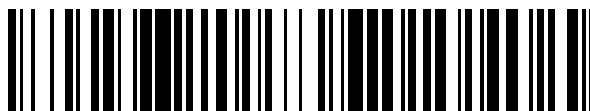


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 739**

51 Int. Cl.:

G01N 33/72 (2006.01)

G01N 33/96 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2009** **E 09807048 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015** **EP 2324350**

54 Título: **Control de referencia para análisis célula a célula**

30 Prioridad:

13.08.2008 US 190772

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2015

73 Titular/es:

BECKMAN COULTER, INC. (100.0%)
250 S. Kraemer Boulevard
Brea, 92821 CA, US

72 Inventor/es:

VAN AGTHOVEN, ANDREAS y
MALERGUE, FABRICE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 536 739 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

Control de referencia para análisis célula a célula

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un control de referencia que contiene análogos celulares formados de células sanguíneas permeadas que contienen proteínas intracelulares agregadas y sitios antigénicos conservados.

10 **Antecedentes de la invención**

La medición cuantitativa de componentes celulares en un análisis célula a célula se lleva a cabo habitualmente sobre un citómetro o sobre un analizador hematológico. Una muestra de sangre se prepara utilizando un reactivo o reactivos específicos y procedimientos específicos y la presencia de componentes celulares se determina utilizando señales de dispersión de luz y de fluorescencia medidas sobre dichos analizadores. Muchos factores físicos o químicos pueden tener un efecto en la relación del componente celular objeto de análisis presente en la célula y la salida de señal del analizador de medición. Sin un control o referencia adecuados, es difícil obtener una medición cuantitativa precisa del componente celular en cuestión. Puede incluirse un control de referencia en las mediciones de una serie de muestras, como un control externo, o bien puede añadirse un control de referencia a cada muestra que desea medirse, a modo de control interno. En este último caso, es necesario que el analizador pueda diferenciar entre un componente celular del control de referencia y el componente celular de las células sanguíneas en la muestra que se está midiendo.

Un control de referencia puede contener una partícula sintética, por ejemplo, una partícula de látex cubierta con un componente celular objeto de análisis en una cantidad conocida. Otros controles de referencia contienen células sanguíneas estabilizadas que tienen cantidades conocidas de componentes celulares objeto de análisis y que son estables durante un período de tiempo dado a una temperatura baja, pero superior al punto de congelación.

Puesto que la variación de señal no es solamente debida a variaciones inherentes al instrumento de medición, sino también a variaciones en la preparación de las muestras para la medición, las partículas de un control de referencia, preferiblemente, se comportan de modo similar a las células sanguíneas de la muestra en la condición de preparación de muestra. En este sentido, las células sanguíneas estabilizadas tienen una ventaja frente a las partículas sintéticas. Sin embargo, los componentes celulares o las propiedades antigénicas de los componentes celulares a menudo se deterioran en el proceso de preparación de las células de control o durante su almacenamiento a una temperatura superior a la de congelación.

El congelamiento de las células y el almacenamiento a temperaturas ultra bajas solucionaría el problema de la degradación de las células de control con el transcurso del tiempo. Sin embargo, los cristales de hielo intracelulares dañan la membrana celular, y deben tomarse precauciones especiales, por ejemplo, la adición de agentes protectores tales como glicerol o dimetilsulfóxido para proteger las células durante el ciclo de congelación y descongelación. Sin embargo, incluso si no están dañadas, las células tratadas a menudo presentan modificaciones sustanciales tras el ciclo de congelación y descongelación que influyen en la posterior medición. Además, los agentes protectores pueden interferir también con el ensayo que deba realizarse.

Por lo tanto, es deseable que las células utilizadas en el control de referencia tengan una morfología celular comparable a la de las células sanguíneas que deben someterse a análisis y que tengan componentes celulares conservados y antígenos conservados de los componentes celulares que deban medirse, y que las células del control de referencia puedan ser sometidas a ciclos de congelación y descongelación sin deteriorar la morfología celular ni los antígenos de los componentes celulares.

Además, aunque puede utilizarse un control de referencia con un valor conocido de un parámetro de interés para corregir la variabilidad interanalítica, es deseable tener un control interno que contenga células marcadas para corregir la variabilidad intraanalítica y la variabilidad interanalítica. El marcaje de las células en un control de referencia hace posible que el instrumento de medición pueda diferenciar entre las células de la muestra que desea medirse y las células de control añadidas a la muestra y utilizar dichas células marcadas como un control interno del proceso de medición.

Además, en las pruebas analíticas célula a célula para medir los componentes intracelulares utilizando anticuerpos u otras muestras moleculares, es necesario permear la membrana celular de modo que los anticuerpos u otras muestras moleculares puedan penetrar a través de la membrana celular. Para dichas pruebas analíticas, es deseable utilizar un control de referencia que contenga células que tengan su membrana celular ya permeada, lo que hace posible que las muestras grandes, como por ejemplo los anticuerpos, penetren a través de ella.

En US-4.777.139 (Wong y col.) se describe un control hematológico con componentes de glóbulos rojos de estabilidad mejorada. Wong y col. describen la exposición de glóbulos rojos lavados a un aldehído insaturado, como por ejemplo acroleína (propenal), en condiciones suficientes para aumentar la estabilidad de las células sin afectar a la capacidad de lisis celular por parte de un reactivo lítico. Tras el tratamiento, las células tratadas se lavan y se

suspenden en un medio de suspensión estabilizante. El control de referencia se almacena a una temperatura baja, pero superior al punto de congelación. Las membranas de dichas células estabilizadoras no son permeadas.

La hemoglobina celular de los glóbulos rojos es un parámetro importante para el diagnóstico clínico. En la mayoría de los analizadores hematológicos, la concentración total de hemoglobina de una muestra de sangre se obtiene lisando los glóbulos rojos en una muestra de sangre con un reactivo lítico y midiendo un cromógeno formado por las moléculas de hemoglobina liberadas mediante una medición espectrofotométrica. La hemoglobina corpuscular media (HCM) de una muestra de sangre se obtiene a partir del número de glóbulos rojos (RBC) y de la concentración total de hemoglobina de la muestra de sangre. La HMC es un valor promedio de todos los glóbulos rojos y no representa el contenido de hemoglobina de los glóbulos rojos por separado.

En cambio, la medición de la hemoglobina celular en un citómetro de flujo es una medición célula a célula que proporciona información diagnóstica no disponible mediante la HMC. Campbell y col. en *Cytometry* 35, págs. 242-248 (1999), llevaron a cabo una prueba con un citómetro de flujo para analizar la hemoglobina en glóbulos rojos individuales utilizando un anticuerpo anti-hemoglobina A fluorescente. Burshteyn y col. (documento de publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2004/0214243) llevaron a cabo una prueba analítica con un citómetro de flujo para analizar la hemoglobina utilizando un anticuerpo anti-pan hemoglobina. Puesto que los glóbulos rojos tienen una alta concentración de hemoglobina, para medir el total de hemoglobina celular utilizando anticuerpos se requiere una gran cantidad de anticuerpos marcados con fluorescencia. Además, existen posibles efectos debidos al impedimento estérico de la unión de anticuerpos o de la extinción de la fluorescencia debido a la elevada densidad de la hemoglobina en la célula. Por lo tanto, es deseable disponer de un método que permita medir la hemoglobina celular total sin tener que depender del uso de anticuerpos.

La identificación y/o cuantificación de variantes y de formas aberrantes de hemoglobina es importante para el diagnóstico clínico de diversas enfermedades, por ejemplo, la anemia drepanocítica, la talasemia y la diabetes. La medición de la hemoglobina A_{1c} ha sido una de las mediciones de variante de hemoglobina utilizadas con mayor frecuencia y es una medición clínica importante en el caso de los enfermos de diabetes.

Se sabe que aproximadamente el 90% de la hemoglobina total es no glicosilada. La mayor parte de la hemoglobina no glicosilada es HbA no glicosilada, conocida como HbA₀. La hemoglobina glicada consiste en una serie de componentes minoritarios de la hemoglobina que se forman debido a la unión de diversos azúcares a la molécula de hemoglobina. El eritrocito humano es completamente permeable a la glucosa. En cada eritrocito, la hemoglobina glicada se forma a una velocidad que es directamente proporcional a la concentración de glucosa en el entorno. La reacción de glucosa con hemoglobina es no enzimática, irreversible y lenta, de modo que solamente una parte de la hemoglobina total es glicada a lo largo de la vida de un eritrocito (120 días). En consecuencia, la medición de la hemoglobina glicada proporciona una media "móvil" ponderada de los niveles de glucosa en la sangre que puede utilizarse para hacer un seguimiento de los niveles de glucosa en la sangre a largo plazo, proporcionando un índice de la concentración promedio de glucosa en la sangre durante los 2 o 3 últimos meses. La aplicación clínica más importante se obtiene en la evaluación del control glicémico en un enfermo de diabetes.

La hemoglobina A_{1c} (HbA_{1c}) es un tipo específico de hemoglobina glicada y es la especie de hemoglobina más importante en relación con la diabetes. La HbA_{1c} corresponde aproximadamente al 3%-6% de la hemoglobina total en las personas no diabéticas y al 20% o más en las personas con diabetes mal controlada (Goldstein, y col., *Clin. Chem.* 32: B64-B70, 1986). La determinación de la concentración de HbA_{1c} es útil para el diagnóstico y el seguimiento de la diabetes mellitus.

En las últimas décadas se han desarrollado diversos métodos de análisis estándar de HbA_{1c}. Un método estándar de medición de HbA_{1c} utiliza cromatografía líquida de intercambio iónico de alta eficacia (HPLC), que separa la HbA_{1c} y otros componentes minoritarios de la hemoglobina HbA₀ y los analiza en función de las diferencias en densidad de carga. Otro método cromatográfico es la cromatografía de afinidad al boronato, que utiliza una matriz de gel que contiene ácido borónico inmovilizado para capturar el grupo cis-diol de la hemoglobina glicada. En dichos métodos, una muestra de sangre es lisada primero con un reactivo lítico y el hemolisado formado se utiliza a continuación en el análisis cromatográfico.

Otro método de análisis de HbA_{1c} se fundamenta en la inmunoturbidimetría. En este método, una muestra de sangre es lisada primero con un reactivo lítico y el hemolisado formado se utiliza en dos mediciones diferentes. La concentración total de hemoglobina se mide mediante un método colorimétrico. La concentración de HbA_{1c} se mide utilizando un método de inmunoinhibición turbidimétrica, en el que los anticuerpos de HbA_{1c} en un reactivo se unen a los HbA_{1c} de la muestra formando complejos antígeno-anticuerpo solubles. Los polihaptenos del reactivo se unen entonces con los anticuerpos sobrantes y el complejo aglutinado resultante se mide mediante procedimientos turbidimétricos. La turbidez de la mezcla de muestra es inversamente proporcional a la concentración de HbA_{1c} en la muestra. El porcentaje de HbA_{1c} de la muestra se calcula utilizando el total de hemoglobina y la concentración de HbA_{1c}.

