

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 012**

51 Int. Cl.:

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/483 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2009 E 09711933 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 2273264**

54 Título: **Reactivo para la medición de plaquetas, kit de reactivos para la medición de plaquetas, y método de medición de plaquetas**

30 Prioridad:

18.02.2008 JP 2008036013

26.03.2008 JP 2008079785

26.09.2008 JP 2008247484

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.05.2015

73 Titular/es:

**SYSMEX CORPORATION (100.0%)
5-1, Wakinohama-Kaigandori 1-chome Chuo-ku
Kobe-shi, Hyogo 651-0073, JP**

72 Inventor/es:

**SUZUKI, YUHGI;
MORIYAMA, KEIKO;
MORI, YUSUKE y
TAKESHITA, HIROKI**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 535 012 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Reactivo para la medición de plaquetas, kit de reactivos para la medición de plaquetas, y método de medición de plaquetas

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a un reactivo para la medición de las plaquetas, a un kit de reactivos para la medición de las plaquetas y a un método para la medición de las plaquetas que lo utiliza. Más específicamente, la presente invención se refiere al reactivo para medir plaquetas que comprende Azul Nilo, concretamente Azul Nilo hidrogenosulfato.

10

Antecedentes de la técnica

Se conocen métodos en los que las células sanguíneas, es decir, leucocitos, reticulocitos, eritrocitos y similares se miden rápidamente mediante el uso del principio de la citometría de flujo.

15

En cuanto a uno de tales métodos de medición, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.114.173 describe un método para el recuento y la determinación de reticulocitos, eritrocitos y plaquetas en muestras de sangre completa, así como una composición de reactivos utilizada para el método. Específicamente, los reticulocitos se tiñen con una mezcla de reactivos que contiene un colorante catiónico, en particular Oxazina 750, y se miden la señal de luz dispersada y la señal de absorbancia de luz utilizando la citometría de flujo. A continuación, se diferencian los eritrocitos y los reticulocitos en las muestras de sangre por la diferencia en las señales de absorbancia, y se diferencian el grupo de los eritrocitos y reticulocitos y las plaquetas por la diferencia en las señales de luz dispersa, con el fin de determinar el número total de cada especie.

20

25

Compendio de la invención

Problema Técnico

30

Se sabe que los glóbulos rojos fragmentados, los lípidos y similares que aparecen en la sangre tienen un tamaño similar al de las plaquetas, de modo que afectan a las mediciones como contaminantes. Especialmente, las muestras que contienen pocas plaquetas para las que se puede requerir transfusión de sangre se ven significativamente más afectadas por estos contaminantes en las mediciones. Semejante problema puede producirse en el método descrito en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.114.173. No obstante, la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.114.173 no describe que las plaquetas se midan evitando cualquier efecto por los contaminantes.

35

Además, los colorantes que pueden teñir las plaquetas pueden ser degradados en una solución con el tiempo. Las mediciones de plaquetas mediante citometría de flujo se llevan a cabo mediante detección de la luz dispersada y de la fluorescencia obtenida mediante la aplicación de luz a las células teñidas con el colorante en las muestras. Sin embargo, cuando se utiliza una solución de colorante en la que se ha disminuido la cantidad de colorante contenida para la tinción de plaquetas, no se pueden obtener una luz dispersada o una fluorescencia precisas, y no se pueden obtener unos resultados de medición precisos.

40

45

La presente invención se ha logrado a la vista de las circunstancias anteriores, y tiene por objeto proporcionar un reactivo y un kit de reactivos para la medición de las plaquetas que hace posible medir las plaquetas con mayor precisión mediante la prevención de los efectos de los contaminantes que pueden estar contenidos en las muestras y evitar la detección de las plaquetas y que tienen una alta estabilidad de almacenamiento. La presente invención también tiene por objeto proporcionar un método para la medición de las plaquetas que hace posible medir las plaquetas con mayor precisión.

50

Medios para resolver los problemas

Por lo tanto, la presente invención proporciona un reactivo para la medición de las plaquetas que comprende, como colorante para la tinción de las plaquetas, Azul Nilo que tiene iones de hidrogenosulfato como contraiones que se disuelven en etilenglicol.

55

La presente invención también proporciona un kit de reactivos para la medición de las plaquetas que comprende:
 un primer reactivo que comprende, como un colorante para la tinción de las plaquetas, Azul Nilo que tiene iones de hidrogenosulfato como contraiones que se disuelven en etilenglicol, y
 un segundo reactivo que comprende un agente tamponador.
 Además, la presente invención proporciona un método para la medición de las plaquetas que comprende las etapas de:

60

mezclar un primer reactivo que comprende, como colorante para la tinción de las plaquetas, Azul Nilo que tiene iones hidrogenosulfato como contraiones que se disuelven en etilenglicol y una muestra con o sin la adición de un segundo reactivo que comprende un agente tamponador para preparar una muestra de medición;

5 aplicar luz a las células de la muestra de medición obtenida para detectar la luz dispersada y la fluorescencia emitida por las células; y
detectar las plaquetas contenidas en la muestra de medición basándose en la luz dispersada y la fluorescencia detectadas.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona un reactivo para la medición de las plaquetas que comprende, como colorante para la tinción de las plaquetas, Azul Nilo que tiene $1/2 \text{SO}_4^{2-}$ como contraión y un ácido que se disuelven en etilenglicol con una razón de concentración molar entre el colorante y el ácido de 10:1 a 1:1.

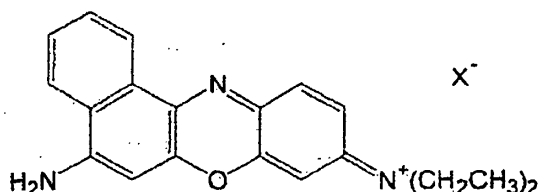
15 Adicionalmente, la presente invención proporciona un kit de reactivos para la medición de las plaquetas que comprende:

un primer reactivo que comprende, como colorante para la tinción de las plaquetas, Azul Nilo que tiene $1/2 \text{SO}_4^{2-}$ como contraión y un ácido que se disuelven en etilenglicol con una razón de concentración molar entre el colorante y el ácido de 10:1 a 1:1, y
un segundo reactivo que comprende un agente tamponador.

20 Adicionalmente, la presente invención proporciona un método para la medición de las plaquetas que comprende las etapas de:

mezclar un reactivo para la medición de las plaquetas que comprende Azul Nilo que tiene $1/2 \text{SO}_4^{2-}$ como contraión y un ácido que se disuelven en etilenglicol con una razón de concentración molar entre el colorante y el ácido de 10:1 a 1:1 y una muestra con o sin la adición de un segundo reactivo que comprende un agente tamponador para preparar una muestra de medición;
25 aplicar luz a las células de la muestra de medición obtenida para detectar la luz dispersada y la fluorescencia emitida por las células; y
detectar las plaquetas contenidas en la muestra de medición basándose en la luz dispersada y la fluorescencia detectadas.

Según se utiliza en la presente memoria, "Azul Nilo" indica colorantes que consisten en el compuesto que está representado, por ejemplo, por la siguiente fórmula (II):



35 en donde X^- es un anión; (I I)

y está en forma de una sal con el contraión representado por X^- . En la presente memoria descriptiva, los colorantes representados por la fórmula (II) en la que el contraión representado por X^- no está limitado específicamente se llaman simplemente "Azul Nilo", y los colorantes representados por la fórmula (II) en la que el contraión se define específicamente se llaman "Azul Nilo XXX (XXX denota una sal con un ion particular)". Por ejemplo, el colorante que tiene ion sulfúrico ($1/2 \text{SO}_4^{2-}$) como contraión se llama "Azul Nilo sulfato" y el colorante que tiene ión hidrogenosulfato (HSO_4^-) como un contraión se llama "Azul Nilo hidrogenosulfato".

Breve descripción de los dibujos

45 La Fig. 1 muestra recipientes que pueden contener el kit de reactivos para la medición de las plaquetas de la presente invención.
La Fig. 2 es una vista frontal de la constitución esquemática de un analizador de muestras.
La Fig. 3 es un diagrama de bloques que muestra la constitución esquemática del analizador de muestras.
50 La Fig. 4 es una vista esquemática en planta que muestra la constitución de una sección de detección.
La Fig. 5 muestra los diagramas de dispersión obtenidos por la medición de las plaquetas utilizando el reactivo para la medición de las plaquetas del Ejemplo Experimental 9.
La Fig. 6 muestra los diagramas de dispersión obtenidos por la medición de las plaquetas utilizando el reactivo para la medición de las plaquetas del Ejemplo Experimental 10.
55 La Fig. 7 muestra los diagramas de dispersión obtenidos por la medición de las plaquetas utilizando el reactivo para la medición de las plaquetas del Ejemplo Experimental 11.

- La Fig. 8 muestra los diagramas de dispersión obtenidos por la medición de las plaquetas utilizando el reactivo para la medición de las plaquetas del Ejemplo Experimental 12.
- La Fig. 9 muestra los diagramas de dispersión obtenidos por la medición de las plaquetas utilizando el reactivo colorante del Ejemplo Experimental 13.
- 5 La Fig. 10 muestra los diagramas de dispersión obtenidos por la medición de la sangre que contiene glóbulos rojos fragmentados utilizando el reactivo para la medición de las plaquetas del Ejemplo Experimental 9.
- La Fig. 11 muestra los diagramas de dispersión obtenidos por la medición de la sangre que contiene partículas de lípidos utilizando el reactivo para la medición de las plaquetas del Ejemplo Experimental 9.
- 10 La Fig. 12 muestra los diagramas de dispersión obtenidos por la medición de la sangre que contiene glóbulos rojos fragmentados utilizando el reactivo para la medición de las plaquetas del Ejemplo Experimental 10.
- La Fig. 13 muestra los diagramas de dispersión obtenidos por la medición de la sangre que contiene partículas de lípidos utilizando el reactivo para la medición de las plaquetas del Ejemplo Experimental 10.
- 15 La Fig. 14 muestra los diagramas de dispersión obtenidos por las mediciones de las muestras utilizando los reactivos para la medición de las plaquetas de los Ejemplos Experimentales 14 a 24.
- La Fig. 15 muestra los diagramas de dispersión obtenidos por la medición de una muestra utilizando el reactivo para la medición de las plaquetas del Ejemplo Experimental 25.
- 20 La Fig. 16 muestra los diagramas de dispersión obtenidos por la medición de las plaquetas utilizando el reactivo para la medición de las plaquetas del Ejemplo Experimental 45.
- La Fig. 17 muestra los diagramas de dispersión obtenidos por la medición de las plaquetas utilizando el reactivo para la medición de las plaquetas del Ejemplo Experimental 46.
- La Fig. 18 muestra los diagramas de dispersión obtenidos por la medición de las plaquetas utilizando el reactivo para la medición de las plaquetas del Ejemplo Experimental 47.
- 25 La Fig. 19 muestra los diagramas de dispersión obtenidos por la medición de las plaquetas utilizando el reactivo para la medición de las plaquetas del Ejemplo Experimental 48.
- La Fig. 20 muestra los diagramas de dispersión obtenidos por la medición de la sangre que contiene glóbulos rojos fragmentados utilizando el reactivo para la medición de las plaquetas del Ejemplo Experimental 45.
- 30 La Fig. 21 muestra los diagramas de dispersión obtenidos por la medición de la sangre que contiene partículas de lípidos utilizando el reactivo para la medición de las plaquetas del Ejemplo Experimental 45.

DESCRIPCIÓN DE LOS NÚMEROS DE REFERENCIA

- 35 A
Primer recipiente
- B
Segundo recipiente
- 40 1
Analizador de muestras
- 2
Unidad de medición
- 3
45 Unidad de proceso de datos
- 4
Sección de control
- 5
Sección de detección
- 50 6
Sección de la preparación de la muestra
- 7
Interfaz
- 8
55 Sección de control
- 9
Sección de análisis de datos
- 10
Sección de visualización
- 60 11
Sección de funcionamiento
- 12
Interfaz
- 51

- Celda de flujo
- 52
- Fuente de luz láser
- 53
- 5 Lentes de aplicación de la luz
- 54 y 57
- Fotodiodos
- 54a
- Tope de haz
- 10 54b
- Amplificador
- 55
- Lente de condensación lateral
- 56
- 15 Espejo dicróico
- 57
- Fotodiodo
- 57a
- y 58b Amplificadores
- 20 58
- Fotomultiplicador
- 58a
- Filtro óptico

25 **Mejor modo de llevar a cabo la invención**

<Reactivo para medir las plaquetas>

30 Los autores de la presente invención han encontrado que las plaquetas se pueden distinguir claramente de los contaminantes de la sangre tales como los componentes celulares de la sangre distintos de las plaquetas o las partículas de lípidos mediante el uso de Azul Nilo como colorante para la tinción de las plaquetas en los métodos para la medición de las plaquetas mediante citometría de flujo.

35 Adicionalmente, los autores de la presente invención han llevado a cabo extensos estudios para determinar las condiciones para la medición de las plaquetas utilizando Azul Nilo y ha encontrado que los reactivos para la medición de las plaquetas tienen una estabilidad de almacenamiento superior cuando (1) contienen Azul Nilo hidrogenosulfato disuelto en etilenglicol; o (2) contienen Azul Nilo sulfato y un ácido disueltos en etilenglicol a una razón molar de 10:1 a 1:1, con el fin de completar la presente invención.

40 En la fórmula (II) anterior, el anión (contraión) de X^- es el ión hidrogenosulfato (HSO_4^-) o el ión sulfúrico ($1/2 \text{SO}_4^{2-}$).

Los Azules Nilo anteriores están disponibles comercialmente y se adquieren, por ejemplo, de Sigma Aldrich, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Nacalai Tesque, Inc., Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Kishida Chemical Co., Ltd. y similares.

45 Específicamente, el Azul Nilo hidrogenosulfato puede ser adquirido de Wako Pure Chemical Industries, Ltd. y de Kishida Chemical Co., Ltd.

50 El Azul Nilo contenido en el reactivo para la medición de las plaquetas de la presente invención (p. ej. Azul Nilo hidrogenosulfato) está contenido preferiblemente en un reactivo colorante en un intervalo de concentración a fin de obtener la concentración de 0,05 a 5,0 ppm, más preferiblemente de 0,1 a 0,6 ppm, más preferiblemente de 0,2 a 0,5 ppm cuando el reactivo para la medición de las plaquetas se mezcla con una muestra. Por ejemplo, cuando el reactivo para la medición de las plaquetas se mezcla con una muestra a una tasa de dilución de 1/50, la concentración de Azul Nilo en el reactivo para medir plaquetas es preferiblemente de 2,5 a 250 ppm.

55 Las plaquetas se distinguen más claramente de los componentes celulares de la sangre distintos de las plaquetas o los contaminantes, cuando el Azul Nilo está presente en el intervalo de concentración superior.

60 En el aspecto en el que el reactivo para la medición de las plaquetas de la presente invención comprende Azul Nilo sulfato y un ácido, el ácido puede ser o bien un ácido orgánico o un ácido inorgánico, con la preferencia de un ácido inorgánico. El ácido inorgánico incluye oxoácidos tales como ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido perclórico, y ácidos hidrácidos tales como ácido clorhídrico, ácido fluorhídrico, ácido yodhídrico, ácido bromhídrico, ácido cianhídrico, ácido isocianhídrico, sulfuro de hidrógeno, azida de hidrógeno.

En el aspecto anterior del reactivo para la medición de las plaquetas de la presente invención, el ácido está

contenido en el reactivo para la medición de las plaquetas a una concentración que es igual o menor que la concentración molar de Azul Nilo en el reactivo para la medición de plaquetas. Específicamente, la razón de las concentraciones molares de Azul Nilo sulfato y ácido en el reactivo para la medición de las plaquetas es preferiblemente de 10: a 1:1. Cuando el ácido es ácido clorhídrico, la razón de las concentraciones molares de Azul Nilo sulfato y ácido clorhídrico es de 3:1 a 1:1. Cuando el ácido es ácido sulfúrico, la razón de las concentraciones molares de Azul Nilo sulfato y ácido sulfúrico es preferentemente de 4:1 a 1:1. Al utilizar el ácido a las concentraciones anteriores, se puede prevenir con eficacia la reducción de la concentración de componente colorante eficaz de Azul Nilo sulfato en el reactivo para la medición de las plaquetas con el tiempo, de modo que se puede mejorar la estabilidad de almacenamiento del reactivo para la medición de las plaquetas.

