorescente	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad fluorescente
(M) PEN-4630 1000ppm LTAC 1000ppm			
(N) PEN-4630 5000ppm LTAC 1500ppm			

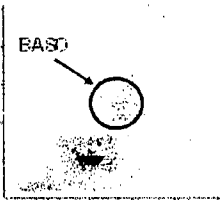
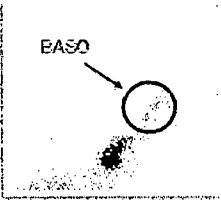
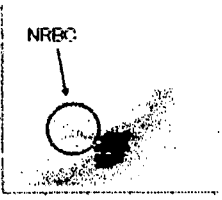
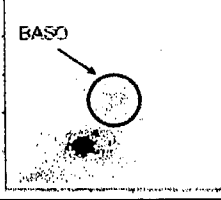
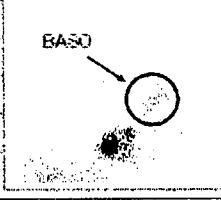
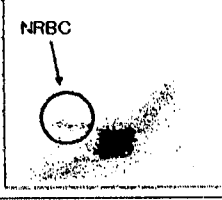
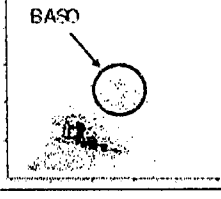
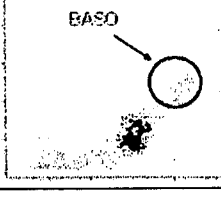
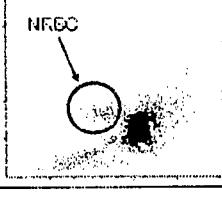
MA

[Fig. 15]

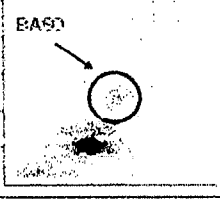
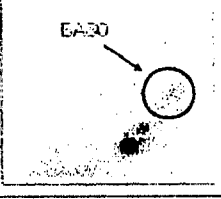
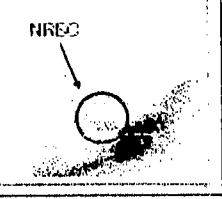
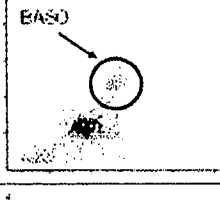
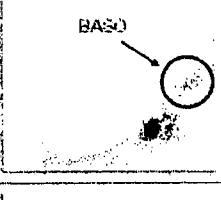
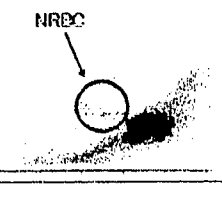
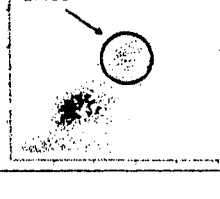
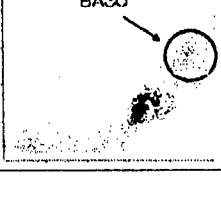
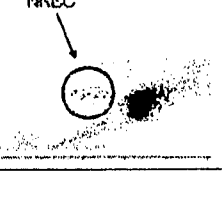


118

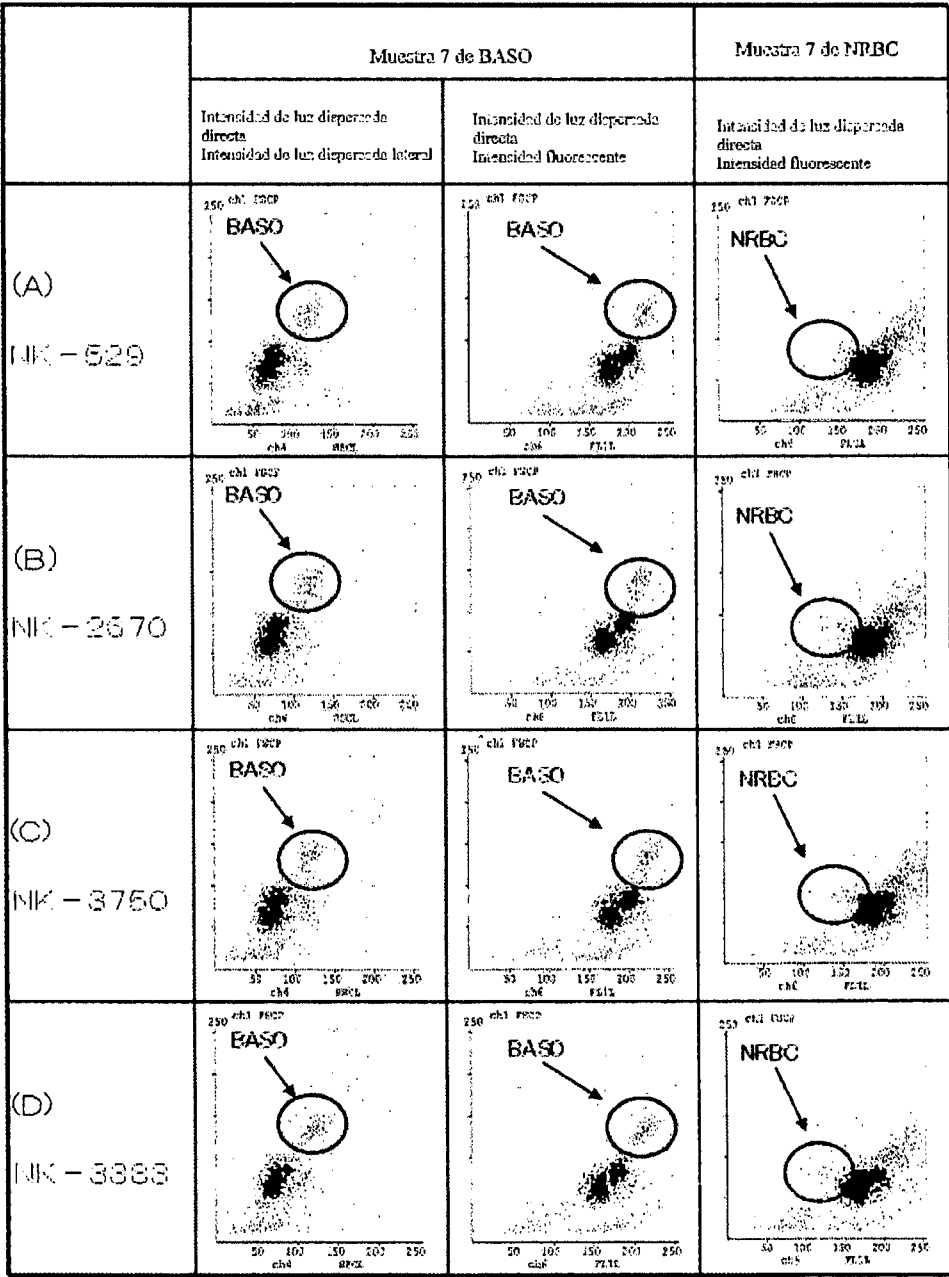
[Fig. 16]