Estos métodos estándar de análisis de HbA_{1c} son análisis generales de la concentración de hemoglobina total y del porcentaje de HbA_{1c} del hemolisado obtenido a partir de todos los glóbulos rojos lisados de una muestra, incluyendo tanto los glóbulos rojos maduros como los reticulocitos. Este resultado solamente puede utilizarse como un índice de

la concentración media de glucosa en la sangre en el transcurso de los 2 o 3 últimos meses. No representa el porcentaje de HbA1c celular de los glóbulos rojos individuales y no proporciona información acerca del porcentaje de HbA1c entre los glóbulos rojos maduros y los glóbulos rojos inmaduros. Por lo tanto, estos métodos estándar no proporcionan información precoz acerca de la respuesta por parte del paciente a los tratamientos médicos.

Diversos controles de HbA1c se encuentran disponibles a nivel comercial. La mayor parte de estos controles son en forma de polvos de proteína liofilizada o soluciones líquidas hemolizadas utilizadas para los métodos anteriormente descritos.

Recientemente, el documento US-7.361.513 (Ryan y col.) describe controles celulares para la medición de HbA_{1c} correspondiente a hemoglobina glicada, adecuados para usar en intercambio iónico, o en la cromatografía de afinidad y detección inmunológica anteriormente descrita. Ryan y col. describen un método de preparación del control de referencia que incluye lavar una muestra de sangre, retirar los glóbulos blancos y las plaquetas de los glóbulos rojos, fijar los glóbulos rojos con glutaraldehído, lavar y suspender los glóbulos rojos suspendidos con un diluyente estabilizante que contiene glucosa, fluoruro sódico e inhibidor de tripsina de semilla de soja. Ryan y col. describen este control de referencia que es estable durante 300 días a 6 °C y que muestra su utilidad en varios analizadores de química clínica que utilizan HPLC de intercambio iónico, cromatografía de afinidad al boronato, o inmunoturbidimetría. Utilizando dichos métodos, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, los glóbulos rojos estabilizados a los que hacen referencia Ryan y col. se lisan primero y a continuación se mide la hemoglobina total y la concentración de HbA1c total de todos los glóbulos rojos del control. Ryan y col. no describen la permeabilización de la membrana celular de los glóbulos rojos fijados para hacer que los anticuerpos sean permeables para el inmunoensayo célula a célula en citómetro de flujo.

En base a lo anterior, es por lo tanto deseable proporcionar un control de referencia que contenga análogos celulares que tengan una membrana celular permeada para el análisis célula a célula de HbA1c, otras variantes de hemoglobina, u otros componentes celulares en citómetro de flujo. Es también deseable disponer de un control de referencia en donde la hemoglobina celular total de los análogos celulares pueda medirse en una etapa junto con una variante de hemoglobina. Es deseable además disponer de un control de referencia que tenga análogos celulares marcados de modo que los análogos puedan ser fácilmente identificados y diferenciados de los glóbulos rojos que deban medirse utilizando dispositivos de detección comunes. Además, es deseable disponer de un control de referencia que pueda congelarse y descongelarse para un almacenamiento duradero, manteniendo al mismo tiempo los componentes celulares de los análogos celulares que deban medirse, por ejemplo, manteniendo los sitios antigénicos de las proteínas. Además, es también deseable disponer de un control de referencia que sea resistente al tratamiento de congelación-descongelación sin utilizar agentes protectores que puedan interferir con el ensayo que deba realizarse.

Sumario de la invención

La invención se define en su más amplio sentido mediante las reivindicaciones anexas.

La presente invención se refiere a un control de referencia congelado para el análisis célula a célula en un analizador de tipo citómetro de flujo. El control de referencia congelado comprende análogos celulares hechos de glóbulos rojos permeados que contienen en su interior proteínas intracelulares agregadas y uno o más sitios antigénicos de los mismos conservados, con una membrana celular permeable a un anticuerpo; y una solución de almacenamiento que comprende una sal a una concentración de 0,05 M a 2 M y un sacárido a una concentración de 0,1 M a 2 M, en donde dicha solución de almacenamiento no contiene agentes protectores que interfieren con el análisis que debe realizarse; en donde dichos análogos celulares son suspendidos en dicha solución de almacenamiento y dichos análogos celulares mantienen dichos uno o más sitios antigénicos conservados de dichas proteínas después de descongelar dicho control de referencia congelado.

En una realización, el control de referencia comprende un análogo celular marcado que comprende un marcador celular unido a un componente celular de glóbulos marcados. En una realización particular, los análogos celulares son análogos de glóbulos rojos formados de glóbulos rojos que comprenden sitios antigénicos conservados de una o más variantes de hemoglobina.

También se describe un método de preparación del control de referencia de la presente invención. El método comprende mezclar un reactivo de permeación con células sanguíneas e incubar la mezcla de permeación formada durante un período de tiempo suficiente para producir la agregación de las proteínas intracelulares dentro de las células sanguíneas mientras se conservan los sitios antigénicos de las mismas, y hacer que la membrana celular se vuelva permeable a un anticuerpo; añadir un reactivo de neutralización a la mezcla de permeación para inhibir posteriores reacciones del reactivo de permeación; lavar las células sanguíneas permeadas con una solución de lavado para retirar los reactivos de permeación y de neutralización de las células sanguíneas permeadas; suspender las células sanguíneas permeadas en una solución de almacenamiento para formar el control de referencia. Preferiblemente, el control de referencia se congela para el almacenamiento y se descongela antes de utilizarlo.

También se describe un método para usar el control de referencia de la presente invención en una medición célula a célula de componentes celulares en un analizador de tipo citómetro de flujo. El método está dirigido al uso de un control de referencia para la medición de hemoglobina celular de una muestra de sangre en un analizador de tipo citómetro de flujo. El método comprende proporcionar un control de referencia que comprende análogos de glóbulos

rojos formados de células sanguíneas que contienen en su interior proteínas intracelulares agregadas, donde el control de referencia tiene un valor de referencia de hemoglobina celular promedio; medir señales de dispersión lateral célula a célula de análogos de glóbulos rojos del control de referencia en el analizador de tipo citómetro de flujo; y usar las señales de dispersión lateral obtenidas y el valor de referencia del control de referencia para determinar la hemoglobina celular de glóbulos rojos individuales de una muestra que debe medirse.

El método puede comprender además mezclar dicho control de referencia con un reactivo de permeación; añadir posteriormente un reactivo de neutralización que contiene un anticuerpo marcado con fluorescencia específico para dicha variante de hemoglobina y permitir que dicho anticuerpo se una a dicha variante de hemoglobina dentro de dichos análogos de glóbulos rojos; medir las señales de fluorescencia célula a célula de dichos análogos de glóbulos rojos de dicho control de referencia junto con dichas señales de dispersión lateral de medida; y utilizar las señales de fluorescencia obtenidas y las señales de dispersión lateral obtenidas y un valor de referencia del porcentaje de variante de hemoglobina de dicho control de referencia para determinar un porcentaje de dicha variante de hemoglobina de glóbulos rojos individuales de una muestra que deba medirse. La variante de hemoglobina comprende hemoglobinas glicadas, hemoglobina fetal, o formas aberrantes de hemoglobina.

Otro método va dirigido al uso de un control de referencia marcado para la medición de hemoglobina celular de una muestra de sangre en un analizador de tipo citómetro de flujo. El método comprende mezclar un volumen de sangre con un reactivo de permeación para formar una primera mezcla de muestra; añadir un control de referencia que contiene análogos de glóbulos rojos y que tiene un valor de referencia de hemoglobina celular en dicha primera mezcla de muestra, estando formados dichos análogos de glóbulos rojos por glóbulos rojos tratados que contienen en su interior proteínas intracelulares agregadas y sitios antigénicos conservados de una variante de hemoglobina, y con membrana celular permeable a un anticuerpo, y comprendiendo dichos análogos de glóbulos rojos un tinte fluorescente unido a proteínas celulares; añadir posteriormente un reactivo de neutralización para formar una segunda muestra de mezcla; medir señales de dispersión lateral célula a célula y señales de fluorescencia a una primera longitud de onda de dichos glóbulos rojos de dicha sangre y dichos análogos de glóbulos rojos de dicho control de referencia en dicho analizador de tipo citómetro de flujo; diferenciar dichos glóbulos rojos de dicha sangre con respecto a dichos análogos de glóbulos rojos de dicho control de referencia utilizando señales de fluorescencia obtenidas a dicha primera longitud de onda; y determinar la hemoglobina celular de dichos glóbulos rojos utilizando dichas señales de dispersión celular de dichos glóbulos rojos y de dichos análogos de glóbulos rojos, y dicho valor de referencia de hemoglobina celular de dicho control de referencia.

El método comprende además mezclar dicha sangre con un tinte de ácido nucleico para teñir RNA antes de dicho mezclado de dicha sangre con dicho reactivo de permeación; diferenciar reticulocitos de glóbulos rojos maduros de dicha sangre y de dichos análogos de glóbulos rojos utilizando señales de fluorescencia a dicha primera longitud de onda; y determinar la hemoglobina celular de dichos reticulocitos y dichos glóbulos rojos maduros utilizando dichas señales de dispersión lateral y dicho valor de referencia de hemoglobina celular de dicho control de referencia.

Además, el reactivo de neutralización puede contener además un anticuerpo marcado con fluorescencia específico para dicha variante de hemoglobina. El método comprende además incubar dicha segunda mezcla de muestra para permitir que dicho anticuerpo marcado se una a dicha variante de hemoglobina en dichos reticulocitos y dichos glóbulos rojos maduros de dicha sangre, y en dichos análogos de glóbulos rojos de dicho control de referencia; medir señales de fluorescencia célula a célula a una segunda longitud de onda de dichos reticulocitos y dichos glóbulos rojos maduros de dicha sangre, y en dichos análogos de glóbulos rojos de dicho control de referencia, junto con la medición de dichas señales de dispersión lateral y dichas señales de fluorescencia a dicha primera longitud de onda; y determinar un porcentaje celular de dicha variante de hemoglobina en dichos reticulocitos y dichos glóbulos rojos maduros, respectivamente, utilizando señales de fluorescencia a dicha segunda longitud de onda y dichas señales de dispersión lateral, y un valor de referencia de dicho porcentaje de variante de hemoglobina de dicho control de referencia.

Las ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción junto con los dibujos anexos que muestran realizaciones ilustrativas de la invención.