En el aspecto anterior del reactivo para la medición de las plaquetas de la presente invención, la combinación más preferida es:

1. (A) Azul Nilo sulfato y un oxo-ácido o un hidrácido.

En otro aspecto del reactivo para la medición de las plaquetas de la presente invención, cuando el Azul Nilo es Azul Nilo hidrogenosulfato, no es necesario que el reactivo para la medición de las plaquetas contenga un ácido. Cuando el Azul Nilo es Azul Nilo hidrogenosulfato, se puede prevenir eficazmente la reducción en la concentración de componente eficaz de colorante Azul Nilo en el reactivo para la medición de las plaquetas con el tiempo sin un ácido, de modo que se puede mejorar la estabilidad de almacenamiento del reactivo para la medición de las plaquetas.

Se pueden dar las dos siguientes hipótesis en cuanto a por qué los reactivos para la medición de las plaquetas de la presente invención en los dos aspectos anteriores han mejorado la estabilidad de almacenamiento.

1. Se considera que el Azul Nilo tiene una alta estabilidad cuando está en forma de la sal hidrogenosulfato.

Cuando se añade un ácido al Azul Nilo sulfato, un protón (H^+) que es generado por la disociación del ácido se une al SO_4^{2-} del Azul Nilo sulfato para formar HSO_4^- , de modo que el HSO_4^- y el Azul Nilo están en un equilibrio de 1:1 y se estabilizan.

2. El Azul Nilo contiene tres átomos de nitrógeno en su grupo dietilamino, su grupo amino y su estructura de fenoxazina. Entre estos átomos de nitrógeno, los átomos de nitrógeno distintos del que forma la sal con el contra-anión representado por X- en la fórmula anterior forman una sal de adición de ácido, de modo que la estabilidad de los átomos de nitrógeno y la solubilidad del colorante mejoran y mejora la estabilidad del reactivo para la medición de las plaquetas.

A saber, el Azul Nilo hidrogenosulfato puede generar un protón (H^+) e ion sulfúrico (SO_4^{2-}) debido a la disociación de iones hidrogenosulfato (HSO_4^-). Este protón puede unirse a cualquiera de los átomos de nitrógeno del Azul Nilo para producir un átomo de nitrógeno prótico. Se considera que este átomo de nitrógeno prótico forma una sal intermolecular a través del ácido sulfúrico, y por lo tanto la solubilidad y la estabilidad del colorante se pueden mejorar.

Cuando se añade un Azul Nilo distinto de la sal hidrogenosulfato, se considera que un protón y un anión generados por la disociación del ácido contribuyen a la formación de sales intermoleculares de Azul Nilo, de modo que la solubilidad y la estabilidad del colorante se pueden mejorar.

El reactivo para la medición de las plaquetas de la presente invención comprende un disolvente orgánico soluble en agua. El disolvente orgánico soluble en agua es el etilenglicol.

El reactivo para la medición de las plaquetas de la presente invención se puede preparar disolviendo el sulfato Azul Nilo hidrogenosulfato anterior, o el Azul Nilo sulfato anterior y el ácido en el disolvente orgánico soluble en agua a la concentración deseada anteriormente.

<Kit de reactivos para la medición de plaquetas>

El reactivo anterior para la medición de las plaquetas se puede combinar con un reactivo que comprende un agente tamponador para diluir el reactivo para la medición de las plaquetas que comprende el colorante para formar un kit de reactivos.

De ese modo, la presente invención también proporciona un kit de reactivos para la medición de las plaquetas que comprende:

- un primer reactivo que comprende Azul Nilo hidrogenosulfato, o Azul Nilo sulfato y un ácido (en lo sucesivo también referido como "reactivo colorante"); y
- un segundo reactivo que comprende un agente tamponador (en adelante también referido como "reactivo de dilución").

Los detalles para el primer reactivo son los mismos que los descritos anteriormente para el reactivo para la medición

de las plaquetas.

El agente tamponador contenido en el segundo reactivo puede no estar específicamente limitado con tal que pueda mantener el pH del segundo reactivo dentro de un intervalo deseado, y puede ser un carboxilato, un fosfato, Tampón Goog, taurina, trietanolamina, dependiendo del pH deseado. El agente tamponador está contenido preferiblemente en el reactivo de dilución con el fin de obtener un intervalo de pH del reactivo de dilución de 6,0 a 11,0, más preferiblemente de 7,0 a 10,0, y aún más preferiblemente 8,0 a 9,5. Cuando el pH del reactivo de dilución es de 6,0 o superior, los eritrocitos se vuelven resistentes a lisis y los glóbulos rojos fragmentados contaminantes se pueden disminuir tras la mezcla del reactivo de dilución y la muestra. Cuando el pH es de 11,0 o inferior, se puede reducir la tinción no específica de los glóbulos rojos fragmentados.

Por lo tanto, el segundo reactivo es preferiblemente un tampón que tiene un pH de 6,0 a 11,0.

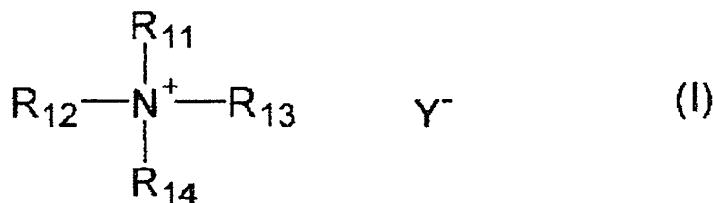
El reactivo de dilución puede comprender, además del agente tamponador, otros componentes tales como un agente osmótico, una tinción agente acelerador de la tinción para acelerar la tinción de las plaquetas por el Azul Nilo.

El agente osmótico puede ser cualquier compuesto con tal que pueda mantener la presión osmótica del reactivo de dilución dentro de un intervalo apropiado, e incluye sales de metales alcalinos de un ácido orgánico tal como el ácido propiónico, sacáridos tales como glucosa, manosa. También se pueden utilizar haluros de metales alcalinos, tales como NaCl y haluros de metales alcalinotérreos. Se pueden utilizar uno o más agentes osmóticos.

El agente osmótico está contenido preferiblemente en el reactivo de dilución con el fin de ajustar la presión osmótica del reactivo de dilución a 150 a 600 mOsm/kg, y más preferiblemente de 200 a 300 mOsm/Kg. Mediante el ajuste de la presión osmótica dentro del intervalo anterior, la presión osmótica de la mezcla de los reactivos del kit de reactivos y la muestra pueden estar más cerca de la presión osmótica fisiológica, por lo que se puede prevenir la hemólisis debida a la hipotonicidad, se puede suprimir el aumento de los glóbulos rojos fragmentados y la medición de las plaquetas puede ser más precisa. Cuando la presión osmótica del reactivo de dilución se puede ajustar dentro del intervalo anterior utilizando el agente tamponador anterior, puede no ser necesario el agente osmótico.

El agente de aceleración de la tinción puede ser cualquier compuesto que puede aumentar la permeabilidad del Azul Nilo en las plaquetas, e incluye agentes tensioactivos, particularmente preferiblemente agentes tensioactivos catiónicos.

El tensioactivo catiónico preferido es el representado por la siguiente fórmula (I):



en donde R_{11} es un grupo alquilo que tiene de 8 a 12 átomos de carbono; R_{12} , R_{13} y R_{14} son iguales o diferentes entre sí y son un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono; e Y^- es un anión.

En la fórmula (I) anterior, el grupo alquilo que tiene de 8 a 12 átomos de carbono de R_{12} , R_{13} y R_{14} puede ser lineal o ramificado e incluye, por ejemplo, octilo, decilo, laurilo, cetilo, miristilo y grupos similares.

El grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono de R_{12} , R_{13} y R_{14} puede ser lineal o ramificado e incluye, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo y grupos similares. Entre éstos, son preferibles los grupos metilo y etilo.

El anión del Y^- es preferiblemente un ion de bromo o cloro.

Los tensioactivos catiónicos preferidos de la fórmula (I) incluyen bromuro de deciltrimetilamonio (DTAB), bromuro de octiltrimetilamonio (OTAB), cloruro de lauriltrimetilamonio (LTAC), cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC), bromuro de miristiltrimetilamonio (MTAB) y similares. Se pueden utilizar uno o más tensioactivos catiónicos.

El tensioactivo catiónico está contenido preferiblemente en el reactivo de dilución a una concentración de 50 a 20.000 ppm. La concentración particularmente preferible puede depender del tipo de tensioactivos catiónicos y es preferiblemente de 500 a 3000 ppm cuando se utiliza DTAB y de 100 a 500 ppm cuando se usa LTAC. Cuando el reactivo de dilución contiene el tensioactivo catiónico a tales concentraciones, se puede prevenir la hemólisis y se puede acelerar la tinción de las plaquetas tras la mezcla de los reactivos del kit de reactivos para la medición de las

plaquetas y la muestra.

El reactivo de dilución puede comprender, además de los componentes anteriores, un conservante tal como 2-piridiltio-1-óxido de sodio, alcohol β-fenético.

El agente tamponador que está contenido en el reactivo de dilución y otros componentes que pueden estar contenidos opcionalmente en el reactivo de dilución se puede mezclar con el reactivo colorante de antemano. Sin embargo, debido a que el Azul Nilo contenido en el reactivo colorante se puede degradar con agua o un componente alcalino, es preferible el kit de reactivos que comprende por separado el reactivo colorante y el reactivo de dilución en vista de la estabilidad de almacenamiento.

El kit de reactivos para la medición de las plaquetas de acuerdo con la presente realización puede estar contenido en un primer recipiente A que contiene el reactivo colorante y un segundo contenedor B que contiene el reactivo de dilución, como se muestra en la Fig. 1. Cuando el reactivo colorante y el reactivo de dilución están contenidos en recipientes separados, la degradación del Azul Nilo contenido en el reactivo colorante se puede evitar debido al agua o a un componente alcalino contenidos en el reactivo de dilución, de modo que se puede proporcionar el kit de reactivos para la medición de las plaquetas que tiene un superior estabilidad de almacenamiento.

<Método para la medición de las plaquetas>

El reactivo o el kit de reactivos para la medición de las plaquetas se mezclan con una muestra que puede contener plaquetas, tiñendo de ese modo las plaquetas.

Por lo tanto, la presente invención proporciona adicionalmente un método para la medición de las plaquetas utilizando el reactivo o kit de reactivos para la medición de plaquetas.

El método para la medición de la presente invención comprende las etapas de:
mezclar un primer reactivo que comprende Azul Nilo hidrogenosulfato, o Azul Nilo sulfato y el ácido que se disuelve en etilenglicol con una muestra para preparar una muestra de medición;
aplicar luz a las células de la muestra de medición obtenida para detectar la luz dispersada y la fluorescencia emitida por las células; y
detectar las plaquetas contenidas en la muestra de medición basándose en la luz dispersada y la fluorescencia detectada.

En la etapa de mezclar el primer reactivo y una muestra en el método anterior, se puede mezclar adicionalmente o no mezclar un segundo reactivo que comprende el agente tamponador. Es preferible que el segundo reactivo se mezcle adicionalmente.

Los detalles para el primero y segundo reactivos son los mismos que los descritos anteriormente para el kit de reactivos para la medición de plaquetas.

La muestra incluye la sangre (sangre completa, plasma rico en plaquetas (PRP), etc.) y fluido de la médula ósea obtenido a partir de organismos, particularmente de mamíferos, incluyendo seres humanos. La muestra puede ser de sangre o de fluido de médula ósea diluidos con una solución apropiada tal como un tampón.

El primer reactivo y la muestra se mezclan preferiblemente con el fin de obtener una concentración de Azul Nilo en la muestra de medición de 0,05 a 5,0 ppm, preferiblemente de 0,1 a 0,6 ppm, y más preferiblemente de 0,2 a 0,5 ppm.

El primer reactivo se puede diluir con el segundo reactivo con el fin de lograr la concentración anterior de Azul Nilo, en la muestra de medición después de mezclar con la muestra.

Cuando se utiliza el segundo reactivo, el primer y segundo reactivos y la muestra se mezclan preferiblemente a una razón en volumen de (primer reactivo + segundo reactivo):muestra = 100:1 a 1000:1.

Cuando se utiliza el segundo reactivo, la razón en volumen entre el primer y segundo reactivos es preferiblemente de 1:10 a 1:100, y más preferiblemente de 1:20 a 1:75.

Cuando se añade el segundo reactivo en la etapa de mezclado, el orden de mezclado del primer reactivo, el segundo reactivo y la muestra no está limitado específicamente.

La etapa de mezclado se puede llevar a cabo a una temperatura de aproximadamente 25 a 50°C, más preferiblemente de aproximadamente 35 a 45°C. El tiempo de mezclado es preferiblemente de 10 segundos a 5 minutos, más preferiblemente de 10 segundos a 2 minutos, y aún más preferiblemente de 10 segundos a 60 segundos.

En el método para la medición de la presente invención, la luz se aplica a las células de la muestra de medición así obtenida, y se detectan la luz dispersada y la fluorescencia emitida desde las células.

5 Un aparato para la aplicación de luz es preferiblemente un citómetro de flujo. En el citómetro de flujo, la muestra de medición se introduce en una celda de flujo del citómetro de flujo y la luz se aplica a las células de la muestra de medición que pasa a través de la celda de flujo.

10 La fuente de luz del citómetro de flujo no está específicamente limitada y puede ser cualquier fuente de luz adecuada para la excitación del Azul Nilo (p. ej. alrededor de 600 a 680 nm). La fuente de luz incluye, por ejemplo, láser semiconductor rojo y láser de He-Ne. El láser semiconductor es adecuado porque es más barato que el láser de gas.

15 La luz dispersada emitida desde las células a las que se ha aplicado la luz en el citómetro de flujo puede ser o bien luz dispersada hacia adelante (ángulo de recepción de luz de aproximadamente 0 a 20 grados) o bien luz dispersada lateral (ángulo de recepción de luz de aproximadamente 90 grados). La luz dispersada hacia adelante puede ser luz dispersada hacia adelante de bajo ángulo (ángulo de recepción de luz de aproximadamente 1 a 5 grados) o luz dispersada hacia adelante de ángulo elevado (ángulo de recepción de luz de aproximadamente 6 a 20 grados).

20 La fluorescencia emitida por las células a las que se aplica la luz en el citómetro de flujo puede ser detectada por medio de la selección de una longitud de onda receptora de luz apropiada para el Azul Nilo (aproximadamente 630 a 680 nm).

25 Basándose en la luz dispersada y la fluorescencia obtenida como antes, se prepara un diagrama de dispersión, con el fin de detectar las plaquetas al distinguir las plaquetas de los contaminantes tales como los componentes celulares de la sangre distintos de las plaquetas, las partículas lipídicas. Las plaquetas detectadas de este modo también se pueden contar. La detección y/o el recuento de plaquetas se realizan preferiblemente mediante el uso de un soporte lógico de análisis apropiado.

30 Las mediciones de las plaquetas utilizando un analizador de muestras equipado con un citómetro de flujo se describen a continuación con referencia a las Figuras adjuntas.

35 La Fig. 2 es una vista frontal de la constitución esquemática del analizador de muestras. El analizador de muestras 1 es un aparato utilizado para las pruebas hematológicas, por ejemplo, y se compone principalmente de una unidad de medición 2 y una unidad de procesamiento de datos 3. En la unidad de medida 2, se miden ciertos componentes contenidos en una muestra de sangre, y la unidad de procesamiento de datos 3 recibe los datos de medición para llevar a cabo un procesamiento analítico.

40 La Fig. 3 es un diagrama de bloques que muestra la constitución esquemática del analizador de muestras 1. Como se muestra en la Fig. 3, la unidad de medición 2 comprende una sección de control 4 para controlar la acción de las secciones respectivas; una sección de detección 5 equipada con un flujo un citómetro de flujo para detectar partículas que hay que analizar en la muestra; una sección de preparación de la muestra 6 para preparar una muestra de medición y proporcionar la muestra de medición preparada a la sección de detección de 5; y una interfaz 7 para la transmisión de datos con la unidad de procesamiento de datos 3. La unidad de procesamiento de datos 3 comprende una sección de control 8 para controlar la acción de las secciones respectivas; una sección de análisis de datos 9 para el análisis de los datos detectados recibidos de la unidad de medición 2; una sección de visualización 10 que muestra los resultados del análisis de la sección de análisis de datos 9 como diagramas de dispersión; una sección de funcionamiento 11 que acepta el manejo por un operador; y una interfaz 12 para la transmisión de datos con la unidad de medición 2.