	Muestra 6 de BASO		Muestra 6 de NRBC
	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad de luz dispersada lateral	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad fluorescente	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad fluorescente
(E) Ácido salicílico 5 mM Ácido málico 5 mM PBC-44 1000ppm LTAC 1500ppm			
(F) Ácido salicílico 1 mM Ácido málico 9 mM PBC-44 1000ppm LTAC 1500ppm			
(G) Ácido salicílico 0.22 mM Ácido málico 10 mM PBC-44 1000ppm LTAC 1500ppm			

[Fig. 17]

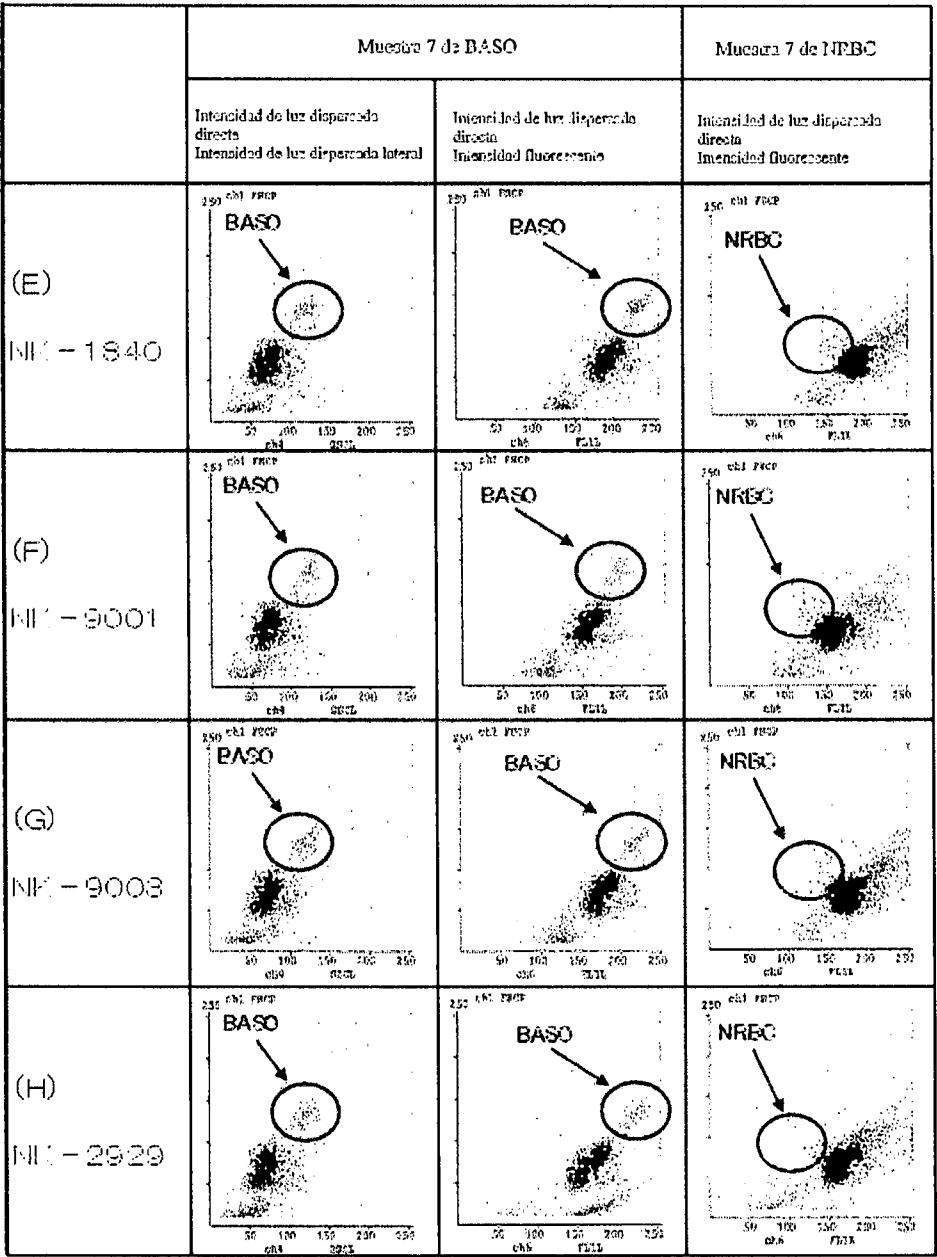
	Muestra 6 de BASO		Muestra 6 de NRBC
	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad de luz dispersada lateral	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad fluorescente	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad fluorescente
(H) Ácido salicílico 5 mM Ácido málico 5 mM BO-16 1000ppm LTAC 2000ppm			
(I) Ácido salicílico 1 mM Ácido málico 9 mM BO-16 1000ppm LTAC 2000ppm			
(J) Ácido salicílico 0.24 mM Ácido málico 10 mM BO-16 1000ppm LTAC 2000ppm			