Breve descripción de los dibujos

Las Figs. 1A, 1B y 1C muestran diagramas de dispersión frontal frente a dispersión lateral, dispersión frontal frente a FL1, y FL1 frente a FL4 de una muestra de sangre normal que contenía un control de referencia marcado que comprendía los análogos de glóbulos rojos formados de una muestra de sangre de un paciente diabético, como se describe en el Ejemplo 3. En los diagramas de dispersión todos los ejes están en escalas logarítmicas.

Las Figs. 2A y 2B muestran la dispersión lateral media y FL4 media de los glóbulos rojos de una muestra (A) de sangre humana normal y el control interno (B), respectivamente, obtenidas en diferentes momentos posteriores a la descongelación del control de referencia, como se describe en el Ejemplo 4.

La Fig. 3 muestra el cambio de porcentaje de HbA1c con el cambio del voltaje del PMT utilizado para la medición de señales FL4, y el efecto corrector logrado utilizando el control de referencia de la presente invención.

La Fig. 4 muestra el cambio de porcentaje de HbA1c con el cambio de la concentración de glóbulos rojos de una muestra de sangre reconstituida y el efecto corrector logrado utilizando el control de referencia de la presente invención.

Las Figs. 5A y 5B muestran las correlaciones de porcentajes de HbA1c obtenidas utilizando el método de la presente invención con respecto a los resultados obtenidos mediante los métodos estándar del laboratorio de referencia anteriormente indicado y tras la transformación matemática, respectivamente, como se describe en el Ejemplo 7.

Las Figs. 6A a 6F muestran las correlaciones de porcentajes de HbA1c obtenidas utilizando el método de la presente invención con respecto a los resultados obtenidos mediante los métodos estándar del laboratorio de referencia utilizando y sin utilizar, respectivamente, el control interno, como se describe en el Ejemplo 8.

Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un control de referencia que contiene análogos celulares para análisis célula a célula en analizadores de tipo citómetro de flujo.

El control de referencia comprende análogos celulares formados de células sanguíneas permeadas que contienen en su interior proteínas intracelulares agregadas y uno o más sitios antigénicos de los mismos conservados y que tienen membrana celular permeable a uno o más anticuerpos, y un medio de suspensión. El control de referencia se congela después de prepararlo, y se descongela antes de utilizarlo.

En una realización específica, el control de referencia comprende análogos de glóbulos rojos formados de glóbulos rojos permeados que contienen en su interior proteínas intracelulares agregadas y uno o más sitios antigénicos conservados de variantes de hemoglobina y que tienen membrana celular permeable a uno o más anticuerpos, específicos para sitios antigénicos de variantes de hemoglobina.

A continuación se describe en detalle el método de preparación del control de referencia. El método comprende las siguientes etapas de procesamiento:

(a) mezclar un reactivo de permeación con glóbulos rojos e incubar la mezcla de permeación formada durante un período de tiempo suficiente para conseguir la agregación de proteínas intracelulares dentro de los glóbulos conservando al mismo tiempo los sitios antigénicos de los mismos, y hacer que la membrana celular se vuelva permeable a uno o más anticuerpos;

(b) añadir un agente de neutralización a la mezcla de permeación para inhibir reacciones adicionales del reactivo de permeación;

(c) lavar las células sanguíneas permeadas con una solución de lavado para retirar los reactivos de permeación y de neutralización de las células sanguíneas tratadas o permeadas;

(d) suspender las células sanguíneas permeadas en una solución de almacenamiento para formar el control de referencia en forma de suspensión análoga.

Para un almacenamiento duradero, el control de referencia se congela después de su preparación y se mantiene congelado durante el envío, como se describe a continuación. El control de referencia puede ser descongelado por el usuario de forma natural a temperatura ambiente antes de su uso. El control de referencia puede utilizarse como un control interno o externo para análisis célula a célula en analizadores de tipo citómetro de flujo, como se describe a continuación.

Las células sanguíneas se toman de forma típica de sangre periférica (también llamada sangre entera) de un individuo adecuado, incluido, aunque de forma no limitativa, un mamífero, un ave o un reptil. Con el fin de medir una condición clínica específica, la sangre se extrae preferiblemente de un individuo humano, incluido tanto un individuo normal como pacientes a los que se les ha diagnosticado una condición clínica específica de interés y en los que, por ese motivo, un componente celular de interés, como por ejemplo un antígeno, está presente o presente de forma elevada. Por ejemplo, para preparar un control de referencia para mediciones de HbA1c, puede extraerse sangre de un paciente al que se le ha diagnosticado diabetes. Para un control de referencia para la medición de anemia drepanocítica o talasemia, puede extraerse sangre de un paciente que padece de las respectivas enfermedades. En otras situaciones, puede extraerse sangre de un paciente que tiene un componente celular de interés anormalmente bajo.

La sangre se recoge en recipientes que contienen un anticoagulante. Puede usarse ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) u otros anticoagulantes utilizados habitualmente, tales como heparina y citrato de sodio. La sangre puede almacenarse a 4 °C, antes de tratarla, preferiblemente durante no más de tres días.

Antes de mezclar el reactivo de permeación, las células sanguíneas de interés pueden aislarse utilizando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, centrifugación, diálisis u otros métodos adecuados. Por ejemplo, cuando se preparan análogos de glóbulos blancos, los glóbulos blancos pueden separarse de los glóbulos rojos separando la capa leuco-plaquetaria tras la centrifugación de la sangre entera. Se ha descubierto, sin embargo, que cuando se

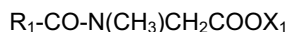
preparan análogos de glóbulos rojos para la medición de hemoglobina celular utilizando el proceso anteriormente descrito, no es necesario separar los glóbulos blancos y las plaquetas de los glóbulos rojos, porque en un análisis célula a célula utilizando mediciones por dispersión de luz y/o fluorescencia, las plaquetas y los glóbulos blancos pueden diferenciarse de los análogos de glóbulos rojos utilizando señales de dispersión de luz y/o fluorescencia.

El Ejemplo 2 ilustra un proceso ilustrativo de preparación de análogos de glóbulos rojos marcados utilizando sangre entera con el método de la presente invención anteriormente descrito. La preparación del control de referencia se describe específicamente en un proceso de preparación de un análogo de glóbulos rojos marcado que se describirá más adelante de forma más detallada. Sin embargo, el proceso, a diferencia de las etapas relacionadas con el marcado, puede utilizarse para preparar análogos celulares no marcados. Se observa además que cuando se preparan los análogos celulares sin un marcaje de fluorescencia, no es necesario lavar las células sanguíneas, y la sangre entera puede utilizarse directamente para preparar el control de referencia. Además, el proceso puede utilizarse también para preparar otros análogos celulares tales como glóbulos blancos, o subpoblaciones específicas de glóbulos blancos.

Con el fin de medir la hemoglobina celular, los glóbulos rojos marcados preferiblemente se exponen también a un reactivo de esferación para proporcionar a los glóbulos rojos forma de esfera, antes de tratarlos con el reactivo de permeación. La etapa de esferación es opcional. Además, cuando se prepara un análogo de glóbulos blancos, dicha etapa no es necesaria.

Un reactivo de permeación utilizado en la presente invención se denomina también reactivo de permeabilización y estabilización celular, y su función en la permeación de la membrana celular y en la conservación de los componentes celulares para las mediciones por citometría de flujo se ha descrito en US-20060178294 A1.

Por ejemplo, el reactivo de permeación es una solución acuosa que comprende N-acilsarcosina o una sal de la misma representada por la siguiente estructura molecular:



en la que R_1 es un grupo alquilo o alquileo que tiene de 8 a 18 átomos de carbono, y X_1 es H, Na^+ , o K^+ , y uno o más agentes de ajuste del pH para ajustar el pH del reactivo a menos de 7. El reactivo de permeación es preferiblemente ligeramente ácido, con un pH en un intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 6. Más preferiblemente, el pH del reactivo es de aproximadamente 4,6 a aproximadamente 5,6.

Preferiblemente, el agente de regulación del pH es una base o un ácido fuerte, por lo que puede usarse una pequeña cantidad para ajustar el pH en el intervalo deseado. Por ejemplo, para ajustar el pH entre 4 y 6 se usa ácido libre de N-acilsarcosina y pirrolidina, una base orgánica fuerte, o NaOH, una base inorgánica fuerte. Si se usa sal de N-acilsarcosina, puede usarse un ácido fuerte para ajustar el pH, por ejemplo HCl. Además, puede usarse un tampón orgánico para mantener el pH. En un ejemplo se usa ácido succínico, que tiene un pK_{a1} de 4,19 y un pK_{a2} de 5,57.

El reactivo de permeación tiene una baja fuerza iónica definida por una conductividad inferior a 9,0 mS/cm. Se ha descubierto que tras exponer las células al reactivo de permeación, la agregación de la proteína intracelular es más eficaz para valores de fuerza iónica bajos. La fuerza iónica deseada de la composición de reactivo acuoso se cuantifica a partir de la conductividad del reactivo. Se cree que la agregación de la proteína intracelular es necesaria para conservar la integridad celular después de la permeación. Cuando la fuerza iónica del reactivo de permeación es demasiado alta, por ejemplo cuando la conductividad del reactivo es 9 mS/cm o superior, el reactivo ya no puede agregar proteínas intracelulares y las células pierden su integridad. Preferiblemente, el reactivo de permeación tiene una conductividad inferior a 3,0 mS/cm, más preferiblemente inferior a 1,2 mS/cm. Puesto que los compuestos iónicos, tales como las sales, son los principales contribuyentes en términos de fuerza iónica de una solución acuosa, es preferible que la concentración salina en el reactivo de permeación sea baja.

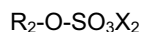
La N-acilsarcosina, en forma de ácido libre, y la sal de la misma, se encuentran disponibles comercialmente. Es preferible utilizar la forma de ácido libre, que no introduce iones de metal en el reactivo de permeación. La N-acilsarcosina en forma de ácido libre no es soluble en agua. Se puede disolver previamente en una solución de etanol y a continuación añadirla a la solución acuosa. Cuando el pH del reactivo de permeación se ajusta entre 4 y 6 con una base, como un agente de regulación del pH, el ácido libre de la N-acilsarcosina puede disolverse y está presente en la solución en forma de anión.

Ejemplos adecuados de N-acilsarcosina incluyen N-oleilsarcosina, N-estearoilsarcosina, N-lauroilsarcosina, N-miristoilsarcosina, N-cocoilsarcosina, y sales de las mismas. Preferiblemente, el grupo alquilo o alquileo de R_1 tiene 12 átomos de carbono. En una realización preferida, se utiliza N-lauroilsarcosina.