50 La constitución de la sección de detección 5 equipada con un citómetro de flujo se describe a continuación con referencia a la Fig. 4. La Fig. 4 es una vista esquemática en planta que muestra la constitución de la sección de detección. La sección de detección 5 está provista de una fuente de luz láser semiconductor 52 que emite un haz de láser hacia una celda de flujo 51. Entre la fuente de luz láser semiconductor 52 y la celda de flujo 51, se proporcionan las lentes de aplicación de luz 53 que consisten en una pluralidad de lentes. Sobre un eje de luz extendido linealmente desde la fuente de luz láser semiconductor 52, se proporciona un tope del haz 54 con el fin de que se oponga a las lentes de aplicación de luz 53 a través de la celda de flujo 51, de modo que la luz directa desde la fuente de luz láser semiconductor 52 sea interrumpida por el tope del haz 54a. Más aguas abajo del eje de luz del tope del haz 54a, se proporciona un fotodiodo 54.

60 Cuando una muestra de medición pasa a través de la celda de flujo 51, se generan señales de luz dispersada y de fluorescencia debido a un rayo láser. Entre las señales, la señal de luz hacia adelante se emite hacia el fotodiodo 54. Entre los haces de luz que van a lo largo del eje de luz linealmente extendido desde la fuente de luz láser semiconductor 52, la luz directa desde la fuente de luz láser semiconductor 52 es interrumpida por el tope del haz 54a, y el fotodiodo 54 recibe principalmente luz dispersada que va a lo largo de la fuente de luz (denominada en lo

5 sucesivo "luz dispersada hacia adelante"). La luz dispersada hacia adelante emitida desde la celda de flujo 51 se transduce fotoeléctricamente al fotodiodo 54, y la señal eléctrica generada de este modo (en lo sucesivo denominada "señal de luz dispersada hacia adelante") se amplifica en un amplificador 54b. La señal de luz dispersada hacia adelante es enviada a la sección de control 4, adicionalmente enviada a la unidad de procesamiento de datos 3 a través de la interfaz 7, y procesada en la sección de análisis de datos 9 de la unidad de procesamiento de datos 3.

10 Dicha señal de luz dispersada hacia adelante refleja el tamaño de las partículas a detectar. Mediante el procesamiento de la señal de luz dispersada hacia adelante en la sección de análisis de datos 9, se obtiene el tamaño de las partículas que se van a detectar.

15 En la dirección que cruza en ángulo recto con el eje de luz linealmente extendido desde la fuente de luz láser semiconductor 52 hacia el fotodiodo 54 se proporciona una lente de condensación lateral 55, con el fin de condensar la luz lateral con la lente de condensación lateral 55 que se genera por la aplicación de un láser semiconductor a las partículas que se van a detectar pasando a través de la celda de flujo 51 (luz que se emite en la dirección que cruza en ángulo recto con el eje de luz). Aguas abajo de la lente de condensación lateral 55 en la dirección de la luz lateral se proporciona un espejo dicroico 56, con el fin de dividir la luz de la señal recibida desde la lente de condensación lateral 55 en un componente de luz dispersada y un componente de fluorescencia. En la dirección lateral del espejo dicroico 56 (la dirección que cruza con el eje de luz que conecta la lente de condensación lateral 55 y el espejo dicroico 56) se proporciona un fotodiodo 57 para recibir la luz dispersada lateral, y aguas abajo del espejo dicroico 56 en la dirección del eje de luz se proporcionan un filtro óptico 58a y un fotomultiplicador 58. El componente de luz dispersada lateral dividido en el espejo dicroico 56 se transduce fotoeléctricamente al fotodiodo 57, y la señal eléctrica generada de este modo (denominada en lo sucesivo "señal de luz dispersada lateral") se amplifica en un amplificador 57a. La señal de luz dispersada lateral es enviada a la sección de control 4, adicionalmente enviada a la unidad de procesamiento de datos 3 a través de la interfaz de 7, y procesada en la sección de análisis de datos 9 de la unidad de procesamiento de datos 3.

30 La señal de luz dispersada lateral refleja la información interna de las partículas que se van a detectar (p. ej. el tamaño nuclear de los leucocitos y similares). Mediante el procesamiento de la señal de luz dispersada lateral en la sección de análisis de datos 9, se obtiene el tamaño nuclear de los leucocitos y similares.

35 El componente de la fluorescencia lateral emitida desde el espejo dicroico 56 se selecciona dependiendo de la longitud de onda del filtro óptico 58a y se transduce fotoeléctricamente al fotomultiplicador 58. La señal eléctrica así generada (señal de fluorescencia lateral) se amplifica en un amplificador 58b. La señal de fluorescencia lateral se envía a la sección de control 4, se envía adicionalmente a la unidad de procesamiento de datos 3 a través de la interfaz, y se procesa en la sección de análisis de datos 9 de la unidad de procesamiento de datos 3.

40 La señal de fluorescencia lateral refleja información sobre el grado de tinción de las partículas que se van a detectar. Mediante el procesamiento de la señal de fluorescencia lateral en la sección de análisis de datos 9, se obtiene el grado de tinción de las partículas a detectar.

45 La sección de análisis de datos 9 de la unidad de procesamiento de datos 3 puede analizar la señal de luz dispersada hacia adelante así obtenida, la señal de luz dispersada lateral y la señal de fluorescencia para detectar las partículas que se van a detectar, y además puede contar las partículas detectadas. La sección de análisis de datos 9 genera adicionalmente diagramas de dispersión basándose en los resultados del análisis de la señal de luz dispersada hacia adelante, la señal de luz dispersada lateral y la señal de fluorescencia. El diagrama de dispersión generado se muestra en la sección de visualización 10.

50 Mediante el empleo de semejante analizador de muestras, se pueden medir las plaquetas.

55 En primer lugar, en la sección de preparación de la muestra 6, se mezcla una muestra con un reactivo para la medición de las plaquetas o con los reactivos contenidos en un kit de reactivos para la medición de las plaquetas para preparar una muestra de medición. El reactivo y el kit de reactivos para la medición de las plaquetas que se van a utilizar pueden ser el reactivo y el kit de reactivos para la medición de las plaquetas descritos anteriormente. En el reactivo para la medición de las plaquetas o en el reactivo colorante del kit de reactivos para la medición de las plaquetas contienen Azul Nilo, de modo que las plaquetas contenidas en la muestra se tiñen con el Azul Nilo. En la sección de preparación de la muestra 6, se prepara preferiblemente una muestra de medición mezclando una muestra y el reactivo para la medición de las plaquetas o los reactivos contenidos en el kit de reactivos para la medición de las plaquetas con el fin de obtener una concentración de Azul Nilo en la muestra de medición de 0,05 a 60 5,0 ppm (0,00014 a 0,014 mmoles/L), preferiblemente de 0,1 a 0,6 ppm, más preferiblemente de 0,2 a 0,5 ppm. La temperatura y el tiempo de reacción para la preparación de la muestra de medición son preferiblemente los descritos anteriormente para la temperatura y el tiempo de reacción para el reactivo para la medición de las plaquetas.

A continuación se suministra la muestra de medición preparada en la sección de preparación de la muestra 6 a la

sección de detección de 5. En la sección de detección 5, la muestra de medición se introduce en la celda de flujo 51 del citómetro de flujo, y se aplica un haz láser desde la fuente de luz láser semiconductor 52 a las partículas que se van a detectar en la muestra de medición. La señal de luz dispersada hacia adelante, la señal de luz dispersada lateral y la señal de fluorescencia obtenidas mediante la aplicación del haz láser a las partículas se procesan en la sección de análisis de datos 9 de la unidad de procesamiento de datos 3.

En la sección de análisis de datos 9, las plaquetas en la muestra de medición se distinguen claramente de los otros componentes tales como los glóbulos rojos fracturados las o partículas de lípidos contenidos en la muestra basándose en la señal de luz dispersada hacia adelante y la señal de fluorescencia. En la sección de análisis de datos 9, también se pueden contar las plaquetas detectadas de este modo. Con el fin de detectar y contar las plaquetas basándose en la señal de luz dispersada hacia adelante y la señal de fluorescencia, se lleva a cabo el procesamiento de la señal en la sección de análisis de datos 9 preferiblemente mediante el uso de un soporte lógico de análisis apropiado.

En lo anterior, la constitución en la que se detectan las plaquetas se basa en la señal de luz dispersada hacia adelante y la señal de fluorescencia. Sin embargo, se pueden emplear otras constituciones tales como aquellas en las que las plaquetas se detectan basándose en la señal de luz dispersada lateral y la señal de fluorescencia.

EJEMPLOS

La presente invención se describe a continuación con más detalle. Sin embargo, estos Ejemplos no están destinados a limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplos Experimentales 1 a 8: Estabilidad en el almacenamiento de los reactivos para la medición de las plaquetas que contienen Azul Nilo hidrogenosulfato

Con el fin de demostrar la estabilidad de almacenamiento del reactivo colorante, se prepararon los reactivos para la medición de las plaquetas (reactivos colorantes) que contenían colorante Azul Nilo mostrados en la Tabla 1 a las concentraciones mostradas en la Tabla 1, y se midió la absorbancia, un parámetro que refleja la concentración de componente colorante eficaz de Azul Nilo en los reactivos colorantes, para evaluar la estabilidad de almacenamiento del Azul Nilo en los reactivos colorantes.

Reactivos para la medición de las plaquetas:

Colorante	A las concentraciones mostradas en la Tabla 1
Etilenglicol	5 ml

[Tabla 1]

Ejemplos Experimentales	Colorante	Concentración
1	Azul Nilo hidrogenosulfato	18,4 ppm
	(Azul Nilo hidrogenosulfato, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)	
2	Azul Nilo hidrogenosulfato	18,4 ppm
	(Azul Nilo hidrogenosulfato, Kishida Chemical Co., Ltd.)	
3 *	Azul Nilo sulfato	16,0 ppm
	(Sal de de Azul Nilo sulfato, Sigma)	
4 *	Azul Nilo sulfato	16,0 ppm
	(Azul Nilo, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)	
5 *	Azul Nilo sulfato	16,0 ppm
	(Azul Nilo sulfato, Nacalai Tesque, Inc.)	
6 *	Azul Nilo sulfato	16,0 ppm
	(Azul Nilo A, Nacalai Tesque, Inc.)	
7 *	Cloruro de Azul Nilo	16,0 ppm
	(Azul Nilo cloruro, Kishida Chemical Co., Ltd.)	

ES 2 535 012 T3

Ejemplos Experimentales	Colorante	Concentración
8 *	Azul Nilo sulfato (Azul Nilo A, Kishida Chemical Co., Ltd.)	16,0 ppm
* Referencia		

5 Los reactivos colorantes obtenidos se diluyeron a 1/10 con etanol, y la absorbancia de cada reactivo colorante se midió a 630 nm con un espectrofotómetro, a la cual el espectro de absorbancia del colorante es máximo. Las mediciones de absorbancia se llevaron a cabo utilizando etanol como referencia. La absorbancia de los reactivos diluidos se midió después de almacenamientos de 2, 4 y 7 meses a 45 ° C, y se calcularon las tasas de cambio en la absorbancia. Los resultados de las mediciones de absorbancia y las tasas de cambio en la absorbancia se muestran en las Tablas 2-1 y 2-2, respectivamente.

10 La "tasa de cambio en la absorbancia" indica la tasa de cambio en la absorbancia por ciento calculada utilizando el valor máximo de absorbancia medido como un valor patrón entre todos los valores de absorbancia obtenidos para el respectivo Ejemplo Experimental.

[Tabla 2-1]

Ejemplo Experimental	Inmediatamente después de la dilución	2 meses más tarde	4 meses más tarde	7 meses más tarde
1	0,3223	0,3141	0,3063	0,3001
2	0,3369	0,3250	0,3138	0,2799
3 *	0,3316	0,2919	0,2583	0,2285
4 *	0,3297	0,2803	0,2484	0,2178
5 *	0,3217	0,2729	0,2441	0,2117
6 *	0,3248	0,2790	0,2443	0,2119
7 *	0,3184	0,2696	0,2335	0,2023
8 *	0,3319	0,2825	0,2426	0,2234
* Referencia				

15 [Tabla 2-2]

Ejemplo Experimental	Inmediatamente después de la dilución	2 meses más tarde	4 meses más tarde	7 meses más tarde
1	0,0%	-2,5%	-5,0%	-6,9%
2	0,0%	-3,5%	-6,9%	-16,9%
3 *	0,0%	-12,0%	-22,1%	-31,1%
4 *	0,0%	-15,0%	-24,7%	-33,9%
5 *	0,0%	-15,2%	-24,1%	-34,2%
6 *	0,0%	-14,1%	-24,8%	-35,0%
7 *	0,0%	-15,3%	-26,7%	-36,5%
8 *	0,0%	-14,9%	-26,9%	-32,7%
* Referencia				

20 Como se muestra en la Tabla 2-2, la reducción en la absorbancia del reactivo colorante del Ejemplo Experimental 1, que contenía Azul Nilo hidrogenosulfato como colorante fue de 2,5%, 5,0% y 6,9% después de 2 meses, 4 meses y 7 meses, respectivamente. La reducción en la absorbancia del reactivo colorante del Ejemplo Experimental 2 que también contenía Azul Nilo hidrogenosulfato como colorante fue de 3,5%, 6,9% y 16,9% después de 2 meses, 4 meses y 7 meses, respectivamente.

Por otra parte, la absorbancia de los reactivos colorantes de los Ejemplos Experimentales 3 a 8 que contenían Azul Nilo que tenía los contraiones distintos del ion hidrogenosulfato se redujo en más de 10%, más de 20% y más de

30% después de 2 meses, 4 meses y 7 meses, respectivamente.

De las comparaciones con estos Ejemplos Experimentales 3 a 8, se encuentra que los reactivos colorantes que contienen Azul del Nilo que tiene iones hidrogenosulfato contraiones tienen una menor reducción en la absorbancia con el tiempo y una estabilidad de almacenamiento superior en comparación con los reactivos que contienen colorantes Azul Nilo que tienen contraiones distintos de los iones de hidrogenosulfato.

Ejemplos Experimentales 9 a 13: Propiedad de tinción de plaquetas de los reactivos para la medición de las plaquetas que comprenden Azul Nilo hidrogenosulfato

Los siguientes experimentos se llevaron a cabo para demostrar la propiedad de tinción de plaquetas de los reactivos para la medición de las plaquetas que comprenden Azul Nilo hidrogenosulfato.

Se prepararon kits de reactivos que consistían en reactivos colorantes que tenían las siguientes composiciones y el reactivo de dilución.

(1) Reactivos Colorantes

Colorante para la tinción de las plaquetas	A las concentraciones mostradas en la Tabla 3
Etilenglicol	1L

(2) Reactivo de dilución

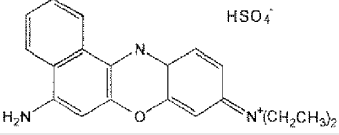
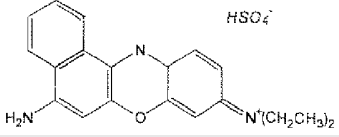
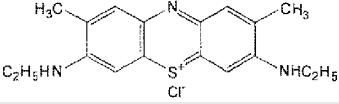
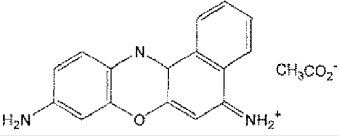
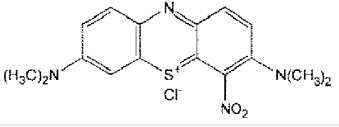
Tricina (agente tamponador)	1,8 g
Cloruro lauriltrimetilamonio (LTAC)	0,15 g
Agua purificada	1L
(Ajustado a pH 9,0 y la presión osmótica de 200 mOsm / kg.H ₂ O)	

Los colorantes para la medición de las plaquetas utilizados fueron los que se muestran en la Tabla 3 a las concentraciones mostradas en la Tabla 3. Las concentraciones finales de los colorantes después de mezclar los reactivos con la muestra se muestran entre paréntesis.