[Fig. 18]

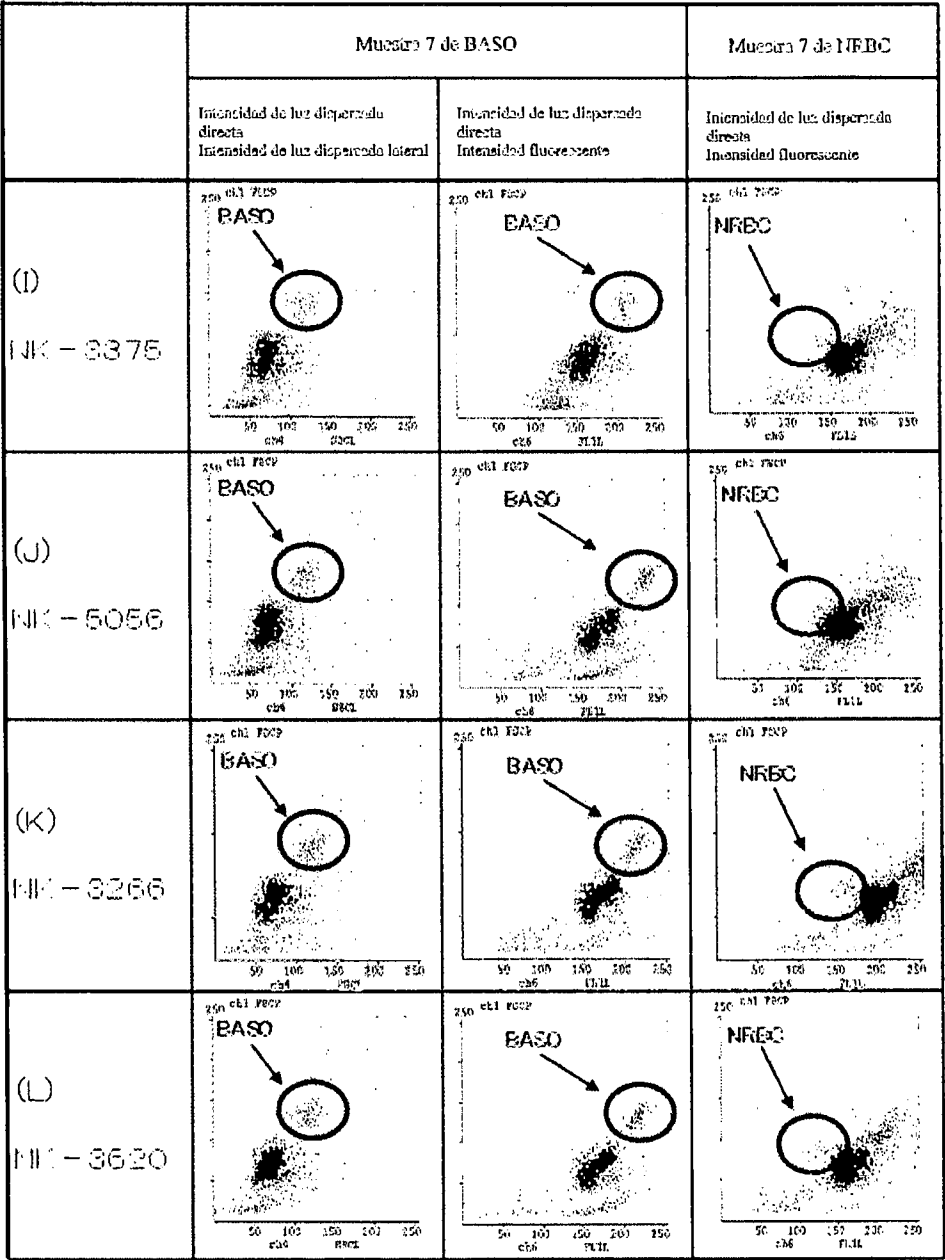


MD

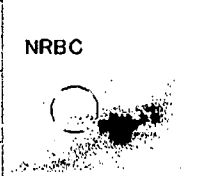
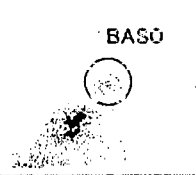
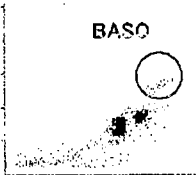
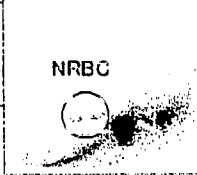
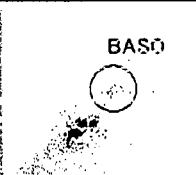
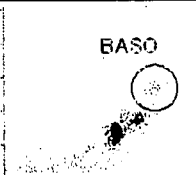
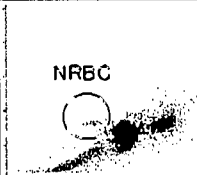
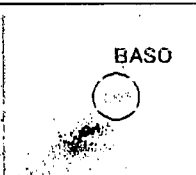
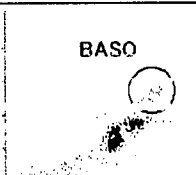
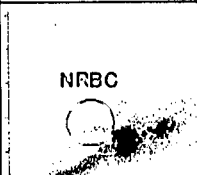
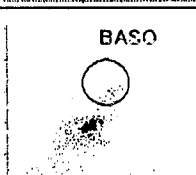
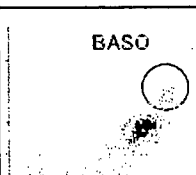
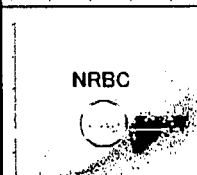
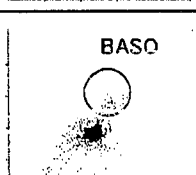
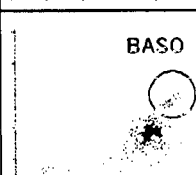
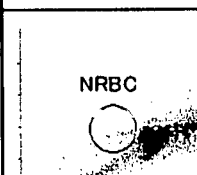
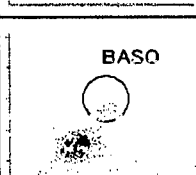
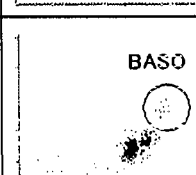
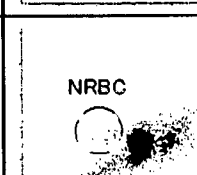
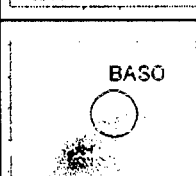
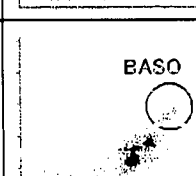
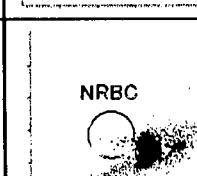
[Fig. 19]



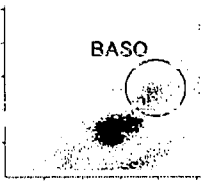