El reactivo de permeación N-acilsarcosina o la sal del mismo se encuentra en una cantidad suficiente para permear la membrana celular lo suficiente para permitir la penetración de marcadores intracelulares a través de la membrana permeada, conservando al mismo tiempo de forma sustancial la estructura de la membrana celular y los constituyentes celulares para las uniones específicas con sus marcadores celulares para el análisis célula a célula mediante citometría de flujo. Se ha descubierto que la concentración de N-acilsarcosina puede estar en un intervalo

de aproximadamente 0,01 mm a aproximadamente 100 mm, preferiblemente de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 10 mm y, más preferiblemente, de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 5 mm.

- 5 De forma opcional, el reactivo de permeación puede comprender además un tensioactivo aniónico representado por la siguiente estructura molecular:



- 10 en la que R_2 es un grupo alquilo o alquileo que tiene de 8 a 18 átomos de carbono; y X_2 es Na^+ , K^+ , NH_4^+ , o $NH_2C(CH_2OH)_3$ (es decir, tris(hidroximetil)-aminometano). Preferiblemente, el grupo alquilo o alquileo de R_2 del tensioactivo aniónico tiene 12 átomos de carbono. Ejemplos adecuados incluyen laurilsulfatos de sodio, potasio, amonio y tris(hidroximetil)aminometano. En una realización preferida, se utiliza laurilsulfato de tris(hidroximetil)aminometano, denominado en adelante Tris laurilsulfato. El sulfato de alquilo o de alquileo puede estar en un intervalo de aproximadamente 0,01 mm a aproximadamente 5 mm, preferiblemente de aproximadamente 0,05 mm a aproximadamente 2 mm.

- 20 Preferiblemente, el reactivo de permeación comprende además uno o más agentes de regulación de la osmolalidad orgánicos. Ejemplos adecuados del agente de regulación de la osmolalidad incluyen, aunque de forma no limitativa, agentes sacáridos, etilenglicol, dimetilsulfóxido, o glicerol. Preferiblemente se utiliza sacárido o glicerol. El sacárido puede ser un polisacárido, por ejemplo un disacárido, o un monosacárido. En una realización ilustrativa como se muestra en el Ejemplo 1 se utiliza sacarosa. En presencia de agentes de regulación de la osmolalidad orgánicos, aunque el reactivo de permeación tiene una fuerza iónica muy baja, es solamente ligeramente hipotónico, y tiene una osmolalidad de aproximadamente 240 a aproximadamente 280 mOsm/kg H_2O .

- 25 De forma opcional, el reactivo de permeación comprende además una seroalbúmina como, por ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA). La albúmina de suero aumenta la solubilidad del tensioactivo en la solución acuosa, y es ventajosa para un uso y almacenamiento duraderos del reactivo de permeación.

- 30 Además, el reactivo de permeación puede comprender además uno o más conservantes. Ejemplos adecuados incluyen agentes antimicrobianos y antioxidantes, para aumentar el período de validez del reactivo de permeación. El conservante puede estar presente en una cantidad que no interfiera con la función del reactivo de permeación. En un ejemplo, se utilizan 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona como agentes antimicrobianos. Rohm and Hass, de Philadelphia (Pennsylvania) fabrican combinaciones de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona, que son comercializadas con el nombre comercial Proclin® 150 y Proclin® 300. El Ejemplo 1 muestra una composición ilustrativa del reactivo de permeación.

- 40 Preferiblemente, la sangre se mezcla con el reactivo de permeación con una relación reactivo:sangre de aproximadamente 100:1 o superior. La mezcla de permeación formada se incuba durante un período de tiempo suficiente para permitir la reacción del reactivo de permeación con las células. Preferiblemente, el período de reacción es de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 10 minutos, más preferiblemente de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 5 minutos.

- 45 Se ha descubierto que cuando se mezcla con células sanguíneas, el reactivo de permeación permea de forma eficaz la membrana celular en una cantidad que permite la penetración de marcadores intracelulares macromoleculares, tales como anticuerpos, en la célula para unirse a un componente intracelular para una medición posterior. El reactivo de permeación da lugar a la agregación de la proteína intracelular dentro de las células, conservando al mismo tiempo los componentes celulares, tales como los sitios antigénicos intracelulares y de superficie celular, las moléculas de ADN y de ARN, y los elementos del citoesqueleto, para un posterior análisis célula a célula. Además, durante el tratamiento de permeación el reactivo de permeación confiere también a los glóbulos rojos forma de esfera, lo que permite la medición de los glóbulos rojos por medición de dispersión de la luz, sin efectos indeseables de forma y orientación celular heterogéneas.

- 50 Para el fin de la presente invención, el “componente celular” o “constituyente celular” incluye componentes celulares dentro de las células, y sobre la superficie de la membrana celular como, por ejemplo, sitios antigénicos de superficie celular. El término “componente intracelular” o “constituyente intracelular” hace referencia a un componente celular en el interior de las células, lo que incluye, aunque de forma no limitativa, proteínas intracelulares, tales como hemoglobina y variantes de hemoglobina dentro de los glóbulos rojos, elementos de citoesqueleto, ADN y ARN. Los elementos de citoesqueleto incluyen, aunque de forma no limitativa, tubulina y espectrina. El término “marcador celular” utilizado en la presente memoria incluye, aunque de forma no limitativa, un anticuerpo específico para un sitio antigénico de una proteína intracelular, un sitio antigénico de superficie celular, o un elemento de citoesqueleto; un tinte, por ejemplo un tinte de ácido nucleico o un tinte específico para una proteína celular, y una muestra de ácido nucleico específica para una molécula de ADN o de ARN, por ejemplo una muestra de oligonucleótido. Preferiblemente, el marcador celular es fluorescente o está marcado con un tinte fluorescente. Además, el marcador celular específico para un componente intracelular se conoce como marcador intracelular.

- 65 Como se describe en US-2006/0178294 A1, el reactivo de permeación ocasiona la precipitación de la fracción sérica, la fracción celular soluble (citosol) y la fracción de membrana obtenida a partir de sangre entera. Puede tener lugar una fuerte

agregación y precipitación tras la reacción del reactivo de permeación, especialmente en la fracción celular soluble, por la presencia de hemoglobina, que se manifiesta en un aumento sustancial de la densidad óptica de la mezcla de muestra. Como se muestra de forma adicional en US-2007/0020612 A1, la agregación de proteína intracelular de las células sanguíneas queda reflejada por un aumento sustancial de las señales de dispersión lateral de los glóbulos rojos en muestras de sangre entera expuestas al reactivo de permeación. Por otra parte, sin embargo, como se muestra en US-2006/0178294 A1, las células sanguíneas permeadas mantienen sus sitios antigénicos y su especificidad de unión a anticuerpos, por ejemplo, unión de tubulina de los glóbulos rojos y linfocitos a anticuerpo anti-tubulina-FITC, unión de hemoglobina fetal a anti-HbF-FITC, y unión de eritrocitos fetales a marcador extracelular anti-i-ficoeritrina (PE).

Como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, tras la exposición del reactivo de permeación, se añade un reactivo de neutralización a la mezcla de permeación para inhibir reacciones adicionales del reactivo de permeación. El reactivo de neutralización es hipertónico y puede tener un pH de 7 o ligeramente superior. Cuando se mezcla con la mezcla de permeación, el reactivo de neutralización neutraliza el pH de la mezcla y aumenta su fuerza iónica. De ese modo, inhibe de forma eficaz las reacciones posteriores del reactivo de permeación. Se cree que un exceso de reacción con el reactivo de permeación puede dar lugar a una agregación de proteínas intracelulares demasiado compacta, lo que puede ocasionar un enmascaramiento de los sitios antigénicos de las proteínas y afectar a su unión a los marcadores intracelulares. El grado de tratamiento de las células sanguíneas con el reactivo de permeación puede controlarse mediante el período de incubación anteriormente descrito y mediante la inhibición eficaz del reactivo de neutralización.

El reactivo de neutralización comprende un agente de regulación de la osmolalidad y un tampón. Preferiblemente, el agente regulador de la osmolalidad consiste en una o más sales de metal alcalino, preferiblemente haluros de metal alcalino, por ejemplo cloruro de sodio o de potasio. La osmolalidad del reactivo de neutralización es preferiblemente de aproximadamente 800 a aproximadamente 1200 mOsm/kg H₂O. El tampón puede ser un tampón orgánico o inorgánico que proporcione un pH neutro. El pH del reactivo de neutralización es, preferiblemente, de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,5, más preferiblemente de aproximadamente 7,1 a aproximadamente 7,4.

El reactivo de neutralización comprende además una seroalbúmina, por ejemplo, albúmina de suero bovino. La seroalbúmina, especialmente a una concentración elevada, puede proporcionar una unión competitiva de tensioactivo e inhibir la acción del tensioactivo a las células. Por lo tanto, la seroalbúmina contribuye a conservar la integridad de los componentes celulares, especialmente los sitios antigénicos intracelulares, tales como los sitios antigénicos de hemoglobina glicada (HbA1c) o de hemoglobina fetal (HbF) para su unión con respectivos anticuerpos. Preferiblemente, la concentración de seroalbúmina es de aproximadamente 0,4 mM a aproximadamente 1,2 mM. Por otra parte, el reactivo de neutralización comprende además un agente antimicrobiano. En una realización ilustrativa, se utiliza azida de sodio. La azida de sodio es un agente antimicrobiano fuerte, que es particularmente adecuado para el reactivo de neutralización puesto que tiene un pH neutro y contiene una concentración elevada de albúmina de suero bovino. El Ejemplo 1 ilustra una composición ejemplar del reactivo de neutralización.

Preferiblemente, el reactivo de neutralización tal y como se muestra en el Ejemplo 1 se utiliza con una relación con respecto al reactivo de permeación de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,8. Tras la adición del reactivo de neutralización, la mezcla de neutralización formada es incubada de forma adicional durante un período de tiempo para inhibir de forma eficaz la reacción del reactivo de permeación. Este período de reacción es, preferiblemente, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos y, más preferiblemente, de aproximadamente 8 minutos a aproximadamente 12 minutos.

Tras la neutralización, las células sanguíneas tratadas, denominadas también células sanguíneas permeadas, o los análogos celulares formados, son estables y la mezcla celular puede congelarse para el almacenamiento. Sin embargo, la mezcla de neutralización contiene sal, tampón, y albúmina de suero bovino, que puede interferir con las pruebas analíticas que deban realizarse a continuación. Por lo tanto, el medio de la mezcla de neutralización se separa de los análogos celulares y los análogos celulares se lavan con una solución de lavado.

Preferiblemente, se utiliza una suave centrifugación para cambiar el medio. Como se muestra en el Ejemplo 2, la mezcla de neutralización que contiene tanto el agente de permeación como el agente de neutralización se añade a modo de capa sobre un volumen de una solución de lavado en un tubo de centrifugación. Tras la centrifugación, se retira el sobrenadante. A continuación, se añade una solución de almacenamiento, también denominada medio de suspensión, a las células empaquetadas para suspender los análogos celulares, formando así el control de referencia. Pueden usarse también otros métodos adecuados para cambiar el medio, por ejemplo, filtración o diálisis.