Las fórmulas químicas de los colorantes se muestran en la Tabla 3.

El reactivo de dilución (alícuotas de 1 mL) en tubos se calentó en un baño de agua a 40°C. Al reactivo de dilución se le añadieron 20 µl del reactivo colorante y 5 µl de sangre completa de ser humano sano como muestra, y la reacción se llevó a cabo a 40°C durante 25 segundos para preparar muestras de medición. Las muestras de medición se introdujeron en una sección de detección de un citómetro de flujo que tenía una fuente de luz que emitía luz con la longitud de onda de 633 nm, se aplicó luz de excitación a las células de las muestras de medición, se detectaron la señal de luz dispersada y la señal de fluorescencia emitidas desde las células, se analizaron las señales obtenidas y se midieron las plaquetas de las muestras de medición. La preparación de las muestras de medición y las mediciones de las plaquetas por el citómetro de flujo se llevaron a cabo en el analizador de sangre XE-2100 (Sysmex Corporation). La salida de la fuente de luz del analizador de sangre se modificó a 9W a partir de la salida normal de 3W.

[Tabla 3]

	Colorante	Conc.	Estructura	Resultados
Ej. 9	Azul Nilo A Hidrogenosulfato (Wako Pure Chemicals)	18,4 ppm (0,3 ppm)		Tinción suficiente de plaquetas
Ej. 10	Azul Nilo A Hidrogenosulfato (Kishida Química)	18,4 ppm (0,3 ppm)		Tinción suficiente de plaquetas
Ej. 11*	Azul de Metileno NNX (Sigma)	102,5 ppm (2 ppm)		Tinción insuficiente de plaquetas
Ej. 12*	Acetato de cresil-violeta (Sigma)	1025 ppm (20 ppm)		Sin tinción
Ej. 13*	Verde Básico 5 (Tokyo Chemical Industry)	1025 ppm (20 ppm)		Tinción insuficiente de plaquetas
* Referencia				

Los diagramas de dispersión obtenidos a partir de los Ejemplos Experimentales 9 a 13 se muestran en las Figs. 5 a 9, respectivamente. En cada figura, (a) es un diagrama de dispersión que tiene el eje y de la intensidad de la luz dispersada hacia adelante y el eje x de la intensidad de fluorescencia, y (b) es un diagrama de dispersión en el que el eje y del diagrama de dispersión (a) se convierte en los logaritmos. En (b), la zona donde aparecen las plaquetas se muestra con una línea continua. Los resultados de medición de los ejemplos experimentales se muestran en la Tabla 3.

- 5
- 10 Como se muestra en las Figs. 5 a 9, cuando se utilizaron los Ejemplos Experimentales 9 y 10 que contenían Azul Nilo hidrogenosulfato como colorante para la tinción de las plaquetas, las plaquetas se tiñeron suficientemente en comparación con los Ejemplos Experimentales 11 a 13 que contenían colorantes distintos de Azul Nilo, de manera que las plaquetas se pudieron detectar en la región con mayor intensidad de fluorescencia.
- 15 De este modo, cuando se utiliza Azul Nilo hidrogenosulfato como colorante para la tinción de las plaquetas, las plaquetas se pueden medir con una mejor discriminación de otros componentes celulares de la sangre.

20 A continuación, se examinó si las plaquetas se podían teñir específicamente mediante el uso de los reactivos colorantes de los Ejemplos Experimentales 9 y 10 que contenían Azul Nilo hidrogenosulfato incluso cuando la sangre contiene contaminantes tales como partículas lipídicas.

25 Las mediciones de plaquetas de la sangre que contenían glóbulos rojos fragmentados y la sangre que contenía partículas lipídicas se llevaron a cabo con los reactivos colorantes de los Ejemplos Experimentales 9 y 10. Los procedimientos experimentales fueron los mismos que antes excepto que se utilizaron sangre que contenía glóbulos rojos fragmentados y sangre que contenía partículas lipídicas en lugar de sangre completa de ser humano sano.

30 Los diagramas de dispersión obtenidos de las mediciones de la sangre que contenía glóbulos rojos fragmentados y la sangre que contenía partículas de lípidos utilizando el reactivo colorante del Ejemplo experimental 9 se muestran en las Figs. 10 y 11. Los diagramas de dispersión obtenidos a partir de las mediciones de la sangre que contenía eritrocitos fragmentados y la sangre que contenía partículas de lípidos utilizando el reactivo colorante del Ejemplo Experimental 10 se muestran en las Figs. 12 y 13. En cada figura, (a) es un diagrama de dispersión que tiene el eje

y de la intensidad de luz dispersada hacia adelante y el eje x de la intensidad de fluorescencia, (b) es un diagrama de dispersión en el que el eje y del diagrama de dispersión (a) se convierte en los logaritmos, y (c) es una vista ampliada de la zona donde las plaquetas aparecen en (b). En (c), la zona donde aparecen las plaquetas se muestra con una línea continua.

Los resultados de las Figs. 10 a 13 demuestran que los reactivos colorantes de los Ejemplos Experimentales 9 y 10 pueden teñir específicamente plaquetas con una clara discriminación de los glóbulos rojos fragmentados o las partículas de lípidos de la sangre. Por lo tanto, cuando se utiliza Azul Nilo hidrogenosulfato para la tinción de las plaquetas, las plaquetas se pueden medir con una clara discriminación de otros componentes celulares de la sangre, incluso cuando la sangre contiene contaminantes tales como glóbulos rojos fragmentados o partículas de lípidos.

De acuerdo con los Ejemplos Experimentales 1 y 2, se demuestra que los reactivos colorantes que contienen Azul Nilo hidrogenosulfato tienen una menor reducción de la absorbancia con el tiempo y una mayor estabilidad de almacenamiento. Además, los Ejemplos Experimentales 9 y 10 demuestran que el Azul Nilo hidrogenosulfato como colorante para la tinción de las plaquetas puede teñir específicamente las plaquetas de la sangre, y que hace que sea posible llevar a cabo mediciones de plaquetas precisas incluso cuando la sangre contiene contaminantes tales como glóbulos rojos fragmentados o partículas lipídicas.

Ejemplos Experimentales 14 a 24: Propiedades de tinción de las plaquetas de los reactivos para la medición de las plaquetas que contienen Azul Nilo hidrogenosulfato a diversas concentraciones

Se prepararon reactivos colorantes que contenían Azul Nilo hidrogenosulfato (Merck Co.) a las concentraciones indicadas en la Tabla 4 en etilenglicol.

Los reactivos colorantes obtenidos se combinaron con el reactivo de dilución descrito en los Ejemplos Experimentales 9 a 13 para medir plaquetas en las siguientes muestras: sangre completa de ser humano sano, sangre que contenía glóbulos rojos fragmentados y sangre que contenía partículas de lípidos, de un modo similar al de los Ejemplos Experimentales 9 a 13 .

[Tabla 4]

Ejemplo Experimental	Concentración de colorante en el reactivo colorante (mg/L)	Concentración de colorante final en la mezcla de los reactivos y la muestra (mg/L)
14	6,0	0,12
15	8,0	0,16
16	9,1	0,18
17	12,5	0,24
18	15,0	0,29
19	16,6	0,32
20	18,3	0,36
21	20,3	0,40
22	22,5	0,44
23	25,5	0,50
24	29,3	0,57

Los diagramas de dispersión obtenidos se muestran en la Fig. 14.

Los resultados de la Fig. 14 demuestran que las plaquetas se midieron suficientemente con Azul Nilo hidrogenosulfato a todas las concentraciones sometidas a ensayo.

Entre estos, cuando la muestra, la sangre que contenía glóbulos rojos fragmentados, se sometió a ensayo con los reactivos para la medición de las plaquetas de los Ejemplos Experimentales 17 a 22 (concentración final de Azul Nilo hidrogenosulfato: 0,24 a 0,44 mg/L), las plaquetas fueron más claramente discriminadas de los otros componentes celulares y contaminantes en la sangre.

Ejemplo Experimental 25: Estabilidad en el almacenamiento de los reactivos para la medición de las plaquetas que contienen Azul Nilo hidrogenosulfato

Se preparó reactivo colorante que contenía 14,4 ppm de Azul Nilo hidrogenosulfato (Merck Co.) en etilenglicol. El reactivo colorante se almacenó a unas condiciones de temperatura de 45°C durante 16 semanas y se utilizó para la medición de muestras.

5 Las muestras utilizadas fueron sangre tomada de ser humano sano, sangre con bajo contenido de plaquetas, sangre que contenía lípidos artificiales y sangre que contenía glóbulos rojos fragmentados. Las plaquetas se midieron como se describe en los Ejemplos Experimentales 9 a 13.

10 Los diagramas de dispersión obtenidos se muestran en la Fig. 15.

10 Los diagramas de dispersión de la Fig. 15 demuestran que las plaquetas pudieron ser medidas con una clara discriminación de los contaminantes en todas las muestras.

15 Estos resultados demuestran que, cuando se utiliza Azul Nilo hidrogenosulfato como el colorante para la tinción de las plaquetas, las plaquetas se pueden medir con precisión con poco efecto de los contaminantes, incluso cuando el reactivo colorante se almacena bajo condiciones desfavorables para el colorante.

20 El cambio en la concentración del colorante durante el almacenamiento bajo las condiciones anteriores se examinó mediante los siguientes experimentos.

25 La absorbancia se midió como se describe en los Ejemplos experimentales 1 a 8, excepto que el reactivo colorante inmediatamente después de la preparación y el reactivo colorante después de un almacenamiento de 16 semanas se diluyeron a 1/10 con etanol y se midió la absorbancia a 628 nm. Basándose en la tasa de reducción de la absorbancia medida, se calculó la concentración de colorante en el reactivo colorante después de un almacenamiento de 16 semanas. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 5.

[Tabla 5]

	Inmediatamente después de la preparación	Después de un almacenamiento de 16 semanas
Absorbancia	0,288	0,262
Tasa de reducción (%)	0,00%	-9,03%
Concentración de colorante (ppm)	14.40	13.10

30 Como se muestra en la Tabla 5, la concentración de colorante en la solución no diluida después de un almacenamiento de 16 semanas se calculó como 13,1 ppm. Por lo tanto, se demuestra que una concentración de colorante favorable para las mediciones de plaquetas se puede mantener incluso después de un almacenamiento bajo las condiciones anteriores.

35 **Ejemplos Experimentales 26 a 29: Estabilidad en el almacenamiento de reactivos para la medición de las plaquetas que contienen Azul Nilo y ácido**

40 Los experimentos se llevaron a cabo con el fin de estudiar la estabilidad de almacenamiento de las soluciones de Nilo azul que contenían ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La estabilidad de almacenamiento de las soluciones de Azul Nilo se evaluó midiendo la absorbancia, que es un parámetro que refleja la concentración del componente colorante eficaz de Azul Nilo en la solución.

45 En las siguientes descripciones, la "tasa de cambio en la absorbancia" denota la tasa de cambio en la absorbancia por ciento calculada utilizando el valor de absorbancia máximo medido como un valor patrón entre todos los valores de absorbancia obtenidos a partir del respectiva Ejemplo Experimental.

En los presentes Ejemplos Experimentales, se utilizó Azul Nilo que tenía ion sulfúrico como contraión (Azul Nilo A, Sigma). Este Azul Nilo se disolvió en etilenglicol a la concentración de 0,02 mmoles/L para preparar una solución de Azul Nilo (Ejemplo Comparativo 1).

50 A 5 ml de la solución de Azul Nilo se le añadió la siguiente sustancia a la siguiente concentración para obtener los Ejemplos Experimentales 26 a 29.

Ejemplo Experimental

26	Ácido clorhídrico	2 mmoles/L
27	Ácido clorhídrico	0,02 mmoles/L
28	Hidróxido de sodio	2 mmoles/L
29	Hidróxido de sodio	0,02 mmoles/L

Cada solución se diluyó a 1/5 con etanol, y se midió la absorbancia de cada solución a 630 nm con un espectrofotómetro, a la cual el espectro de absorbancia del colorante es máximo. Las soluciones diluidas se almacenaron a condiciones de temperatura de 60°C, y se midió la absorbancia a las 2 semanas y 4 semanas después de la dilución para calcular la tasa de cambio en la absorbancia. Se utilizó etanol como un control en la medición de la absorbancia. Los resultados de las mediciones de absorbancia y las tasas de cambio en la absorbancia se muestran en las Tablas 6-1 y 6-2, respectivamente.

[Tabla 6-1]

		Inmediatamente después de la preparación	Después de 2 semanas	Después de 4 semanas
Ejemplo Comparativo 1		0,5158	0,5033	0,4306
Ejemplo Experimental	26 (HCl 2 mM)	0,5388	0,0800	0,0055
	27 (HCl 0,02 mM)	0,5319	0,5286	0,4741
	28 (NaOH 2 mM)	0,0065	0,0017	0,0047
	29 (NaOH 0,02 mM)	0,4948	0,4721	0,3825

[Tabla 6-2]

		Inmediatamente después de la preparación	Después de 2 semanas	Después de 4 semanas
Ejemplo Comparativo 1		0,0%	-2,4%	-16,5%
Ejemplo Experimental	26 (HCl 2 mM)	0,0%	-85,2%	-99,0%
	27 (HCl 0,02 mM)	0,0%	-0,6%	-10,9%
	28 (NaOH 2 mM)	0,0%	-73,8%	-27,7%
	29 (NaOH 0,02 mM)	0,0%	-4,6%	-22,7%

Como se muestra en la Tabla 6-1, la absorbancia inicial del Ejemplo Comparativo 1 fue de 0,5158 a la cual no se añadió ácido clorhídrico ni hidróxido de sodio. Las tasas de cambio de la absorbancia del Ejemplo Comparativo 1 fueron, como se muestra en la Tabla 6-2, -2,4% y -16,5% a las 2 y 4 semanas de la preparación, respectivamente.

Las absorbancias iniciales de los Ejemplos Experimentales 26 y 27 que contenían ácido clorhídrico fueron, como se muestra en la Tabla 6-1, 0,5388 y 0,5319, respectivamente, y estos valores no fueron significativamente diferentes de la absorbancia inicial del Ejemplo Comparativo 1.

Las tasas de cambio en la absorbancia del Ejemplo Experimental 26 que contenía una concentración de 2 mmoles/L de ácido clorhídrico fueron -85,2% y -99,0% a las 2 y 4 semanas, presentando una reducción significativa en la absorbancia con el tiempo en comparación con el Ejemplo Comparativo 1. Esto demuestra que la estabilidad en el almacenamiento de las soluciones de Azul Nilo disminuía.

Por otra parte, las tasas de cambio en la absorbancia del Ejemplo Experimental 27 que contenían una concentración de 0,02 mmoles/L de ácido clorhídrico fueron -0,6% y -10,9% a las 2 y 4 semanas, demostrando que la reducción en la absorbancia con el tiempo era moderada en comparación con Ejemplo Comparativo 1. Esto demuestra que se había mejorado la estabilidad al almacenamiento de soluciones de Azul Nilo.

Las absorbancias iniciales de los Ejemplos Experimentales 28 y 29 que contenían hidróxido de sodio fueron, como se muestra en la Tabla 6-1, 0,0065 y 0,4948, respectivamente, demostrando que la absorbancia inicial se había reducido en comparación con el Ejemplo Comparativo 1.

5 Las tasas de cambio en la absorbancia de los Ejemplos Experimentales 28 y 29 fueron, como se muestra en la Tabla 6-2, por debajo de -20% a las 4 semanas de la preparación, lo que demuestra que la reducción en la absorbancia con el tiempo fue significativa. Esto demuestra que la estabilidad en el almacenamiento de las soluciones de Azul Nilo se reducía.

10 Estos resultados experimentales sugieren que la adición de ácido clorhídrico a ciertas concentraciones a las soluciones de Azul Nilo puede mejorar la estabilidad de almacenamiento de las soluciones de Azul Nilo.

Ejemplos Experimentales 30 a 36: Efecto de la razón de concentración molar entre el Azul Nilo y el ácido clorhídrico sobre la estabilidad de almacenamiento de los reactivos para la medición de las plaquetas

15 Se ha encontrado que la estabilidad al almacenamiento de las soluciones de Azul Nilo se mejora mediante la adición de una cierta concentración de ácido clorhídrico, de acuerdo con los Ejemplos Experimentales 26 a 29.