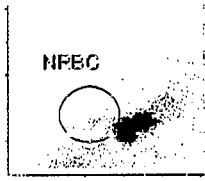
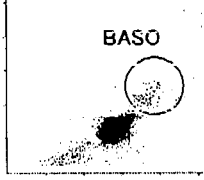
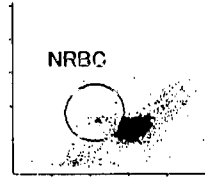
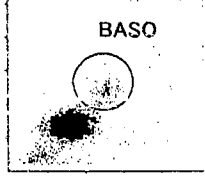
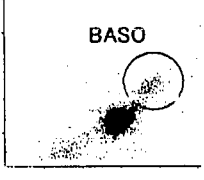
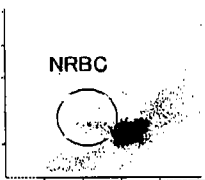
[Fig. 20]



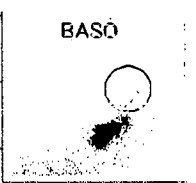
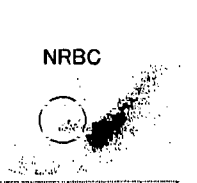
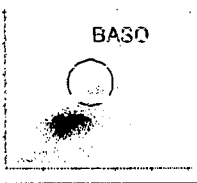
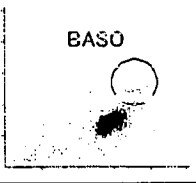
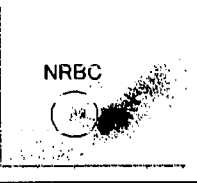
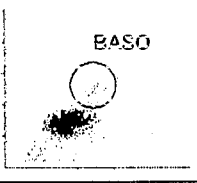
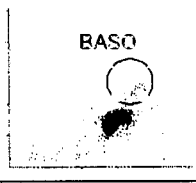
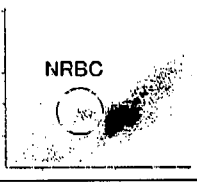
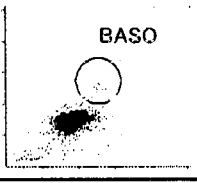
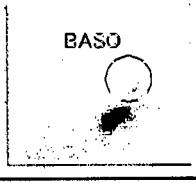
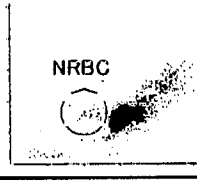
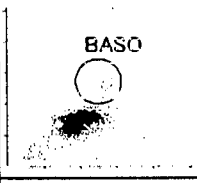
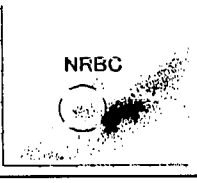
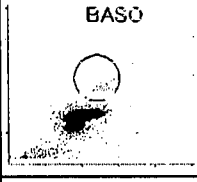
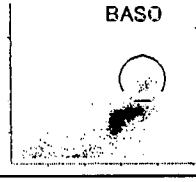
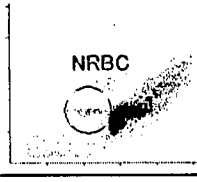
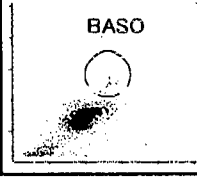
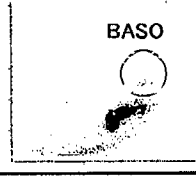
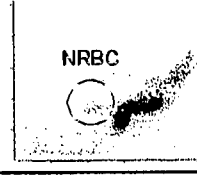
[Fig. 21]