Se ha descubierto que la centrifugación a alta velocidad puede tener un efecto deletéreo en los análogos. Si se aplican fuerzas centrífugas demasiado elevadas, se puede provocar la aglutinación de los análogos. Además, la centrifugación a alta velocidad puede provocar que las células pierdan partes de sus componentes celulares. Para evitar efectos deletéreos ocasionados por la centrifugación, se utiliza una baja velocidad de centrifugación de la mezcla de neutralización sobre una capa de una solución de lavado. La solución de lavado contiene una o más sales y tiene un pH neutro, y puede contener una concentración elevada de sacarosa. Preferiblemente, la concentración de sal es ligeramente superior que la concentración de sal fisiológica para inhibir la agregación de los análogos celulares.

Debería entenderse que la composición de la solución de almacenamiento, que es el medio de suspensión de los análogos del control de referencia, puede determinarse a partir de la prueba analítica que vaya a realizarse a continuación. En otras palabras, la composición del medio de suspensión es compatible con la prueba analítica que vaya a realizarse. El Ejemplo 1 ilustra una composición de solución de almacenamiento ilustrativa adecuada para la medición de hemoglobina celular y variante de hemoglobina descrita en la presente memoria. En este ejemplo, la solución de almacenamiento es una solución acuosa que contiene una sal y una concentración elevada de sacarosa y que tiene un pH neutro.

Se ha descubierto que la hemoglobina celular de los análogos de glóbulos rojos puede determinarse utilizando señales de dispersión lateral de los análogos medidas en analizadores citométricos, como queda ilustrado adicionalmente en los ejemplos. Esta propiedad de los análogos de glóbulos rojos de la presente invención es sustancialmente diferente de la propiedad de los glóbulos rojos no tratados en sangre entera, glóbulos rojos esferados o glóbulos rojos estabilizados, puesto que la hemoglobina celular de dichas células no puede determinarse mediante medición de dispersión lateral. Aunque el mecanismo exacto no es totalmente comprendido, se cree que la correlación directa entre la hemoglobina celular de los análogos de glóbulos rojos y sus señales de dispersión lateral es atribuible a la propiedad de hemoglobina agregada en las células permeadas tras el tratamiento con el reactivo de permeación. La diferencia puede observarse además por el hecho de que los análogos de glóbulos rojos obtenidos utilizando el método de la presente invención no pueden ser lisados por un reactivo lítico para liberar hemoglobina. En cambio, los glóbulos rojos estabilizados, incluso después de ser tratados con determinadas condiciones de fijación, pueden ser lisados por reactivos líticos para liberar la hemoglobina para la medición en analizadores de química clínica estándar mediante cromatografía o inmunturbidimetría.

Además, la membrana celular de los análogos de glóbulos rojos de la presente invención es altamente permeada, lo que hace posible que marcadores macromoleculares tales como anticuerpos, penetren y se unan a proteínas intracelulares. Se ha descubierto que cuando los análogos de glóbulos rojos de la presente invención se miden por medición de impedancia, por ejemplo mediante medición de impedancia de corriente continua (CC) en analizadores de hematología, las señales de impedancia de dichos análogos son sustancialmente menores que las generadas por glóbulos rojos no tratados o por glóbulos rojos fijados. La medición de impedancia de CC se ha utilizado habitualmente en analizadores de hematología para medir el tamaño de las células sanguíneas. La medición se basa en el aumento de resistencia eléctrica ocasionada por una célula sanguínea, que repele un volumen de una solución eléctricamente conductora que se está midiendo. Como puede apreciarse, puesto que la membrana celular de los análogos de glóbulos rojos instantáneos está altamente permeada, cuando los análogos se suspenden en una solución conductora, la solución conductora migra libremente hacia fuera y hacia dentro de los análogos. Por lo tanto, las señales de impedancia generadas por dichos análogos son significativamente reducidas. Sin embargo, cuando se miden por medición de dispersión de luz directa, que se utiliza habitualmente también para medir el tamaño celular, dichos glóbulos rojos permeados presentan esencialmente el mismo tamaño celular que los glóbulos rojos esferados. En este contexto, los análogos de glóbulos rojos son sustancialmente diferentes de los glóbulos rojos fijados. Estos últimos no son permeables a los anticuerpos y tienen señales de impedancia sustancialmente equivalentes como glóbulos rojos no tratados.

Como se describe más adelante, el reactivo de permeación y el reactivo de neutralización utilizado para preparar los análogos celulares para el control de referencia de la presente invención son los mismos reactivos utilizados para procesar las muestras de sangre que deben medirse en los analizadores de tipo citómetro de flujo. Los análogos celulares formados se lavan y se resuspenden en la solución de almacenamiento sin ser fijados por los fijadores usados habitualmente en la formación de análogos celulares. Sin embargo, como se demuestra posteriormente con los ejemplos, en ausencia de tratamiento con fijadores, dichos análogos celulares son estables cuando se exponen a condiciones de congelación y descongelación y mantienen la especificidad de los sitios antigénicos para inmunoensayos.

Para una estabilidad duradera, el control de referencia se mantiene congelado después de haberlo preparado. De forma típica, después de la preparación, el control de referencia se transfiere a viales de control. A continuación se congelan los viales de control y se mantienen a una temperatura de forma típica no superior a -10 °C, preferiblemente de -10 °C a -80 °C. Preferiblemente, el control de referencia se congela en menos de veinticuatro horas, más preferiblemente en menos de dos horas, con máxima preferencia en el transcurso de una hora después de la preparación. Durante el transporte a los clientes, el control de referencia se mantiene congelado en hielo seco u en otros materiales adecuados. Antes del uso, se descongela a temperatura ambiente un vial de control de referencia congelado. Tras descongelar, el control de referencia se mezcla suavemente para formar una suspensión de análogo homogéneo antes de su uso.

Como puede apreciarse, para el fin de la presente invención, la solución o medio de almacenamiento es adecuada para el almacenamiento en condiciones de congelación y de descongelación. La solución de almacenamiento es una solución acuosa que comprende una sal y un sacárido. La concentración de sal puede ser de 0,05 M a 2 M, preferiblemente de 0,1 M a aproximadamente 0,5 M. El sacárido puede ser un polisacárido, por ejemplo un disacárido, o un monosacárido. En una realización ilustrativa mostrada en el Ejemplo 1 se utiliza sacarosa. La concentración de sacárido puede ser de 0,1 M a 2 M, preferiblemente de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 1,5 M. Se ha descubierto que una concentración relativamente elevada de sacárido, por ejemplo sacarosa, evita que los análogos celulares descuidan en el vial de control después de la descongelación de la suspensión de análogo congelada y durante el uso durante el análisis. Además, como se ha descrito anteriormente, el medio de suspensión debería ser compatible también con el ensayo que deba realizarse. Por ejemplo, puesto que el fosfato tiende a interferir con los ensayos que deben realizarse en los analizadores de tipo

citómetro de flujo, debe determinarse si se va a usar una sal de fosfato en la solución de almacenamiento en función de la prueba analítica para la que vaya a usarse el control de referencia.

Se ha descubierto de forma sorprendente que los análogos celulares del control de referencia de la presente invención son resistentes al tratamiento de congelación y descongelación sin usar agentes protectores, y los sitios antigénicos celulares y la permeabilidad de los análogos celulares a los marcadores macromoleculares, por ejemplo anticuerpos, se mantienen tras la congelación y descongelación de la suspensión de análogo. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que esta propiedad única puede atribuirse a la conservación de sitios antigénicos por parte de las proteínas intracelulares agregadas. Como se describe a continuación en la presente memoria, en el método de uso del control de referencia, los análogos celulares del control de referencia instantáneo mantienen sus especificidades a los anticuerpos. Cuando se añaden a una muestra de sangre, los análogos celulares del control de referencia de la presente invención experimentan la misma reacción anticuerpo-antígeno que la muestra de sangre en una prueba analítica y simulan sustancialmente las células sanguíneas de la muestra en el instrumento.

En otra realización, la presente invención proporciona un control de referencia que comprende análogos celulares marcados con un marcador fluorescente. Los análogos celulares producidos con dicho marcaje se denominan en la presente memoria análogos marcados, y el control de referencia que contiene los análogos marcados se denomina control de referencia marcado. Los análogos marcados del control de referencia pueden identificarse y diferenciarse de las células sanguíneas de una muestra de forma sencilla mediante medición de fluorescencia cuando se añade el control de referencia a una muestra de sangre para funcionar como un control interno para una prueba analítica.

Para producir el control de referencia marcado, el método anteriormente descrito comprende además el marcaje de las células sanguíneas utilizado para preparar los análogos celulares. Para marcar las proteínas celulares de las células sanguíneas se utiliza un tinte fluorescente, éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína. Para marcar las células pueden utilizarse también diversos marcadores fluorescentes.

Se sabe que el éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA-SE) es una molécula lipófila y un compuesto no fluorescente que se difunde de forma pasiva en las células. Dentro de las células, las esterasas eliminan los restos acetilo, y el éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) restante es marcadamente fluorescente. El CFSE se une covalentemente a proteínas y es eficazmente retenido en el interior de las células. El CFSE tiene una longitud de onda de excitación a 488 nm y una longitud de onda de emisión a 510 nm-550 nm, lo que lo hace adecuado para usar en analizadores de tipo citómetro de flujo que tienen la longitud de onda de excitación a 488 nm y un detector a 525 nm.

El Ejemplo 2 ilustra un proceso ilustrativo de preparación de análogos de glóbulos rojos marcados utilizando sangre entera con el método anteriormente descrito. Como se muestra, en la preparación de los análogos celulares marcados, las células sanguíneas se separan primero del plasma y se lavan con un diluyente isotónico como, por ejemplo, solución salina de tampón fosfato, u otros diluyentes adecuados, antes de exponer las células sanguíneas al tinte fluorescente. Para marcar células sanguíneas usando CFDA-SE, las células sanguíneas lavadas se incuban en una solución isotónica que contiene CFDA-SE durante un período de tiempo suficiente para que el tinte penetre en la membrana celular y para permitir que el CFSE marque las proteínas intracelulares. El período de incubación es preferiblemente de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 5 horas, preferiblemente de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas. Tras la incubación, las células sanguíneas marcadas se lavan con un diluyente isotónico para retirar el exceso de tinte en el medio antes de exponer las células sanguíneas marcadas al reactivo de permeación. Las etapas de procesamiento posteriores, es decir, la reacción con el reactivo de permeación, inhibición del reactivo de neutralización, lavado, así como congelamiento y descongelamiento, son las mismas que las descritas anteriormente en el proceso de preparación del control de referencia sin marcaje.