20 Se considera que la reducción de la estabilidad al almacenamiento de las soluciones de Azul Nilo, a saber, la reducción en la concentración de componente colorante eficaz Azul Nilo es debida a la degradación del componente colorante eficaz, de modo que la concentración de ácido clorhídrico que se añade a las soluciones debe ser examinada en relación con el número de moléculas de Azul Nilo.

25 Por lo tanto, en el presente Ejemplos Experimentales, las relaciones entre la razón de Azul Nilo y el ácido clorhídrico (razón de concentración molar) y la estabilidad al almacenamiento de las soluciones de Azul Nilo se examinaron mediante la variación de la razón de ácido clorhídrico y Azul Nilo (razón de concentración molar) en las soluciones de Azul Nilo.

30 La estabilidad de almacenamiento de las soluciones Azul Nilo se examinó mediante la evaluación de la absorbancia de las soluciones de Azul Nilo de una manera similar a la de los Ejemplos Experimentales 26 a 29.

De un modo similar a los Ejemplos Experimentales 26 a 29, se disolvió el Azul Nilo A (Sigma) en etilenglicol a la concentración de 0,02 mmoles/L para preparar una solución de Azul Nilo (Ejemplo Comparativo 2).

35 A 5 ml de la solución de Azul Nilo se le añadió ácido clorhídrico a la siguiente concentración para obtener los Ejemplos Experimentales 30 a 36. Las razones de concentración molar entre el Azul Nilo y el ácido clorhídrico en las soluciones se describen entre paréntesis.

Ejemplo Experimental

40

30	Ácido clorhídrico	0,002 mmoles/L (10:1)
31	Ácido clorhídrico	0,006 mmoles/L (3:1)
32	Ácido clorhídrico	0,02 mmoles/L (1:1)
33	Ácido clorhídrico	0,06 mmoles/L (1:3)
34	Ácido clorhídrico	0,2 mmoles/L (01:10)
35	Ácido clorhídrico	0,6 mmoles/L (01:30)
36	Ácido clorhídrico	2 mmoles/L (1:100)

45 Las soluciones de colorantes obtenidas se diluyeron 1/20 con etanol y se midió la absorbancia de cada solución a 630 nm con un espectrofotómetro, a la cual el espectro de absorbancia del colorante es máxima. Las soluciones de colorante se almacenaron bajo condiciones de temperatura de 45°C, y se midió la absorbancia a las 4 semanas, 9 semanas y 18 semanas de la preparación para calcular la tasa de cambio en la absorbancia. El etanol se utilizó como un control en la medición de la absorbancia.

Los resultados de las mediciones de absorbancia y las tasas de cambio en la absorbancia se muestran en las Tablas 7-1 y 7-2, respectivamente.

50

[Tabla 7-1]

		Inmediatamente después de la preparación	Después de 4 semanas	Después de 9 semanas	Después de 18 semanas
Ejemplo Comparativo 2		0,1342	0,1208	0,1174	0,0986
Ejemplo Experimental	30 (HCl 0,002 mM)	0,1369	0,1246	0,1225	0,1051
	31 (HCl 0,006 mM)	0,1371	0,1277	0,1244	0,1084
	32 (HCl 0,02 mM)	0,1380	0,1303	0,1308	0,1148
	33 (HCl 0,06 mM) *	0,1381	0,1211	0,0838	0,0245
	34 (HCl 0,2 mM) *	0,1394	0,0255	0,0001	0,0000
	35 (HCl 0,6 mM) *	0,1399	0,0282	0,0006	0,0000
	36 (HCl 2 mM) *	0,1399	0,0466	0,0014	0,0000
* Referencia					

[Tabla 7-2]

		Inmediatamente después de la preparación	Después de 4 semanas	Después de 9 semanas	Después de 18 semanas
Ejemplo Comparativo 2		0,0%	-10,0%	-12,5%	-26,5%
Ejemplo Experimental	30 (HCl 0,002mM)	0,0%	-9,0%	-10,5%	-23,2%
	31 (HCl 0,006 mM)	0,0%	-6,9%	-9,3%	-20,9%
	32 (HCl 0,02 mM)	0,0%	-5,6%	-5,2%	-16,8%
	33 (HCl 0,06 mM) *	0,0%	-12,3%	-39,3%	-82,3%
	34 (HCl 0,2 mM) *	0,0%	-81,7%	-99,9%	-100,0%
	35 (HCl 0,6 mM) *	0,0%	-79,8%	-99,6%	-100,0%
	36 (HCl 2 mM) *	0,0%	-66,7%	-99,0%	-100,0%
* Referencia					

5 Como se muestra en la Tabla 7-1, la absorbancia inicial del Ejemplo Comparativo 2 fue de 0,1342 a la que no se añadió ácido clorhídrico. Las tasas de cambio en la absorbancia del Ejemplo Comparativo 2 fueron, como se muestra en la Tabla 7-2, -10,0%, -12,5% y -26,5% a las 4, 9 y 18 semanas de la preparación, respectivamente.

10 Las absorbancias iniciales de los Ejemplos Experimentales 30 a 36 no fueron significativamente diferentes de las del Ejemplo Comparativo 2, como se muestra en la Tabla 7-1.

15 Las tasas de cambio en la absorbancia del Ejemplo Experimental 30 en la que la razón de concentración molar entre el Azul Nilo y el ácido clorhídrico fue de 10:1 fueron de -9,0%, -10,5% y -23,2% a las 4, 9 y 18 semanas de la preparación, respectivamente.

Las tasas de cambio en la absorbancia del Ejemplo Experimental 31 en la que la razón de concentración molar entre el Azul Nilo y el ácido clorhídrico fue de 3:1 fueron de -6,9%, -9,3% y -20,9% a las 4, 9 y 18 semanas de la preparación, respectivamente.

20 Las tasas de cambio en la absorbancia del Ejemplo Experimental 32 en la que la razón de concentración molar entre el Azul Nilo y el ácido clorhídrico fue de 1:1 fueron de -5,6%, -5,2% y -16,8% a las 4, 9 y 18 semanas de la preparación, respectivamente.

25 Como resulta evidente a partir de la comparación con el Ejemplo Comparativo 2, la reducción en la absorbancia de los Ejemplos Experimentales 30 a 32 en la que la concentración molar de ácido clorhídrico es menor que la de Azul Nilo es moderada en cualquier punto del tiempo que el Ejemplo Comparativo 2 que no contiene ácido clorhídrico. Por lo tanto, se mejora la estabilidad de almacenamiento de las soluciones de Azul Nilo.

En particular, el Ejemplo Experimental 32 en el que la razón de concentración molar entre el Azul Nilo y el ácido clorhídrico fue 1:1 tenía mayor capacidad de almacenamiento que otros Ejemplos Experimentales.

5 **Ejemplos Experimentales 37 a 44: Estabilidad en el almacenamiento de los reactivos para la medición de las plaquetas que contienen Azul Nilo y el ácido sulfúrico**

A continuación, se estudió la estabilidad de almacenamiento de las soluciones de Azul Nilo, que contenía ácido sulfúrico en lugar de ácido clorhídrico.

10 De una manera similar a la de los Ejemplos Experimentales 26 a 36, se disolvió Azul Nilo A (Sigma) en etilenglicol a una concentración de 0,02 mmoles/L para preparar una solución de Azul Nilo (Ejemplo Comparativo 3).

15 A 5 ml de la solución de Azul Nilo se le añadió ácido sulfúrico a la siguiente concentración para obtener los Ejemplos Experimentales 37 a 40. Las razones de concentración molar entre el Azul Nilo y el ácido sulfúrico en las soluciones se describen entre paréntesis.

Ejemplo Experimental

37	Ácido sulfúrico	0,005 mmoles/L (4:1)
38	Ácido sulfúrico	0,01 mmoles/L (2:1)
39	Ácido sulfúrico	0,02 mmoles/L (1:1)
40	Ácido sulfúrico	0,05 mmoles/L (1:2,5)

20 Se prepararon soluciones de Azul Nilo con Azul Nilo A que tenía ion sulfúrico como contraión (Nacalai Tesque, Inc.) en lugar del Azul Nilo A (Sigma) utilizado en los Ejemplos Experimentales 37 a 40 (Ejemplo Comparativo 4).

25 A 5 ml de la solución de Azul Nilo se les añadió ácido sulfúrico a la siguiente concentración para obtener los Ejemplos Experimentales 41 a 44. Las razones de concentración molar entre el Azul Nilo y el ácido sulfúrico en las soluciones se describen entre paréntesis.

Ejemplo Experimental

41	Ácido sulfúrico	0,005 mmoles/L (4:1)
42	Ácido sulfúrico	0,01 mmoles/L (2:1)
43	Ácido sulfúrico	0. 02 mmoles/L (1:1)
44	Ácido sulfúrico	0,05 mmoles/L (1:2,5)

30 Se midieron las absorbancias inmediatamente después de la preparación de las soluciones de los Ejemplos Experimentales 37 a 44. Cada solución se almacenó bajo condiciones de temperatura de 45°C, y se midió la absorbancia 1 mes, 2 meses, 3 meses y 4 meses después de la preparación para calcular la tasa de cambio en la absorbancia.

35 Los resultados de las mediciones de absorbancia y las tasas de cambio en la absorbancia de Ejemplos Experimentales 37 a 40 se muestran en las Tablas 8-1 y 8-2, respectivamente.

40 Los resultados de las mediciones de absorbancia y las tasas de cambio en la absorbancia de Ejemplos Experimentales 41 a 44 se muestran en las Tablas 9-1 y 9-2, respectivamente.

ES 2 535 012 T3

[Tabla 8-1]

		Inmediatamente después de la preparación	Después de 1 mes	Después de 2 meses	Después de 3 meses	Después de 4 meses
Ejemplo comparativo 3		0,2852	0,2849	0,2421	0,2225	0,2076
Ejemplo Experimental 0,01	37 (H ₂ SO ₄ 0,005 mM)	0,2887	0,2907	0,2547	0,2367	0,2224
	38 (H ₂ SO ₄ 0,01 mM)	0,2923	0,3045	0,3041	0,2672	0,2545
	39 (H ₂ SO ₄ 0,02 mM)	0,2999	0,3109	0,3009	0,2980	0,3000
	40 (H ₂ SO ₄ * 0,05 mM)	0,3076	0,2921	0,2934	0,2123	0,1546
* Referencia						

[Tabla 8-2]

		Inmediatamente después de la preparación	Después de 1 mes	Después de 2 meses	Después de 3 meses	Después de 4 meses
Ejemplo comparativo 3		0,0%	-0,1%	-15,1%	-22,0%	-27,2%
Ejemplo Experimental	37 (H ₂ O ₄ 0,005mM)	0,0%	0,7%	-11,8%	-18,0%	-23,0%
	38 (H ₂ O ₄ 0,01 mM)	0,0%	4,2%	4,0%	-8,6%	-12,9%
	39 (H ₂ SO ₄ 0,02 mM)	0,0%	3,7%	0,3%	-0,6%	0,0%
	40 (H ₂ SO ₄ * 0,05 mM)	0,0%	-5,0%	-4,6%	-31,0%	-49,7%
* Referencia						

5

[Tabla 9-1]

		Inmediatamente después de la preparación	Después de 1 mes	Después de 2 meses	Después de 3 meses	Después de 4 meses
Ejemplo Comparativo 4		0,2941	0,2901	0,2552	0,2449	0,2136
Ejemplo Experimental	41 (H ₂ SO ₄ 0,005 mM)	0,2981	0,2990	0,2752	0,2633	0,2346
	42 (H ₂ SO ₄ 0,01 mM)	0,3013	0,3120	0,3041	0,3024	0,2885
	43 (H ₂ SO ₄ 0,02 mM)	0,3068	0,3155	0,3009	0,2832	0,2562
	44 (H ₂ SO ₄ * 0,05 mM)	0,3140	0,3159	0,2934	0,2660	0,2092
* Referencia						

[Tabla 9-2]

		Inmediatamente después de la preparación	Después de 1 mes	Después de 2 meses	Después de 3 meses	Después de 4 meses
Ejemplo Comparativo 4		0,0%	-1,4%	-13,2%	-16,7%	-27,4%
Ejemplo Experimental	41 (H ₂ SO ₄ 0,005 mM)	0,0%	0,3%	-7,7%	-11,7%	-21,3%
	42 (H ₂ SO ₄ 0,01 mM)	0,0%	3,6%	0,9%	0,4%	-4,2%
	43 (H ₂ SO ₄ 0,02 mM)	0,0%	2,8%	-1,9%	-7,7%	-16,5%
	44 (H ₂ SO ₄ * 0,05 mM)	0,0%	0,6%	-6,6%	-15,3%	-33,4%
* Referencia						

5 Como resulta evidente a partir de la Tabla 8-2, la reducción en la absorbancia de los Ejemplos Experimentales 37 a 39 en los que la concentración molar del ácido sulfúrico contenido es menor que la del Azul Nilo es moderada en cualquier punto de tiempo en comparación con el Ejemplo Comparativo 3 que no contiene ácido sulfúrico. Por lo tanto, se mejora la estabilidad de almacenamiento de las soluciones de Azul Nilo.

10 Además, como resulta evidente a partir de la Tabla 9-2, la reducción en la absorbancia de los Ejemplos Experimentales 41 a 43 en los que la concentración molar del ácido sulfúrico contenido es menor que la del Nilo azul es moderada en cualquier punto de tiempo en comparación con el Ejemplo Comparativo 4, que no contiene ácido sulfúrico. Por lo tanto, se mejora la estabilidad de almacenamiento de las soluciones de Azul Nilo.

15 En particular, las tasas de cambio en la absorbancia después de 4 meses de los Ejemplos Experimentales 39 y 42 en los que la razón de concentración molar entre el Azul Nilo y el ácido sulfúrico fue de 2:1 a 1:1 fueron de 0,0% y -4,2%, respectivamente, mostrando una estabilidad en el almacenamiento particularmente favorable de los mismos.

20 Por lo tanto, se demuestra que la estabilidad en el almacenamiento de las soluciones de Azul Nilo se mejora mediante la adición de un ácido a las soluciones de Azul Nilo a una concentración que es igual o menor que la concentración molar de Azul Nilo.

Incidentalmente, las concentraciones óptimas de ácido sulfúrico en las soluciones de Azul Nilo fueron diferentes entre los Ejemplos Experimentales 37 a 40 y 41 a 44. Se considera que es debido a la diferencia en la pureza del Azul Nilo contenido en los reactivos comerciales de Azul Nilo, y puede estar dentro del intervalo de un error.

25 **Ejemplos Experimentales 45 a 48: Propiedades de tinción de las plaquetas de los reactivos para la medición de las plaquetas que contienen Azul Nilo y un ácido**

Los siguientes experimentos se llevaron a cabo con el fin de estudiar la propiedad de tinción de las plaquetas de los reactivos para la medición de las plaquetas que contienen Azul Nilo.

30 Se prepararon los reactivos para la medición de las plaquetas y el reactivo de dilución con las siguientes composiciones.

(1) Reactivos para la medición de las plaquetas

Colorante para la tinción de las plaquetas	A las concentraciones mostradas en la Tabla 10
Etilenglicol	1 L

35

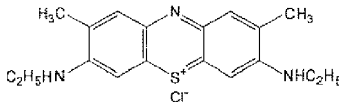
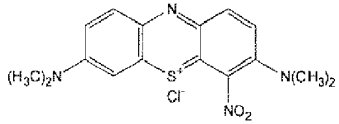
(2) Solución de dilución

Tricina (agente tamponador)	1,8 g
Cloruro de lauriltrimetilamonio (LTAC)	0,15 g
Agua purificada	1 L
(Ajustado a pH 9,0 y presión osmótica de 200 mOsm/kg.H ₂ O)	

5 Los colorantes para la medición de las plaquetas utilizados fueron los colorantes mostrados en la Tabla 10 a las concentraciones mostradas en la Tabla 10. Las concentraciones finales de colorante en la mezcla del reactivo, la solución de dilución y una muestra se muestran entre paréntesis. Las fórmulas químicas de los colorantes se muestran en la Tabla 10.

Las mediciones de las plaquetas se llevaron a cabo como se describe en los Ejemplos Experimentales 9 a 13.