Ácido carboxílico aromático	Muestra 2 de BASO		Muestra 2 de NRBC
	Intensidad de luz dispersada directa	Intensidad de luz dispersada directa	Intensidad de luz dispersada directa
	Intensidad de luz dispersada lateral	Intensidad Quorescente	Intensidad Quorescente
Ref. Ftalato ácido de potasio 2mM Ácido DL-Málico 10 mM			
(A) Benzoato de potasio 2 mM Ácido DL-Málico 8 mM			
(B) Benzoato de potasio 3 mM Ácido DL-Málico 7 mM			
(C) Benzoato de potasio 4 mM Ácido DL-Málico 6 mM			
(D) 4-hidroxibenzoato de sodio 7 mM Ácido DL-Málico 3 mM			
(E) 4-hidroxibenzoato de sodio 8 mM Ácido DL-Málico 2 mM			
(F) 3-hidroxibenzoato de sodio 4 mM Ácido DL-Málico 6 mM			
(G) 3-hidroxibenzoato de sodio 5 mM Ácido DL-Málico 5 mM			

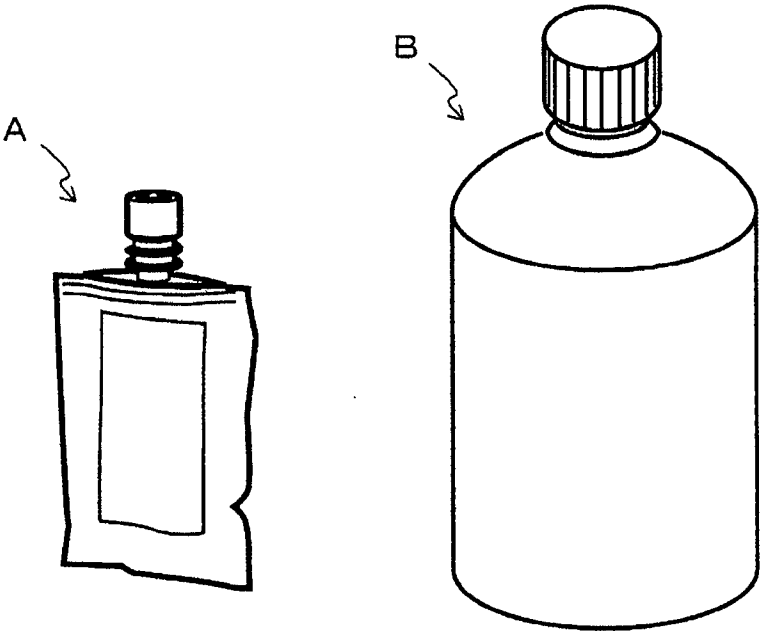
[Fig. 22]

	Muestra 9 de BASO		Muestra 9 de NRBC
Ácido carboxílico promélico	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad de luz dispersada lateral	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad fluorescente	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad fluorescente
Ref. Ftalato ácido de potasio 0.5 mM Ácido DL-Mélico 10 mM			
(H) Benzoato de potasio 1 mM Ácido DL-Mélico 9 mM			
(I) 4-aminobenzoato de potasio 2 mM Ácido DL-Mélico 8 mM			

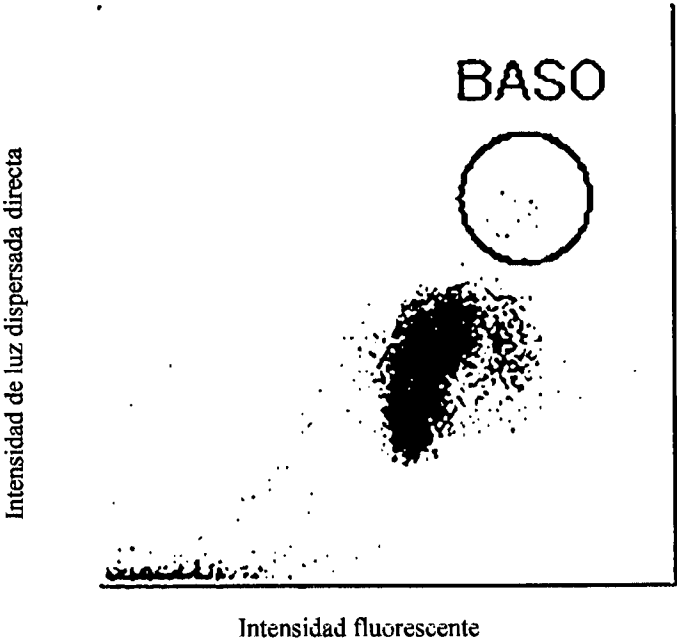
[Fig. 23]