Preferiblemente, antes de exponerlas al reactivo de permeación, las células sanguíneas marcadas se resuspenden en el suero autólogo del modo descrito en el Ejemplo 2, o en otro tipo de suero, para formar sangre reconstituida. La presencia de suero protege a las células sanguíneas de la pérdida de hemoglobina durante las etapas de preparación posteriores. Preferiblemente, la sangre reconstituida se mezcla con el reactivo de permeación con una relación reactivo:sangre de aproximadamente 100:1 o superior. De forma opcional, para medir la hemoglobina celular, los glóbulos rojos marcados se pueden exponer a un reactivo de esféricación para conferir a los glóbulos rojos forma de esfera, antes de tratarlos con el reactivo de permeación.

En el método de medición de la hemoglobina celular y de la variante de hemoglobina de glóbulos rojos maduros y reticulocitos del modo descrito a continuación, los reticulocitos son diferenciados de los glóbulos rojos maduros mediante medición de fluorescencia utilizando un tinte de ácido nucleico. Es necesario que los análogos celulares marcados con un marcador de fluorescencia puedan diferenciarse de los reticulocitos teñidos con un tinte de ácido nucleico. Como se ilustra en el Ejemplo 3, los análogos celulares marcados por CFSE y los reticulocitos de la muestra de sangre manchados con tinte de ácido nucleico se detectan, los dos, a 525 nm (FL1). Sin embargo, las señales FL1 de CFSE son sustancialmente más intensas que las señales FL1 del naranja de acridina utilizado para teñir ARN de los reticulocitos. La diferencia de intensidad permite la diferenciación de los análogos marcados del control de referencia con respecto a los glóbulos rojos maduros y a los reticulocitos de la muestra de sangre cuando se utiliza el control de referencia como un control interno de la prueba analítica.

Se sabe que la unión de un marcador de fluorescencia a proteínas podría afectar a los sitios antigénicos de la proteína o interferir con la unión a anticuerpos. Por lo tanto, es importante que los análogos marcados del control de referencia retengan sustancialmente su especificidad de unión y afinidad a los anticuerpos utilizados para la prueba analítica.

Se ha descubierto que después de marcar con el marcador fluorescente, se mantienen las propiedades de los análogos celulares anteriormente descritos. Concretamente, la hemoglobina celular de los análogos celulares marcados puede medirse utilizando señales de dispersión lateral del modo anteriormente descrito y demostrado en los ejemplos a continuación. La especificidad de los sitios antigénicos de las proteínas y la permeabilidad de la membrana se mantienen, así como la resistencia de los análogos marcados al tratamiento de congelación y descongelación. El control de referencia de la presente invención, que contiene análogos celulares marcados o análogos no marcados, puede almacenarse mediante el congelamiento anteriormente descrito durante al menos más de un año manteniendo las propiedades de los componentes celulares de los análogos celulares.

El Ejemplo 2 ilustra la preparación de un control de referencia marcado a partir de sangre entera humana normal. El Ejemplo 4 ilustra además un control de referencia marcado obtenido a partir de sangre entera de un paciente diabético, y la estabilidad del control de referencia marcado después de descongelar en las mediciones de hemoglobina celular mediante medición de dispersión lateral y de HbA1c mediante medición de fluorescencia, lo cual se describe en mayor detalle a continuación.

La hemoglobina celular, el contenido de variante de hemoglobina específica tal como HbA1c, y el porcentaje de variante de hemoglobina específica del control de referencia pueden determinarse utilizando mediciones de dispersión lateral y fluorescencia en un analizador de tipo citómetro de flujo descrito detalladamente a continuación. El término “analizador de tipo citómetro de flujo” hace referencia a citómetros de flujo conocidos en la técnica y a analizadores de hematología equipados con dispositivos de dispersión de luz y/o de detección de fluorescencia. Los valores de referencia de dichos parámetros del control de referencia pueden ser asignados midiendo muestras de sangre que tengan valores conocidos de dichos parámetros obtenidos a partir de métodos de referencia existentes y el control de referencia en el mismo analizador de tipo citómetro de flujo con las mismas condiciones de operación. En la técnica se conocen diversos métodos de referencia, por ejemplo, puede obtenerse el contenido de hemoglobina celular medio (MCH) de una muestra de sangre mediante analizadores de hematología, y el porcentaje de HbA1c puede obtenerse utilizando cromatografía de afinidad, inmunturbidimetría, o cromatografía de intercambio iónico. El Ejemplo 7 ilustra un proceso detallado de asignación de valores de referencia para el control de referencia.

En un aspecto adicional, se describe un método de uso del control de referencia anteriormente descrito para el análisis célula a célula de componentes celulares de células en analizadores de tipo citómetro de flujo. El control de referencia puede utilizarse como un control independiente o como un control interno. El término de control independiente se refiere a un control de referencia que debe analizarse solo en un analizador de tipo citómetro de flujo, sin mezclar con una muestra. El control independiente se analiza de forma típica con un lote de muestras a modo de referencia para pruebas analíticas internas o externas. El término de control interno se refiere a un control de referencia que se añade a una muestra con la cual se analiza en un analizador de tipo citómetro de flujo.

El método de uso del control de referencia interno para el análisis célula a célula se ilustra a continuación en el ejemplo de medición de hemoglobina celular y porcentaje celular de variantes de hemoglobina. Debe entenderse, sin embargo, que el control de referencia obtenido mediante el método de la presente invención puede utilizarse también para mediciones de otros constituyentes celulares.

En la presente memoria, el término “hemoglobina celular” hace referencia al contenido de hemoglobina total en un glóbulo rojo individual, lo que incluye todas las variantes de hemoglobina presentes en esa célula. El término de hemoglobina celular de reticulocitos hace referencia al contenido de hemoglobina total en un reticulocito individual, lo que incluye todas las variantes de hemoglobina presentes en ese reticulocito. La hemoglobina celular se denomina también hemoglobina célula a célula. El término “variante de hemoglobina” hace referencia a todas las variantes de hemoglobina, por ejemplo, hemoglobina fetal, hemoglobina glicada, como por ejemplo HbA1c, y formas aberrantes de hemoglobina, como por ejemplo las presentes en la enfermedad drepanocítica y en la talasemia. El término “variante de hemoglobina celular” es la cantidad de una variante de hemoglobina en un glóbulo rojo individual. El término “porcentaje celular de una variante de hemoglobina” hace referencia al porcentaje de una variante de hemoglobina frente al contenido de hemoglobina total en un glóbulo rojo individual. Por ejemplo, en la medición de HbA1c descrita en la presente memoria se expresa como porcentaje celular de HbA1c, o porcentaje de HbA1c celular. Por lo tanto, el porcentaje de variante de hemoglobina de una muestra obtenida utilizando el método descrito es el porcentaje celular promedio de esta variante de hemoglobina de todos los glóbulos rojos de una muestra de sangre.

Para usar el control de referencia instantáneo para las mediciones de hemoglobina celular y de variante de hemoglobina celular de una muestra de sangre en un analizador de tipo citómetro de flujo, se proporciona un control de referencia que contiene análogos de glóbulos rojos formados de glóbulos rojos permeados. Los análogos de glóbulos rojos comprenden proteínas intracelulares agregadas y sitios antigénicos conservados de la variante de hemoglobina de interés, y tienen una membrana celular permeable a los anticuerpos. Cuando se usa como control interno o como control independiente, el control de referencia se expone a los mismos reactivos y al mismo procedimiento analítico que una muestra de sangre (ver

Ejemplo 3) y a continuación se analiza en un citómetro de flujo mediante medición de dispersión lateral y de fluorescencia. La hemoglobina de los glóbulos rojos de la muestra de sangre y los análogos de glóbulos rojos del control de referencia se determina mediante señales de dispersión celular; y la variante de hemoglobina de los glóbulos rojos de la muestra de sangre y de los análogos de glóbulos rojos del control de referencia se determina mediante señales de fluorescencia.

El método de medición de hemoglobina celular y de variante de hemoglobina celular de muestras de sangre mediante mediciones de dispersión lateral y fluorescencia se ha descrito en detalle en US-2007/0020612 A1.

Concretamente, utilizando este método se mezcla una muestra de sangre con un reactivo de permeación usando este método, formándose una primera mezcla de muestra. La primera mezcla se incuba durante un período de tiempo suficiente para ocasionar la agregación de la proteína intracelular y hacer que la membrana celular se vuelva permeable a los anticuerpos. A continuación, se añade un reactivo de neutralización a la primera mezcla de muestra para inhibir reacciones adicionales del reactivo de permeación con los glóbulos rojos, formándose así una segunda mezcla de muestra. A continuación, se lleva a cabo una medición de dispersión lateral de la segunda mezcla de muestra en un citómetro de flujo. La hemoglobina celular de la muestra de sangre se determina utilizando las señales de dispersión lateral obtenidas.

Cuando se mide una variante de hemoglobina, el reactivo de neutralización contiene además un anticuerpo marcado con fluorescencia específico para la variante de hemoglobina de interés, tal como un anticuerpo anti-HbA1c o anti-HbF. Conforme la membrana celular es permeada por el reactivo de permeación, la molécula grande de anticuerpo puede penetrar a través de la membrana celular y unirse a los sitios antigénicos de la variante de hemoglobina dentro de los glóbulos rojos. La segunda mezcla de muestra se incuba durante un período de tiempo para permitir la unión a anticuerpos. A continuación, se lleva a cabo una medición de fluorescencia de la segunda mezcla al mismo tiempo que la medición de dispersión lateral y el porcentaje de variante de hemoglobina puede determinarse mediante señales de fluorescencia y mediante las señales de dispersión lateral.

Además, cuando deben medirse la hemoglobina celular y una variante de hemoglobina de los reticulocitos de una muestra de sangre, el método comprende asimismo la tinción de la muestra de sangre con un tinte nucleico antes de exponer la muestra de sangre al reactivo de permeación del modo anteriormente descrito. De forma opcional, el tinte nucleico puede incluirse en un reactivo de esferación, lo que puede mejorar la velocidad de penetración del tinte nucleico en la membrana celular.

En un proceso de medición semiautomático, las segundas mezclas de muestra anteriormente descritas se miden en un citómetro de flujo lote a lote. Las mezclas de muestra preparadas pueden esperar durante un período de tiempo sustancial antes de realizarse la medición, por ejemplo, un par de horas. Por lo tanto, en el método de la presente invención, puede añadirse un reactivo de fijación a la segunda mezcla de muestra para fijar las células.