10 [Tabla 10]

	Colorante	Conc.	Estructura	Resultados
Ej. 45	Azul Nilo A (Wako Pure Chemicals)	18,4 ppm (0,3 ppm)		Tinción suficiente de plaquetas
Ej. 46 *	Azul de metileno NNX (Sigma)	102,5 ppm (2 ppm)		Tinción insuficiente de plaquetas
Ej. 47 *	Acetato de cresil-violeta (Sigma)	1025 ppm (20 ppm)		Sin tinción
Ej. 48 *	Verde Básico 5 (Tokyo Chemical Industry)	1025 ppm (20 ppm)		Tinción insuficiente de plaquetas
* Referencia				

15 Los diagramas de dispersión obtenidos con los Ejemplos Experimentales 45 a 48 se muestran en las Figs. 16 a 19, respectivamente. En cada Figura, (a) es un diagrama de dispersión que tiene el eje y de la intensidad de la luz dispersada hacia adelante y el eje x de la intensidad de fluorescencia, y (b) es un diagrama de dispersión en el que el eje y del diagrama de dispersión (a) se convierte en los logaritmos. En (b), la zona donde aparecen las plaquetas se muestra con una línea continua.

Los resultados de medición con los Ejemplos Experimentales se muestran en la Tabla 10.

20 Como se muestra en la Fig. 16, cuando se utilizó el Experimental Ejemplo 45 en el que se utilizó Azul Nilo como colorante, el grupo de las plaquetas aparece en la zona que tiene una elevada fluorescencia en el diagrama de dispersión, que demuestra que las plaquetas se tiñeron suficientemente.

25 Por otro lado, cuando se utilizaron los Ejemplos Experimentales 46 a 48, en los que se utilizaron colorantes distintos de Azul Nilo, el grupo de las plaquetas se concentró en la zona que tenía baja fluorescencia en el diagrama de dispersión, lo que muestra que las propiedades de tinción de las plaquetas no eran suficientes.

30 Por lo tanto, se sugiere que, cuando se utiliza Azul Nilo como colorante para la medición de las plaquetas, las plaquetas se pueden teñir suficientemente en comparación con los otros colorantes. Además, se sugiere que, cuando las plaquetas se tiñeron con Azul Nilo, las plaquetas pudieron ser detectadas con precisión con la intensidad de luz dispersada hacia adelante y la intensidad de fluorescencia.

5 A continuación, se estudió si las plaquetas podrían ser teñidas específicamente utilizando el reactivo para la medición de las plaquetas del Ejemplo Experimental 45 que contenía azul Nilo y un ácido, incluso cuando la sangre contenía contaminantes tales como partículas de lípidos, de acuerdo con experimentos similares a los descritos en los Ejemplos 9 a 13.

10 Las Figs. 20 y 21 muestran los diagramas de dispersión obtenidos midiendo la sangre que contenía glóbulos rojos de la sangre fracturados y sangre que contenía partículas lipídicas con el reactivo para la medición de las plaquetas del Ejemplo Experimental 45. En cada figura, (a) es un diagrama de dispersión que tiene el eje y de intensidad de la luz dispersada hacia adelante y el eje x de intensidad de fluorescencia, (b) es un diagrama de dispersión en el que el eje y del diagrama de dispersión (a) se convierte en los logaritmos, y (c) es una vista ampliada de la zona en la que aparecen las plaquetas en (b). En (c), la zona donde aparecen las plaquetas se muestra con una línea continua.

15 Los resultados de las Figs. 20 y 21 demuestran que los grupos de plaquetas contenidos en las muestras aparecen en los diagramas de dispersión de manera distintiva de otros componentes de las muestras tales como glóbulos rojos fracturados o partículas de lípidos. De acuerdo con estos resultados, se demuestra que las plaquetas pueden ser detectadas de manera distintiva y pueden ser medidas con precisión con los reactivos para la medición de las plaquetas de la presente invención, incluso cuando la sangre contiene contaminantes, tales como glóbulos rojos fracturados o partículas de lípidos.

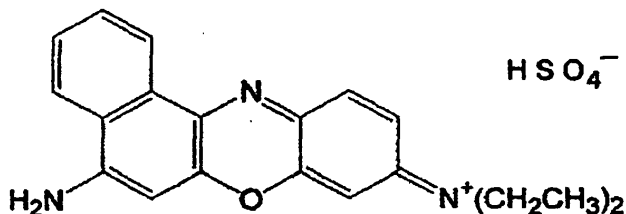
20 La presente solicitud se refiere a las Solicitudes de Patente Japonesas Núms. 2008-36013, 2008-79785 y 2008-247484, respectivamente, presentadas el 18 de febrero de 2008, 26 de Marzo de 2008 y 26 de Septiembre de 2008.

25

REIVINDICACIONES

1. Un reactivo para la medición de las células plaquetarias de la sangre que comprende, como colorante para la tinción de las células plaquetarias de la sangre, un compuesto de la siguiente fórmula (III):

5

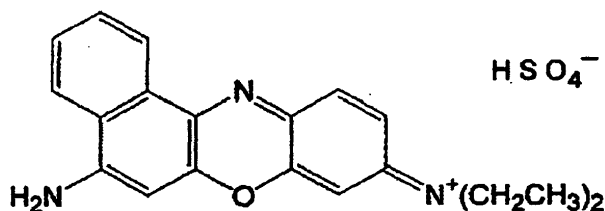


(III)

y un disolvente orgánico soluble en agua, dicho disolvente es etilenglicol; en donde dicho compuesto se disuelve en dicho disolvente orgánico soluble en agua.

2. Un kit de reactivos para la medición de las células plaquetarias de la sangre que comprende:
un primer reactivo que comprende, como colorante para la tinción de las células plaquetarias de la sangre, un compuesto de la siguiente fórmula (III):

10



(III)

y un disolvente orgánico soluble en agua, dicho disolvente es etilenglicol; en donde dicho compuesto se disuelve en dicho disolvente orgánico soluble en agua, y un segundo reactivo que comprende un agente tamponador.

15

3. El kit de reactivos para la medición de las células plaquetarias de la sangre de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el segundo reactivo es un tampón que tiene un pH de 6,0 a 11,0.

20

4. El kit de reactivos para la medición de las células plaquetarias de la sangre de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el segundo reactivo tiene una osmolalidad de 150 a 600 mOsm/kg.

5. El kit de reactivos para la medición de las células plaquetarias de la sangre de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el segundo reactivo comprende adicionalmente un tensioactivo para la aceleración de la tinción de las células plaquetarias de la sangre con el colorante.

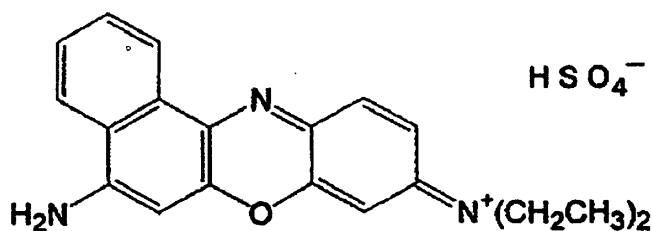
25

6. El kit de reactivos para la medición de las células plaquetarias de la sangre de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el tensioactivo es un tensioactivo catiónico.

30

7. Un método para la medición de las células plaquetarias de la sangre que comprende las etapas de:
mezclar un primer reactivo que comprende, como colorante para la tinción de las células plaquetarias de la sangre, un compuesto de la siguiente fórmula (III):

35

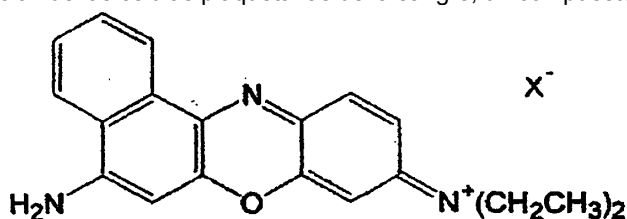


(III) ;

y un disolvente orgánico soluble en agua, dicho disolvente es etilenglicol; en donde dicho compuesto se disuelve en dicho disolvente orgánico soluble en agua, y una muestra con o sin la adición de un segundo reactivo que comprende un agente tamponador para preparar una muestra de medición; aplicar luz a las células de la muestra de medición obtenida para detectar la luz dispersada y la fluorescencia emitida por las células; y detectar las células plaquetarias de la sangre contenidas en la muestra de medición basándose en la luz dispersada y la fluorescencia detectadas.

8. El método para la medición de las células plaquetarias de la sangre de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende adicionalmente una etapa de recuento de las células plaquetarias de la sangre detectadas.

9. Un reactivo para la medición de las células plaquetarias de la sangre que comprende, como colorante para la tinción de las células plaquetarias de la sangre, un compuesto de la siguiente fórmula (II):



(II)

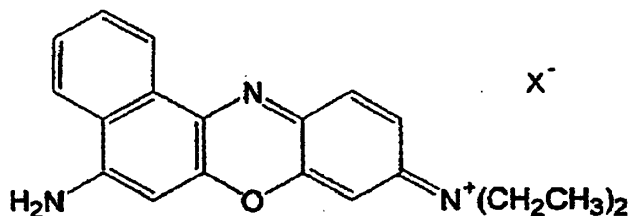
en donde X- es $1/2 \text{SO}_4^{2-}$;
un ácido; y

un disolvente orgánico soluble en agua, dicho disolvente es etilenglicol,

en donde dicho compuesto y dicho ácido se disuelven en dicho disolvente orgánico soluble en agua, y en donde la razón de concentración molar entre el colorante y el ácido es de 10:1 a 1:1.

10. El reactivo para la medición de las células plaquetarias de la sangre de acuerdo con la Reivindicación 9, en donde el ácido es un ácido inorgánico.

11. Un kit de reactivos para la medición de las plaquetas de la sangre que comprende:
un primer reactivo que comprende, como colorante para la tinción de las células plaquetarias de la sangre, un compuesto de la siguiente fórmula (II):



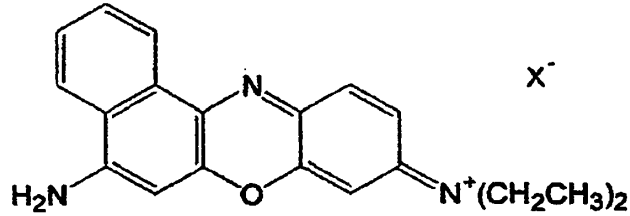
(II)

en donde X- es $1/2 \text{SO}_4^{2-}$; un ácido; y un disolvente orgánico soluble en agua, dicho disolvente es etilenglicol; en donde dicho compuesto y dicho ácido se disuelven en dicho disolvente orgánico soluble en agua, y

un segundo reactivo que comprende un agente tamponador, y en donde la razón de concentración molar entre el colorante y el ácido en el primer reactivo es de 10:1 a

1:1.

12. Un método para medir las células plaquetarias de la sangre que comprende las etapas de:
mezclar un primer reactivo que comprende un compuesto de la siguiente fórmula (II):

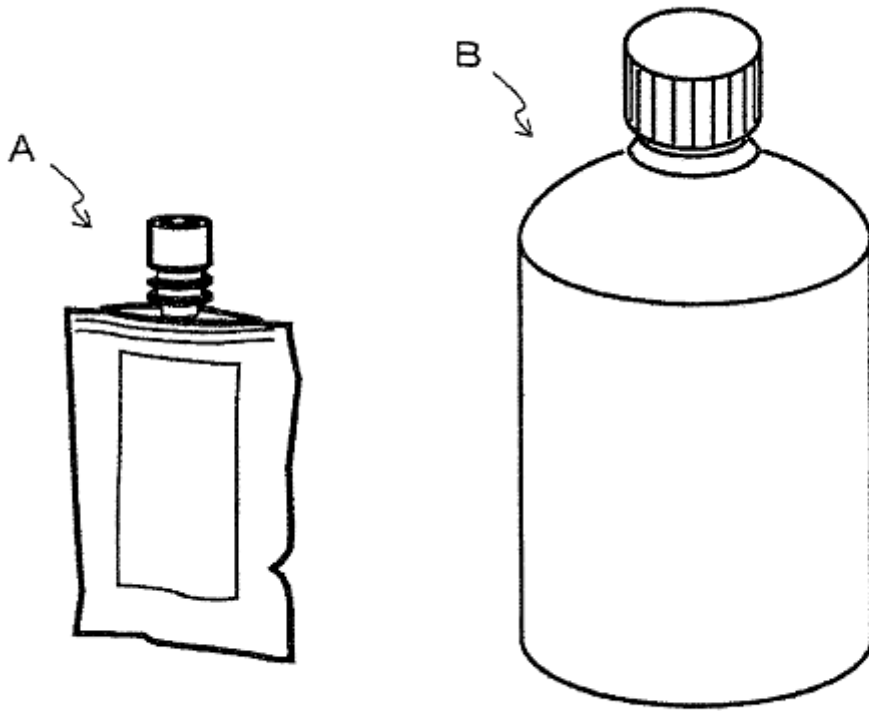


(II)

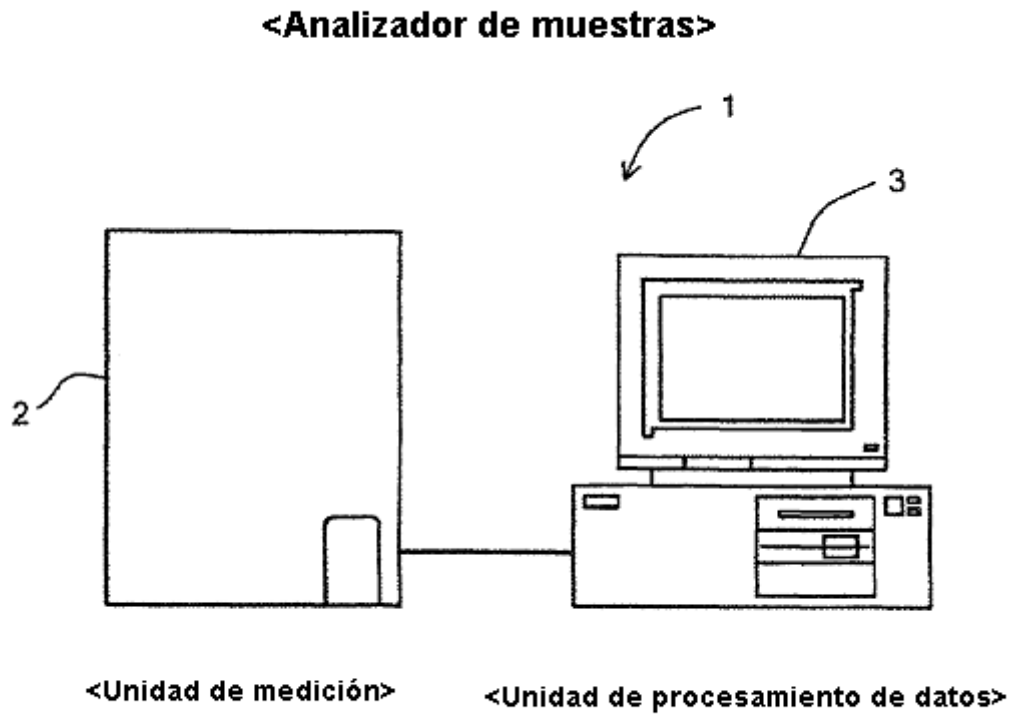
- 5 en donde X^- es $1/2 SO_4^{2-}$; un ácido; y un disolvente orgánico soluble en agua; en donde dicho compuesto
y dicho ácido se disuelven en dicho disolvente orgánico soluble en agua, dicho disolvente es etilenglicol,
10 en donde la razón de concentración molar entre el colorante y el ácido en el primer reactivo es de 10:1 a
1:1, y una muestra con o sin la adición de un segundo reactivo que comprende un agente tamponador
para preparar una muestra de medición;
aplicar luz a las células de la muestra de medición obtenida para detectar la luz dispersada y la
fluorescencia emitida por las células; y
15 detectar las células plaquetarias de la sangre contenidas en la muestra de medición basándose en la luz
dispersada y la fluorescencia detectadas.

13. El método para la medición de las células plaquetarias de la sangre de acuerdo con la reivindicación 12, que
comprende adicionalmente una etapa de recuento de las células plaquetarias de la sangre detectadas.