Ácido carboxílico aromático	Muestra 10 de BASO		NRBC10
	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad de luz dispersada lateral	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad difractada	Intensidad de luz dispersada directa Intensidad difractada
(A) Ftalato ácido de potasio 2 mM Benzeno de potasio 0 mM			
(B) Ftalato ácido de potasio 1.5 mM Benzeno de potasio 0.5 mM			
(C) Ftalato ácido de potasio 1.33 mM Benzeno de potasio 0.66 mM			
(D) Ftalato ácido de potasio 1 mM Benzeno de potasio 1 mM			
(E) Ftalato ácido de potasio 0.66 mM Benzeno de potasio 1.33 mM			
(F) Ftalato ácido de potasio 0.5 mM Benzeno de potasio 1.5 mM			
(G) Ftalato ácido de potasio 0 mM Benzeno de potasio 2 mM			

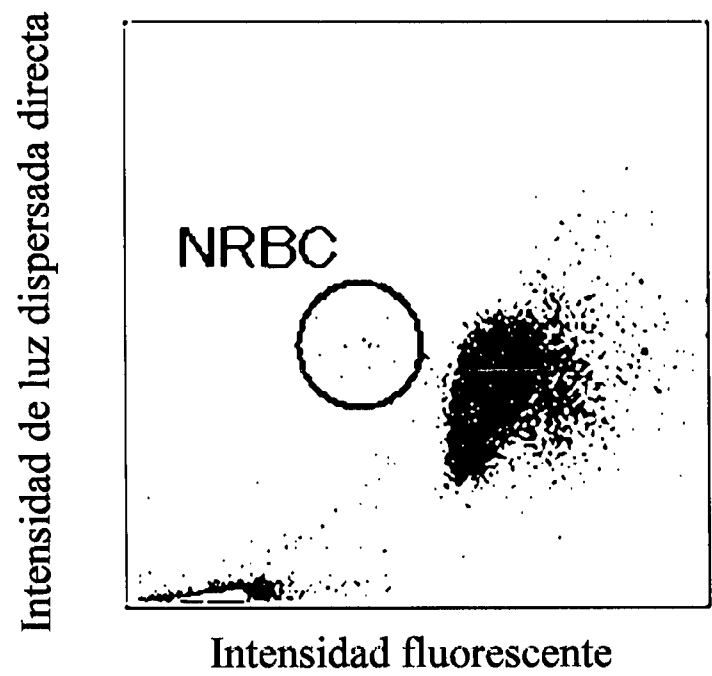
[Fig. 24]



[Fig. 25]

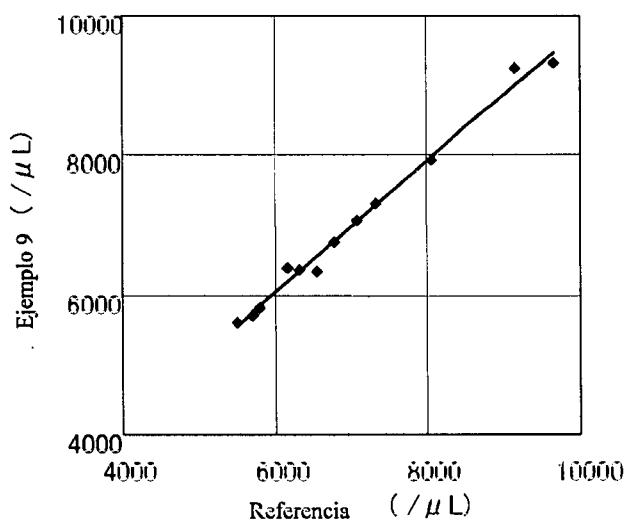


[Fig. 26]



[Fig. 27-1]

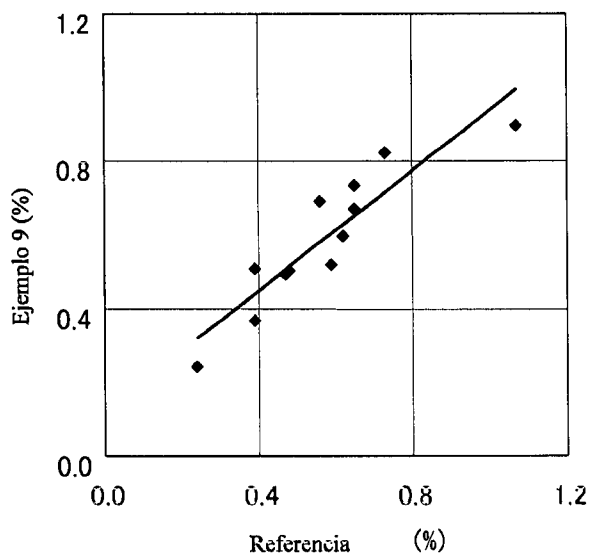
(A) Correlación de número de leucocitos totales



$y = 0.945x + 357$
 $r = 0.995$

(N = 12)

(B) Correlación de relación de basófilos



$y = 0.815x + 0.122$
 $R = 0.912$

(N = 12)

TRADUCCION OFICIAL No. 2010-03-02-106
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

Traspaso de la invención llamada **EQUIPO DE REACTIVOS PARA ANALISIS DE MUESTRA Y METODO DE ANALISIS DE MUESTRA**, documento escrito en inglés y en español.