El reactivo de fijación comprende un agente de fijación, un agente regulador de la osmolalidad y un tampón. Preferiblemente, el agente de fijación es un aldehído, incluidos, aunque no de forma limitativa, formaldehído, paraformaldehído y glutaraldehído. El agente regulador de la osmolalidad puede ser una o más sales de metal alcalino, preferiblemente haluros de metal alcalino como, por ejemplo, cloruro de sodio o de potasio. Preferiblemente, el reactivo de fijación es hipertónico, con una osmolalidad de aproximadamente 1100 a aproximadamente 1400 mOsm/kg H₂O. El tampón puede ser un tampón orgánico o inorgánico que proporcione un pH neutro. El pH del reactivo de fijación es preferiblemente de aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,3, lo que mantiene el pH neutro obtenido con el reactivo de neutralización. Además, preferiblemente, el reactivo de fijación comprende además agentes quelantes tales como sulfato de dextrano, EGTA, y ácido bórico. Se ha descubierto que la combinación de sulfato de dextrano, EGTA y ácido bórico en el reactivo de fijación puede prevenir de forma eficaz la agregación celular en la mezcla de muestra final, en comparación con el reactivo de fijación habitualmente utilizado que contiene formaldehído y solución salina tamponada con fosfato. El Ejemplo 1 muestra una composición ilustrativa del reactivo de fijación.

El Ejemplo 3 ilustra un proceso de medición de hemoglobina celular y variante de hemoglobina de una muestra de sangre utilizando un control de referencia marcado obtenido a partir de sangre entera normal mediante el método del Ejemplo 2 como control interno. Como se describe en el Ejemplo 3, se mezcló un volumen de una muestra de sangre entera en primer lugar con un reactivo esferante que contenía naranja de acridina para teñir ARN de los reticulocitos. A continuación, se mezcló un volumen de la mezcla de muestra teñida con el reactivo de permeación del Ejemplo 1, formando la primera mezcla de muestra. Tras la incubación, se añadió el control de referencia marcado a la primera mezcla de muestra. A continuación, se añadió el reactivo de neutralización del Ejemplo 1 que contiene un anticuerpo anti-HbA_{1c} fluorescente, formando una segunda mezcla de muestra. Se incubó la segunda muestra para permitir que el anticuerpo penetrara la membrana celular permeada y se uniera a los antígenos HbA_{1c}. A continuación, se añadió el reactivo de fijación del Ejemplo 1, formando una mezcla de muestra final.

La mezcla de muestra final se analizó en un citómetro Beckman Coulter® FC500 MCL mediante mediciones de dispersión directa y dispersión lateral y mediciones de fluorescencia a 525 nm (FL1) y a 675 nm (FL4). Las Figs. 1A a 1C muestran los diagramas de dispersión obtenidos de dispersión directa (FS) frente a dispersión lateral (SS), FS frente a FL1 y FL1 frente a FL4, respectivamente.

En la presente memoria, el término de señal de dispersión lateral, como se conoce en citometría de flujo, se refiere a la señal de dispersión de luz a aproximadamente 90°, o al ángulo recto de la luz incidente, generado por una partícula o célula sanguínea que pasa a través de una abertura de una célula del flujo. La señal de dispersión directa corresponde a la señal de dispersión de luz medida a menos de 10° de la luz incidente. El término de medición de dispersión lateral se refiere a la medición de las señales de dispersión lateral por parte de un detector óptico. La mayor parte de los citómetros de flujo comercialmente disponibles están equipados con un sistema de detección que permite la medición de las señales de dispersión directa y de dispersión lateral.

En la Fig. 1A, la región A contenía los glóbulos rojos de la muestra de sangre y los análogos del control de referencia marcado, que se seleccionan en este diagrama de dispersión para un posterior análisis diferencial utilizando fluorescencia como se muestra en las Figs. 1B y 1C. Las poblaciones fuera de la región A eran glóbulos blancos y plaquetas.

En la Fig. 1B, la región B contenía los glóbulos rojos maduros de la muestra de sangre; la región C contenía reticulocitos de la muestra de sangre marcados con naranja de acridina; y la región D contenía los análogos del control de referencia marcado, marcados con CFSE. Como se muestra, los glóbulos rojos maduros y los reticulocitos de la muestra de sangre y los análogos del control de referencia marcado se diferencian entre sí en el eje FL1.

En la Fig. 1C, la región F contenía los glóbulos rojos maduros de la muestra de sangre, la región G contenía los reticulocitos de la muestra de sangre, y la región E contenía los análogos del control de referencia marcado.

Como puede apreciarse, la medición de fluorescencia a 525 nm (FL1) mide señales de fluorescencia generadas a partir de ARN teñido con naranja de acridina y de proteínas intracelulares marcadas con CFSE. Como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, el naranja de acridina se utiliza para diferenciar reticulocitos de glóbulos rojos maduros, y el CFSE se utiliza para marcar los análogos celulares del control de referencia. Aunque ambas señales pueden detectarse a la misma longitud de onda, los análogos celulares marcados con CFSE tienen señales sustancialmente más fuertes que los reticulocitos. Por lo tanto, los análogos del control de referencia no se solapan con los reticulocitos en el eje FL1 de los diagramas de dispersión y pueden diferenciarse de los reticulocitos.

La hemoglobina celular media de la muestra de sangre se obtuvo a partir del promedio de los valores de dispersión lateral de los glóbulos rojos individuales de la muestra de sangre. El contenido de HbA1 de la muestra de sangre se obtuvo a partir del promedio de señales de fluorescencia a 675 nm (FL1), tras substrair un valor de fondo de fluorescencia. El porcentaje de HbA1c de la muestra de sangre se calculó dividiendo el contenido de HbA1c de la muestra de sangre por la hemoglobina celular media de la muestra de sangre. Puesto que los glóbulos rojos y los reticulocitos son diferenciables, la hemoglobina celular media y el porcentaje de HbA1c pueden obtenerse para cada una de estas dos subpoblaciones de glóbulos rojos de la muestra de sangre.

De forma similar, puesto que los análogos de glóbulos rojos del control de referencia marcado se diferencian de los glóbulos rojos maduros y de los reticulocitos de la muestra de sangre, la hemoglobina celular media y el porcentaje de H1A1c pueden obtenerse para el control de referencia utilizando señales de dispersión lateral y señales de fluorescencia procedentes de los análogos celulares utilizando los cálculos anteriormente descritos.

Como puede apreciarse, cuando las muestras de sangre que tienen valores conocidos de hemoglobina corpuscular media (MCH, que es la hemoglobina total) y de porcentaje de HbA1c obtenido a partir de los métodos de referencia existentes se miden junto con el control de referencia utilizando el método de la presente invención, dichos valores conocidos y el promedio de las señales de dispersión lateral y el promedio de las señales de fluorescencia de las muestras de sangre pueden usarse para asignar valores de referencia de dichos parámetros al control de referencia de la presente invención, como se ilustra en el Ejemplo 7.

Cuando se usa el control de referencia que tiene valores de referencia asignados como control interno en las muestras de sangre a analizar, la hemoglobina celular media y el porcentaje de HbA1c de las muestras de sangre pueden obtenerse utilizando el control de referencia. Los Ejemplos 7 y 8 ilustran un proceso ilustrativo de este tipo. El mismo mecanismo tiene lugar cuando el control de referencia se utiliza como un control independiente. Además, en los Ejemplos 7 y 8, los procesos de obtención de hemoglobina celular media y el porcentaje de HbA1c de las muestras de sangre utilizando el control de referencia de la presente invención se han descrito en detalle para compararlos con los resultados generales obtenidos utilizando los métodos estándar del laboratorio de referencia, que son un valor para cada parámetro, es decir, la hemoglobina total y el porcentaje de HbA1c, obtenidos a partir del producto de hemolización de cada muestra analizada. Sin embargo, a parte de los promedios de hemoglobina celular y el porcentaje celular de HbA1c, lo que es más importante, el método descrito proporciona hemoglobina celular y porcentaje celular de HbA1c de glóbulos rojos individuales.

Se ha descubierto que la estabilidad del presente control de referencia tras la descongelación es equivalente a la sangre fresca en términos de contenido proteico intracelular y antígenos intracelulares. El Ejemplo 4 ilustra un ejemplo de esto. Como se muestra, se preparó un control de referencia marcado utilizando sangre entera de un paciente diabético con el proceso de preparación anteriormente descrito. En las pruebas de estabilidad, se añadió el control de referencia marcado a una muestra de sangre normal como control interno y a continuación se midió la muestra de sangre utilizando el procedimiento de ensayo descrito en el Ejemplo 3.

Los ensayos se realizaron inmediatamente después de la descongelación de un vial de suspensión análoga congelada al cabo de 1,5 horas, 2,5 horas y 20 horas después de descongelar, respectivamente. Durante las pruebas, la muestra de sangre y el control de referencia marcado se mantuvieron a temperatura ambiente antes de añadir el control de referencia marcado a la muestra de sangre. Los análisis de las señales de dispersión lateral y las señales de FL4 de los glóbulos rojos y de los análogos de glóbulos rojos del control de referencia marcado se llevaron a cabo por separado. Más concretamente, los glóbulos rojos maduros y los reticulocitos de la muestra de sangre y de los análogos de glóbulos rojos del control de referencia se diferenciaron primero por los diagramas de dispersión FS frente a FL1 como se ilustra en la Fig. 1B. Tras la diferenciación, se obtuvieron los diagramas de dispersión celular para cada una de dichas poblaciones. Las señales de FL1 de los glóbulos rojos maduros, reticulocitos y análogos de glóbulos rojos se obtuvieron a partir de los diagramas de dispersión de FL1 frente a FL4 como se ilustra en la Fig. 1C.

Las Figs. 2A y 2B muestran, respectivamente, las señales de dispersión lateral promedio y las señales de FL4 promedio frente al tiempo después de descongelar el control de referencia marcado. Como puede observarse, las señales de dispersión lateral promedio de los glóbulos rojos de la muestra de sangre y de los análogos de glóbulos rojos del control de referencia marcado permanecieron estables en el transcurso de 20 horas, lo que indica que el contenido de hemoglobina de los análogos de glóbulos rojos se mantuvo estable tras la descongelación. Puesto que la hemoglobina constituía 99% de la masa seca de los glóbulos rojos, este resultado indica que no se había producido pérdida de componentes celulares tras descongelar los análogos celulares marcados.

Por otra parte, se observó una pequeña disminución de las señales FL4 en las dos primeras horas posteriores a la descongelación, lo que indicaba una pequeña disminución de la cantidad de antígeno de HbA1c tanto en los glóbulos rojos de la muestra de sangre como en los análogos de glóbulos rojos del control de referencia. Sin embargo, tras la disminución inicial, las señales FL4 de los análogos de glóbulos rojos permanecieron estables en el transcurso de 20 horas. Como puede observarse, las señales FL4 de los análogos de glóbulos rojos eran ligeramente más estables que las de los glóbulos rojos de la muestra de sangre.