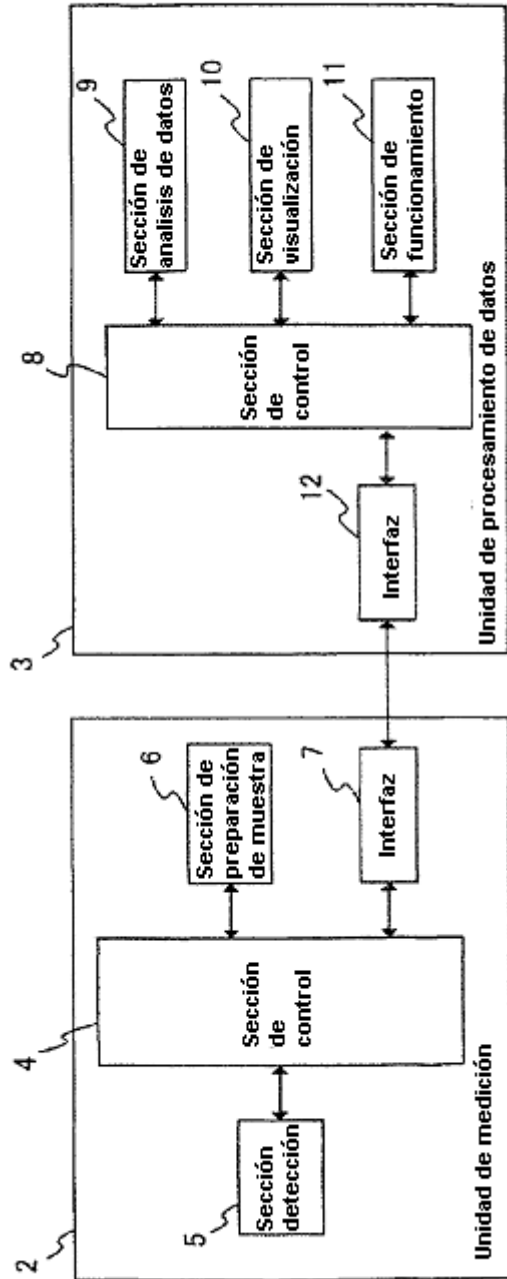
[Fig. 1]



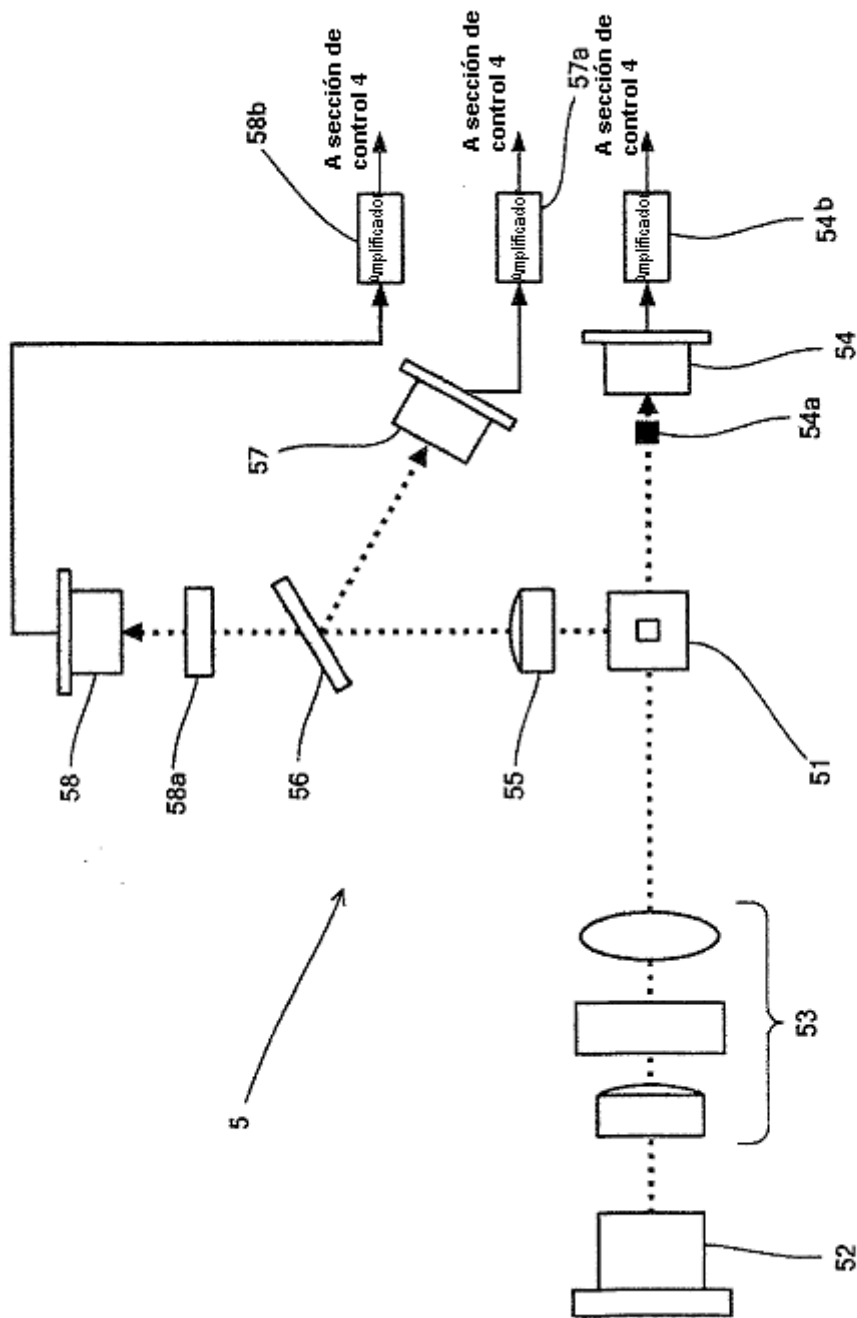
[Fig. 2]



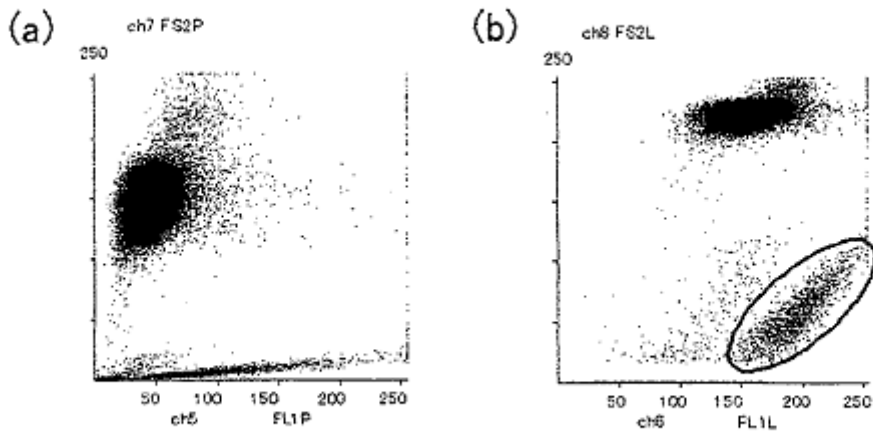
[Fig. 3]



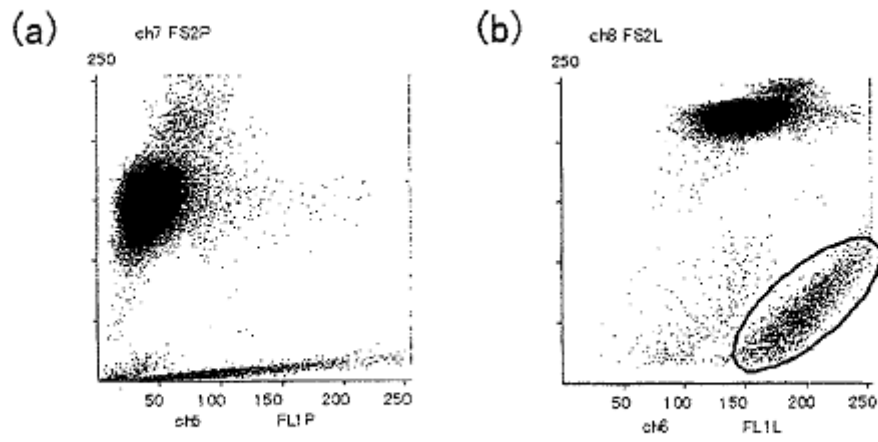
[Fig. 4]



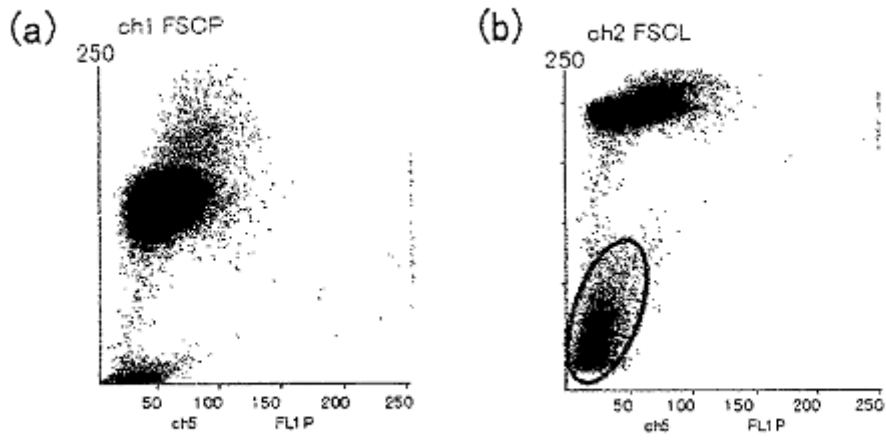
[Fig. 5]



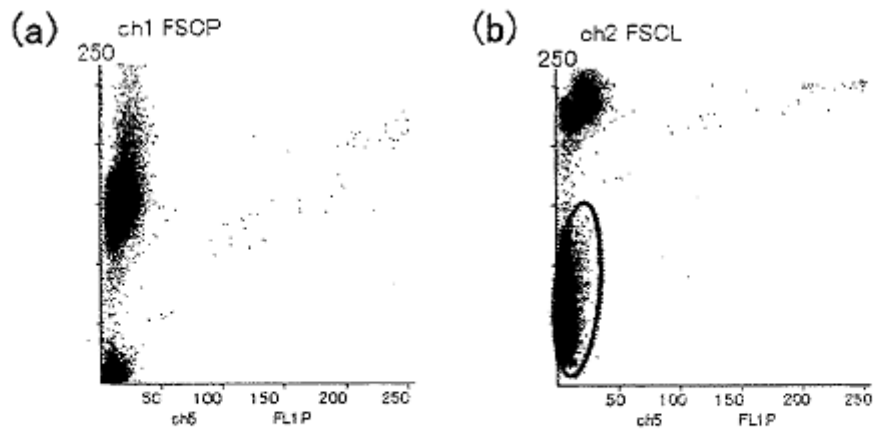
[Fig. 6]



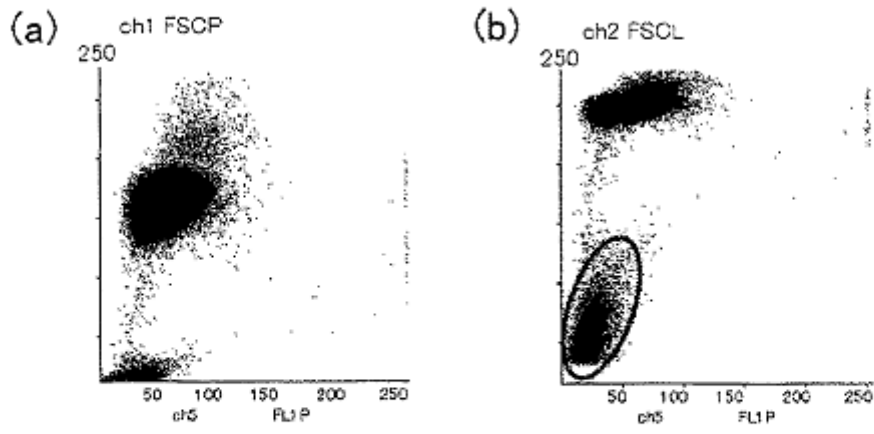
[Fig. 7]



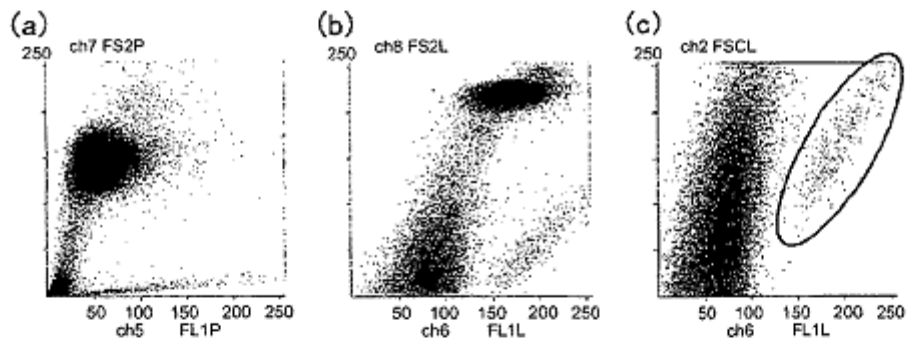
[Fig. 8]



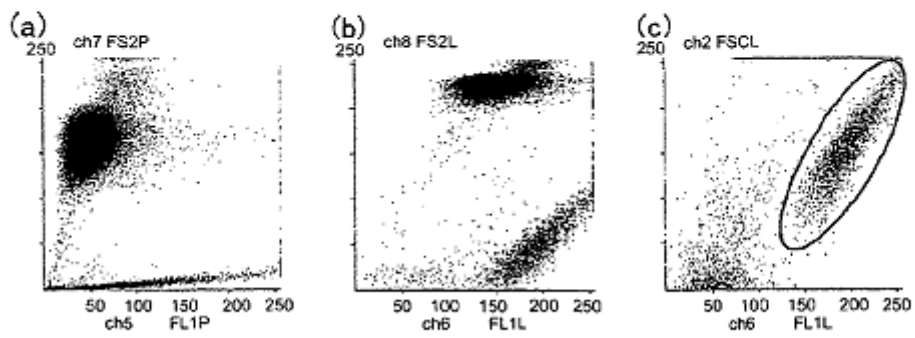
[Fig. 9]



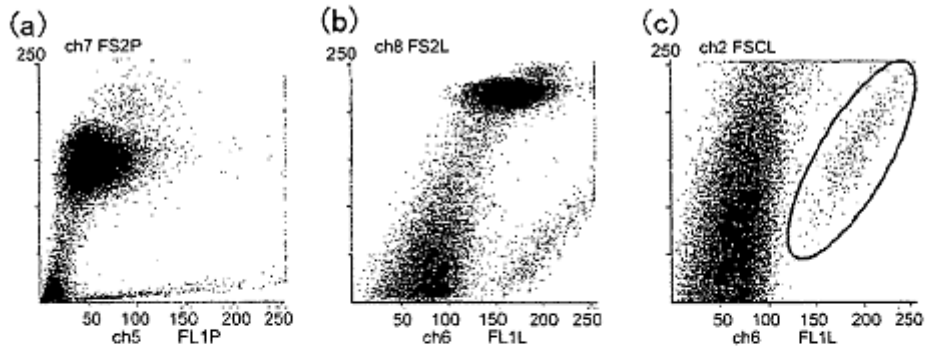
[Fig. 10]



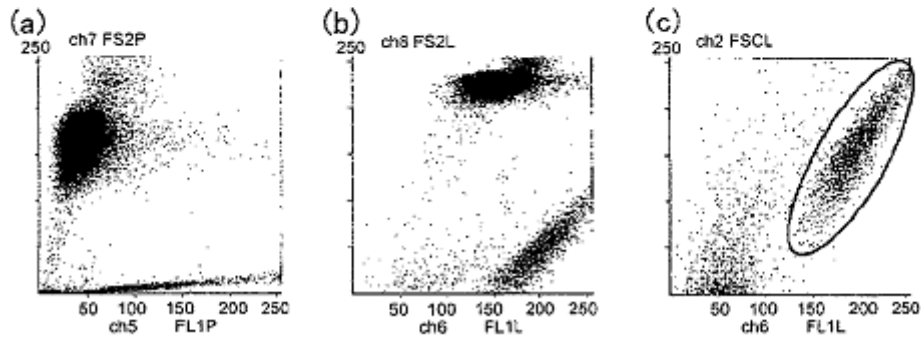
[Fig. 11]