APOSTILLA

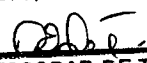
(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Japón
Este documento público
2. ha sido firmado por Rikio UDAGAWA
3. actuando como Notario Público de la Oficina de Asuntos Legales de Osaka
4. lleva el sello/estampilla de Rikio UDAGAWA, Notario Público

Certificado

- | | |
|---|---|
| 5. en Osaka | 6. el 10 de febrero de 2010 |
| 7. por el Ministerio de Asuntos Exteriores | |
| 8. No. 0774 | |
| 9. Sello/Estampilla
Ministerio de Asuntos
Exteriores de Japón | 10. Firma: (ilegible)
Naomi ASANO
Por el Ministerio de Asuntos Exteriores |

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA


ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

009199
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO
NO SE ASUME
JULCCG/2010/00000000

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.
2010 MAR -8 A 11:18
RELACIONES EXTERIORES
MINISTERIO DE

Registro No. 157 / 2010

CERTIFICADO NOTARIAL

Por el presente certifico que el señor Hisayuki ITO, representante del señor Tatsuya NARIKAWA, señor Tomohiro TSUJI, señor Keiko MORIYAMA, señor Yuji ITOSE, señor Shinichiro OGUNI, señor Ayumu YOSHIDA, señora Saori SUZUKI y señor Toshihiro MIZUKAMI han declarado en mi presencia que el señor Tatsuya NARIKAWA, señor Tomohiro TSUJI, señor Keiko MORIYAMA, señor Yuji ITOSE, señor Shinichiro OGUNI, señor Ayumu YOSHIDA, señora Saori SUZUKI y señor Toshihiro MIZUKAMI reconocieron haber firmado el documento adjunto.

Fechado este día 10 de febrero de 2010

(firma: ilegible)

RIKIO UDAGAWA

Notario

Oficina de Asuntos Legales de Osaka

1-2, Hirano-Machi, 2—Chome,

Chuo-ku, Osaka, Japón

Oficina de Asuntos Legales de Osaka
"NOTARIO,"
1-2, HIRANO-MACHI, 2-CHOME,
CHUO-KU, OSAKA, JAPON

RECEIVED
FEB 11 2010

2010 FEB -8 AM 11:18

RECEIVED
MINISTERIO DE

RECEIVED
FEB 11 2010

000100

RECEIVED
(JLLCCO:213711.DOC v.1)2

Registro No.

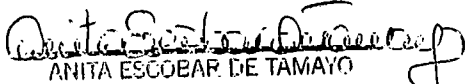
CERTIFICADO

Por el presente certifico que el Certificado Notarial adjunto al presente ha sido ejecutado por Notario, debidamente autorizado y ejerciendo en Osaka, Japón, y que el Sello Oficial que aparece en el mismo es auténtico.

Fecha 10 de febrero de 2010

Director de la Oficina de Asuntos Legales de Osaka

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 2 de marzo de 2010, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

ASSIGNMENT

The undersign,

1. Tatsuya NARIKAWA,
2. Tomohiro TSUJI,
3. Keiko MORIYAMA,
4. Yuji ITOSE,
5. Shinichiro OGUNI,
6. Ayumu YOSHIDA,
7. Saori SUZUKI, and
8. Toshihiro MIZUKAMI

domiciled in

c/o SYSMEX CORPORATION, 5-1,

Wakinohama-kaigandori 1-chome, Chuo-ku, Kobe-shi,
Hyogo 651-0073, Japan

hereby state under oath to be true joint inventors of

REAGENT KIT FOR SAMPLE ANALYSIS

AND SAMPLE ANALYSIS METHOD

State, as well that assign, without reservations or
limitation, in favor of

SYSMEX CORPORATION

A corporation organized and existing under the laws of
Japan

domiciled at

5-1, Wakinohama-kaigandori 1-chome,

Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo

651-0073, Japan

all rights inherent to said invention, and that the above
mentioned corporation hereby is enabled to apply, in
its name, for the corresponding patent in the Republic
of Colombia.

1. Tatsuya NARIKAWA *Tatsuya Narikawa*
2. Tomohiro TSUJI *Tomohiro Tsuji*
3. Keiko MORIYAMA *Keiko Moriyama*
4. Yuji ITOSE *Yuji Ito*
5. Shinichiro OGUNI *Shinichiro Oguni*
6. Ayumu YOSHIDA *Ayumu Yoshida*
7. Saori SUZUKI *Saori Suzuki*
8. Toshihiro MIZUKAMI *Toshihiro Mizukami*

TRASPASO

Los abajo firmados

1. Tatsuya NARIKAWA
 2. Tomohiro TSUJI
 3. Keiko MORIYAMA
 4. Yuji ITOSE
 5. Shinichiro OGUNI
 6. Ayumu YOSHIDA
 7. Saori SUZUKI y
 8. Toshihiro MIZUKAMI
- Domiciliado en

1.

c/o SYSMEX CORPORATION, 5-1,
Wakinohama-kaigandori 1-chome, Chuo-ku,
Kobe-shi, Hyogo 651-0073, Japón

declaramos bajo juramento ser únicos y verdaderos
inventor de

EQUIPO DE REACTIVOS PARA ANÁLISIS DE MUESTRA Y MÉTODO DE ANÁLISIS DE MUESTRA

Declaramos así mismo que cedemos y transferimos
sin reserva ni limitación, a favor de

SYSMEX CORPORATION

Una sociedad organizada y existente de conformidad
con las leyes de

Japón

domiciliada en

5-1, Wakinohama-kaigandori 1-chome,
Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo
651-0073, Japón

todos los derechos inherentes a dicha invención y que
la citada sociedad queda facultada para solicitar en su
nombre la patente correspondiente en la República de
Colombia



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: **JAPAN**

This public document

2. has been signed by

Rikio UDAGAWA

3. acting in the capacity of

Notary Public of the Osaka
Legal Affairs Bureau

4. bears the seal/stamp of

Rikio UDAGAWA, Notary Public

Certified

5. at **Osaka**

6. **FEB. 10, 2010**

7. by the **Ministry of Foreign Affairs**

8. No. **0774**

9. Seal/stamp:



10. Signature:

Naomi ASANO

For the Minister for Foreign Affairs

登簿平成 22 年第 157 号

嘱託人 成川 隆也、辻 智裕、森山 啓子、糸瀬 裕

司、小國 振一郎、吉田 歩、鈴木 佐緒里、及び、

水上 利洋 は、代理人 井東 久幸 によって、当

証人の面前でこの証書の 署名 を自認した。

よってこれを認証する。 _____

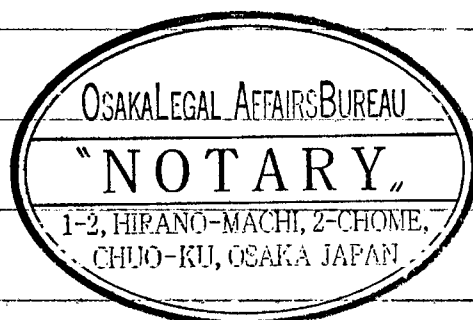
平成 22 年 2 月 10 日当公証人役場において

大阪府中央区平野町 2 丁目 1 番 2 号 (沢の鶴ビル内)

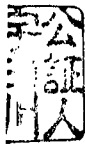
大阪法務局所属

公証人

宇田川力雄



大阪法務局所属 公証人役場



Registered No. 157 -2010

NOTARIAL CERTIFICATE

This is to certify that Mr. Hisayuki ITO an agent of Mr. Tatsuya NARIKAWA, Mr. Tomohiro TSUJI, Ms. Keiko MORIYAMA, Mr. Yuji ITOSE, Mr. Shinichiro OGUNI, Mr. Ayumu YOSHIDA, Ms. Saori SUZUKI and Mr. Toshihiro MIZUKAMI has stated in my very presence that said Mr. Tatsuya NARIKAWA, Mr. Tomohiro TSUJI, Ms. Keiko MORIYAMA, Mr. Yuji ITOSE, Mr. Shinichiro OGUNI, Mr. Ayumu YOSHIDA, Ms. Saori SUZUKI and Mr. Toshihiro MIZUKAMI acknowledged themselves to have signed to the attached document.

Dated this 10th day of February, 2010

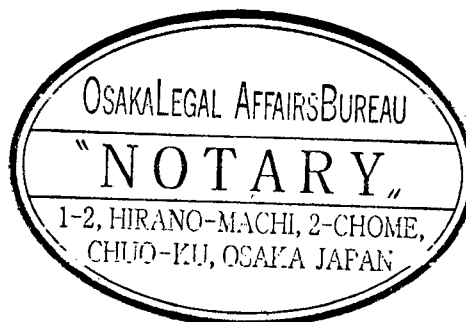
Rikio Udagawa



RIKIO UDAGAWA

Notary

Osaka Legal Affairs Bureau
1-2, Hirano-Machi, 2-Chome,
Chuo-ku, Osaka, Japan





第 616 号

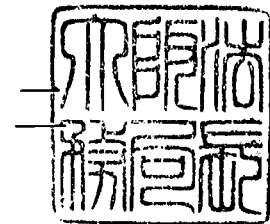


証 明

この認証の付与は、在職中の公証人が
その権限に基づいてしたものであり、
かつ、その押印は、真実のものであること
を証明する。

平成22年2月10日
平成 年 月 日

大阪法務局長 白石 研



Registration No.

CERTIFICATE

This is to certify that the annexed Notarial Certificate has
been executed by Notary, duly authorized and practising in Osaka,
Japan, and that the Official seal appearing on the same is genuine.

Date FEB. 10. 2010

Director of the Osaka Legal Affairs Bureau

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-027823- -00000-0000

Fecha: 2010-03-09 16:49:22 Exp. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Lvs 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 136

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐	

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

1 ☒	Indicación que se solicita una PCT
19 ☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
105 ☒	Dibujos de ser estos pertinentes
213 ☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒ Incompleta ☐	

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño Industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
SYSMEX CORPORATION

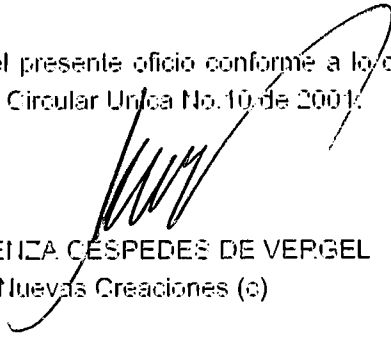
REFERENCIA	Radicación No.	10 027823
	Solicitud internacional	PCT/JP2008/067507
	Fecha inicio fase nacional	27/04/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	NO 06620

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALICIA CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 21 MAYO 2010
adpa11



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C.,
2020

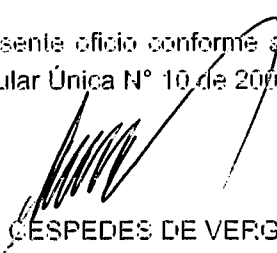
Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
SYSMEH CORPORATION

REFERENCIA	Radicación No.	10 027823
	Solicitud internacional	PCT/JP2008/067507
	Fecha inicio fase nacional	27/04/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	<u>N 06621</u>

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALICIA CARMENZA GESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha **21 MAYO 2010**
adpa11