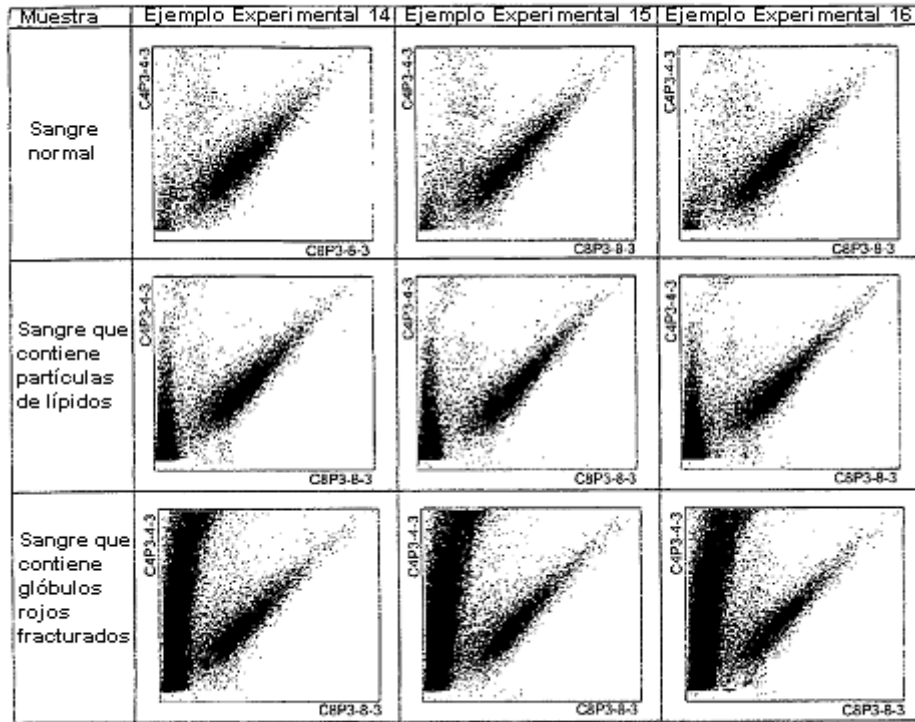
[Fig. 12]



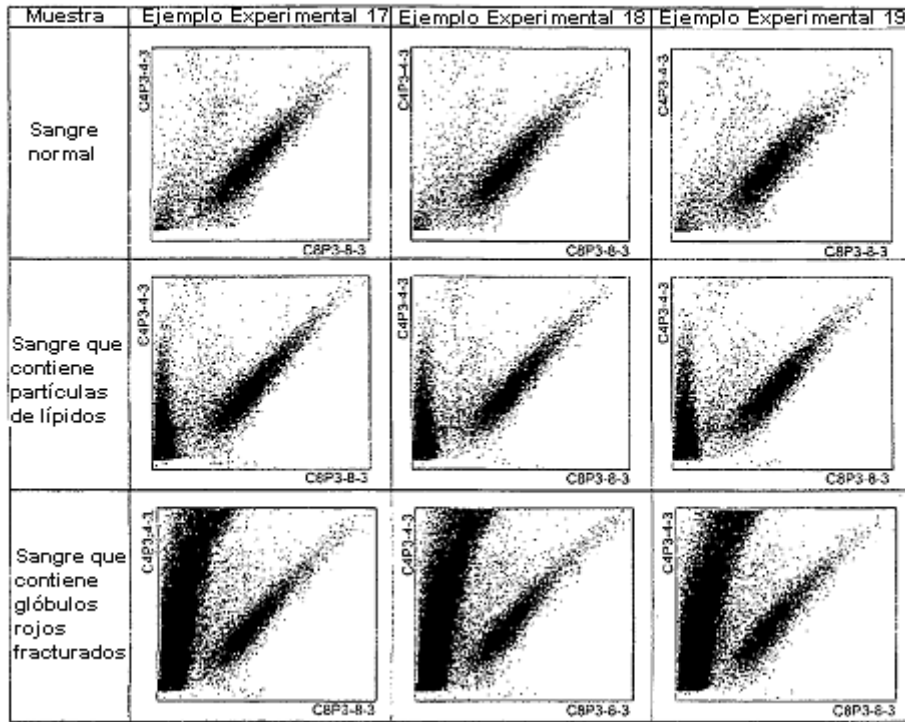
[Fig. 13]



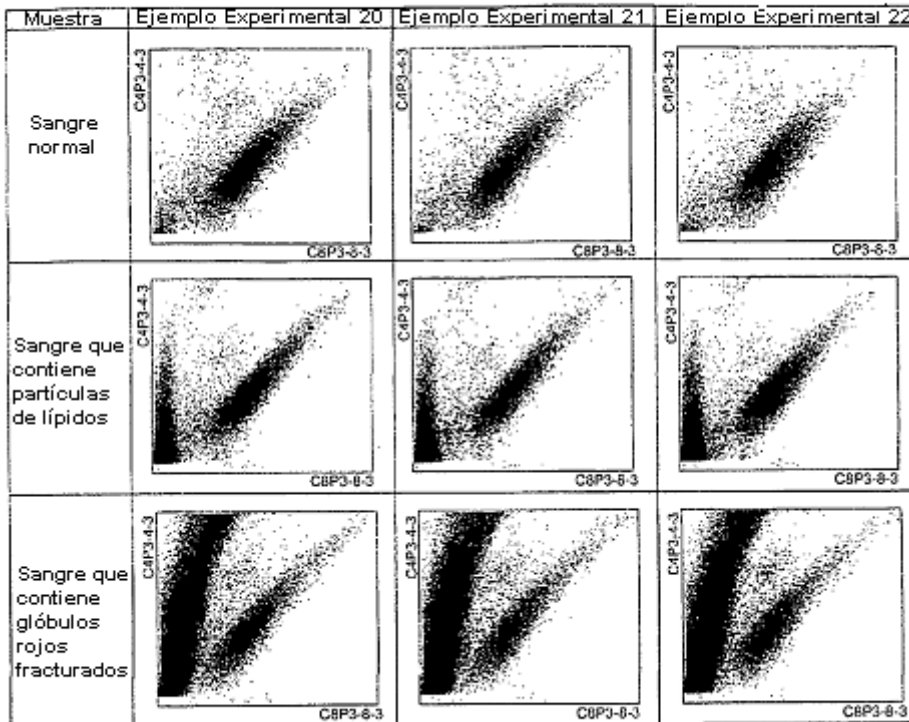
[Fig. 14-1]



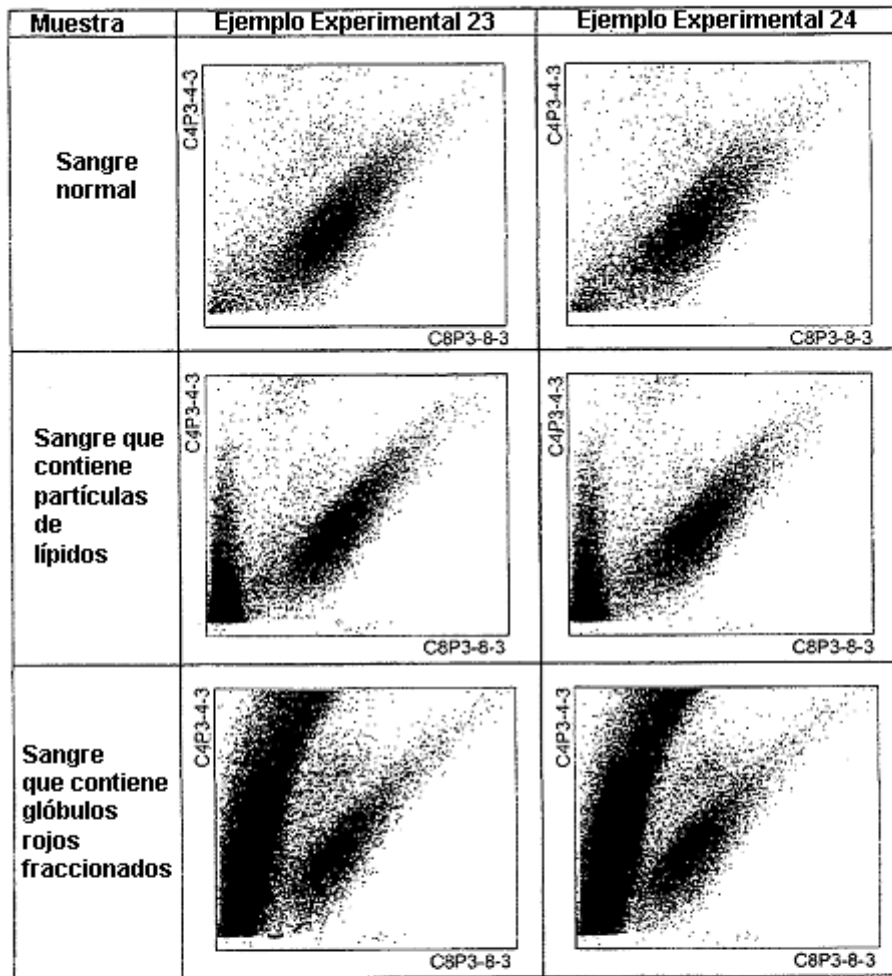
[Fig. 14-2]



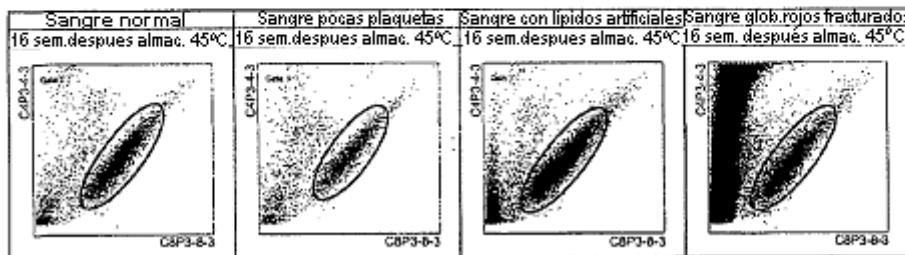
[Fig. 14-3]



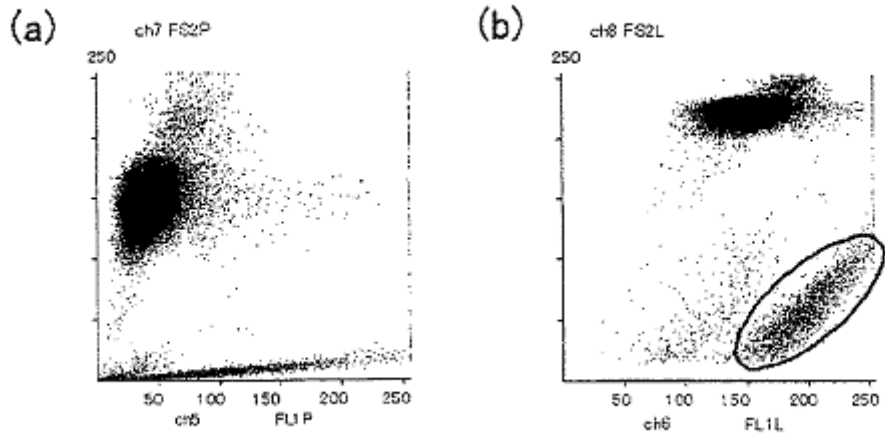
[Fig. 14-4]



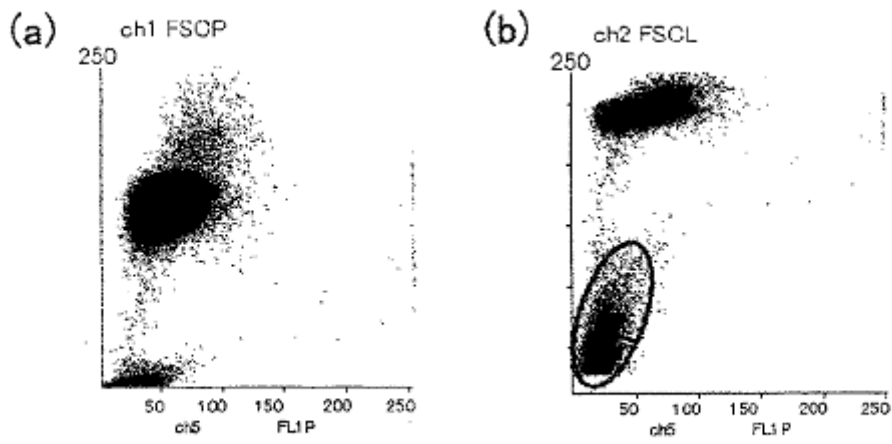
[Fig. 15]



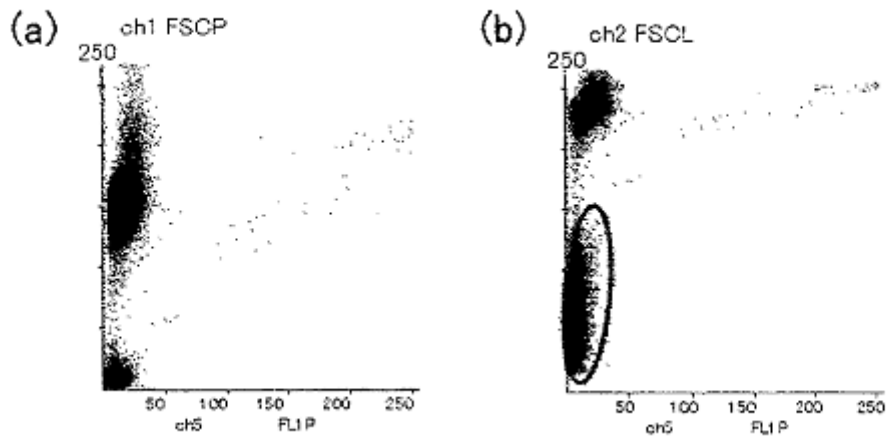
[Fig. 16]



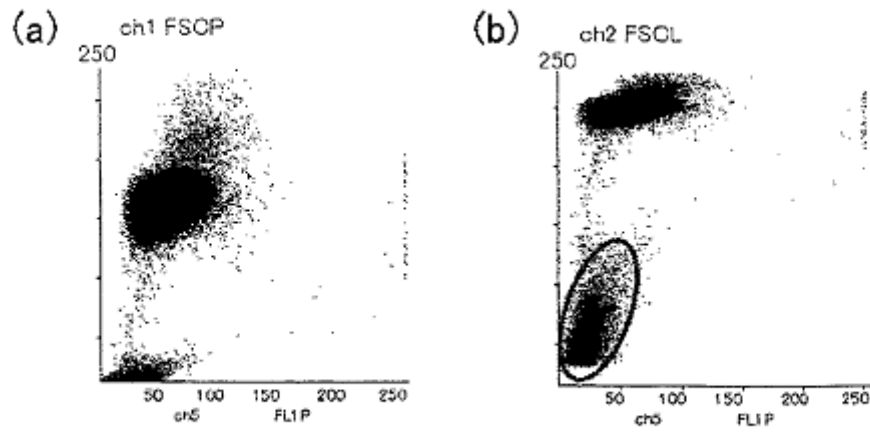
[Fig. 17]



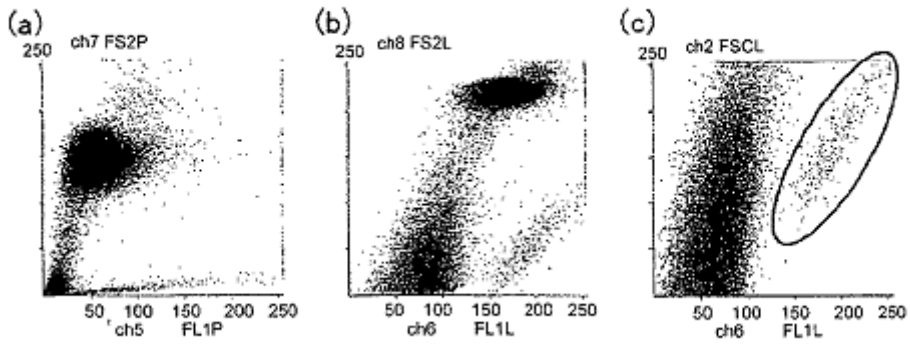
[Fig. 18]



[Fig. 19]



[Fig. 20]



[Fig. 21]