Aunque el Ejemplo 4 ilustra la estabilidad del control de referencia de la presente invención en la medición de hemoglobina celular y de variante de hemoglobina, el control de referencia de la presente invención que contiene los análogos celulares congelados y descongelados puede usarse para el análisis citométrico de flujo de otros componentes celulares. El control de referencia puede utilizarse para homogeneizar los datos de diferentes muestras de un mismo análisis (intraanalítica), así como datos de diferentes análisis llevados a cabo en diferentes momentos o lugares (interanalítica).

El Ejemplo 5 ilustra la eficacia de utilizar el control de referencia de la presente invención en la corrección de las variaciones interanalíticas en una situación simulada. Como control interno se utilizó un control de referencia marcado obtenido de un paciente diabético. Se preparó una muestra de sangre utilizando el procedimiento analítico descrito en el Ejemplo 3 y se analizó en un citómetro FC500 MCL a diferentes voltajes del tubo fotomultiplicador (PMT) del detector FL4. Las señales de dispersión lateral y las señales FL4 de los glóbulos rojos maduros y de los análogos de glóbulos rojos se obtuvieron para cada ajuste del PMT. Para cada ajuste del PMT, el porcentaje de HbA1c de los glóbulos rojos de la muestra de sangre se obtuvo dividiendo el valor promedio de FL4 por el valor de dispersión lateral promedio de los glóbulos rojos. De modo similar, el porcentaje de HbA1c de los análogos de los glóbulos rojos del control de referencia marcado se obtuvo dividiendo el valor promedio de FL4 por el valor de dispersión lateral promedio de los análogos para cada ajuste del PMT.

La Fig. 3 muestra los porcentajes de los glóbulos rojos maduros de la muestra de sangre y los análogos de glóbulos rojos del control de referencia para diferentes ajustes del PMT. Como puede observarse, el aumento del voltaje del PMT aumentó el porcentaje de HbA1c de la muestra de sangre (curva A) y del control (curva B). Sin embargo, tras dividir el porcentaje de HbA1c de la muestra de sangre por el porcentaje de HbA1c del control de referencia para cada ajuste del PMT y normalizarlo, los porcentajes de HbA1c corregidos obtenidos de la muestra de sangre (curva C) para diferentes ajustes del PMT eran constantes y reproducibles.

La variación de voltaje del PMT utilizado en este ejemplo simula la variación de señal de fluorescencia ocasionada por el instrumento. Puesto que el control de referencia experimenta los mismos cambios que la muestra de sangre, los efectos de los cambios en el valor aparente de la medición pueden eliminarse utilizando el control de referencia. Este ejemplo demuestra que el control de referencia de la presente invención puede utilizarse para homogeneizar datos y corregir las variaciones interanalíticas ocasionadas por factores externos tales como el instrumento, la temperatura o los reactivos analíticos.

El Ejemplo 6 ilustra la eficacia de utilizar el control de referencia de la presente invención en la corrección de las variaciones intraanalíticas en una situación simulada. Se preparó una serie de muestras a partir de una muestra de sangre entera y cada una de las muestras de ensayo tiene una concentración de glóbulos rojos diferente. Las muestras de ensayo se procesaron y analizaron de acuerdo con el procedimiento analítico descrito en el Ejemplo 3, con el control de referencia marcado obtenido de un paciente diabético como control interno.

La Fig. 4 muestra los porcentajes de HbA1c de los glóbulos rojos de las muestras de ensayo y los análogos de glóbulos rojos del control de referencia frente a las concentraciones de glóbulos rojos de las muestras de ensayo. Como puede observarse, los porcentajes de HbA1c de las muestras de ensayo (curva A) y del control de

referencia (curva B) disminuyeron con el aumento de la concentración de glóbulos rojos de las muestras de ensayo. Sin embargo, después de dividir el porcentaje de HbA1c de las muestras de ensayo por el porcentaje de HbA1c del control de referencia y de normalizar el resultado, los porcentajes de HbA1c corregidos obtenidos de las muestras de ensayo (curva C) con diferentes concentraciones de glóbulos rojos eran sustancialmente equivalentes, e independientes del cambio en la concentración de células sanguíneas.

Como puede comprenderse, los análogos celulares del control de referencia, cuando se utilizan como control interno, se exponen a la misma condición que la muestra de sangre. Por lo tanto, los efectos de los cambios en el valor aparente de las mediciones pueden eliminarse utilizando el control de referencia. Este ejemplo demuestra además que el control de referencia de la presente invención puede utilizarse para corregir las variaciones intraanalíticas ocasionadas por factores intrínsecos de las muestras de sangre.

Los Ejemplos 7 y 8 ilustran adicionalmente los efectos correctores del control de referencia de la presente invención en las variaciones interanalíticas e intraanalíticas. En el Ejemplo 7 se proporciona un proceso detallado asignando un valor de referencia de porcentaje de HbA1c al control de referencia marcado utilizando una primera serie de 20 muestras de sangre que tienen porcentajes de HbA1c conocidos obtenidos mediante tres métodos de referencia existentes formulados por un laboratorio de referencia. Después de asignar el valor de referencia al control de referencia, se determinaron los porcentajes de HbA1c de otras dos series de muestras de sangre utilizando el control de referencia marcado como un control interno. Con fines comparativos, se calcularon también los porcentajes de HbA1c de otras dos series de muestras de sangre utilizando las primeras series de muestras de sangre a modo de referencia, sin utilizar la información correspondiente al control de referencia de la presente invención.

Como se muestra en las Tablas 3 y 4, la media de los porcentajes de HbA1c de las tres series de muestras de sangre obtenidas utilizando el presente control de referencia tenían una correlación sustancialmente mayor que los obtenidos sin utilizar el control de referencia. Además, la desviación estándar de los resultados de las tres series con el control interno era de 0,015, un valor sustancialmente mejorado con respecto a una desviación estándar de 0,079 sin el control interno.

En la evaluación del efecto corrector de la variación intraanalítica del Ejemplo 8, los resultados muestran que los porcentajes de HbA1c de las muestras de sangre obtenidas utilizando el presente método con el control de referencia marcado como un control interno tienen una mayor correlación con los resultados obtenidos con métodos de referencia existentes sustancialmente que los obtenidos sin utilizar el control interno. Por lo tanto, el uso del control de referencia de la presente invención mejora la consistencia intraanalítica.

El control de referencia de la presente invención tiene diversas ventajas. En primer lugar, los análogos celulares del control de referencia tienen una membrana celular permeada que es permeable a las muestras macromoleculares, tales como anticuerpos marcados con fluorescencia utilizados habitualmente para ensayos inmunológicos, y pueden utilizarse para ensayos célula a célula que utilicen marcadores intracelulares para marcar componentes intracelulares para simular un proceso de unión de marcadores intracelulares de una muestra que deba medirse. En segundo lugar, la hemoglobina celular de los análogos celulares del control de referencia puede medirse con una simple medición de dispersión lateral. Esto proporciona una gran ventaja en términos de la medición de la hemoglobina total de cada célula y una variante de hemoglobina de la célula en mediciones de una sola etapa de señales de dispersión lateral y de fluorescencia. La mayoría de los citómetros de flujo comerciales ofrecen la posibilidad de realizar ambas mediciones. En tercer lugar, los análogos celulares del control de referencia son marcados con un marcador fluorescente. Por lo tanto, el control de referencia puede utilizarse como un control interno. Los análogos celulares pueden ser fácilmente identificados y diferenciados de las células sanguíneas de las muestras que se desea medir. En cuarto lugar, el control de referencia es resistente al tratamiento de congelación-descongelación sin degradación de los componentes celulares de los análogos celulares que se desea medir y mantiene la permeabilidad de la membrana celular tras la congelación y la descongelación. Por lo tanto, el control de referencia de la presente invención puede almacenarse durante un período sustancialmente mayor que las células estabilizadas conocidas en la técnica, lo que significa una estabilidad de producto sustancialmente mayor. Como se ha descrito anteriormente, el control de referencia de la presente invención puede almacenarse en las condiciones de congelación anteriormente descritas durante el menos más de un año manteniendo las propiedades de los componentes celulares de los análogos celulares. En quinto lugar, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, en el proceso de preparación del control de referencia, no se utilizan agentes protectores convencionales, tales como glicerol o dimetilsulfóxido. Por lo tanto, se evita la interferencia de dichas sustancias químicas con el análisis que deba realizarse, especialmente cuando se añade el control de referencia en una muestra y se utiliza como control interno. Teniendo en cuenta las ventajas anteriormente descritas, el control de referencia de la presente invención tiene unas mejoras significativas en la utilidad y estabilidad de los controles de referencia en la citometría de flujo.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos y no deben interpretarse como limitativos en modo alguno del alcance de la invención según se define en las reivindicaciones. Se entenderá que pueden emplearse otros ingredientes y proporciones diferentes, de acuerdo con la siguiente descripción.

Ejemplo 1 Reactivos utilizados para preparar los análogos celulares para la medición de Hgb celular en citómetro de flujoComposición de reactivo de esferación

5 Se preparó un reactivo de esferación acuoso según la siguiente composición:

<u>Componente</u>	<u>Concentración</u>
Cloruro de sodio	137 mm
HEPES	5 mm
D(+) Trehalosa	0,5 mm
Formaldehído	83 mm
n-Dodecil beta-D-maltósido	40 mm
Proclin® -300	0,5 ml/l
Hidróxido sódico	cantidad para ajuste del pH a 7,5
Agua desionizada	cantidad suficiente hasta 1 litro

Los mencionados reactivos se filtraron a través de un filtro de nylon estéril de un tamaño de poro de 0,22 µm, salvo que se indique de otro modo.

Composición de reactivo de permeación

Se preparó el siguiente reactivo de permeación según la siguiente composición:

<u>Componente</u>	<u>Concentración</u>
N-lauroilsarcosina	2,03 mm
Ácido succínico	10 mm
Sacarosa	0,22 m
Albúmina de suero bovino	0,015 mm
Proclin® 300	0,5 ml/l
Pirrolidina	cantidad para ajuste del pH a 5,4
Agua desionizada	cantidad suficiente hasta 1 litro

El reactivo tenía una conductividad de 0,99 mS/cm y una osmolalidad de 268 mOsm/Kg H₂O. El Proclin 300 se obtuvo de los laboratorios Zymed de San Francisco (California).

Composición de reactivo de neutralización

Se preparó un reactivo de neutralización acuoso según la siguiente composición:

<u>Componente</u>	<u>Concentración</u>
HEPES	40 mm
Cloruro de sodio	0,5 m
Albúmina de suero bovino	0,91 mm
Azida sódica	0,03 m
Hidróxido sódico	cantidad para ajuste del pH a 7,25
Agua desionizada	cantidad suficiente hasta 1 litro

Composición de solución de lavado

Se preparó una solución de lavado según la siguiente composición:

<u>Componente</u>	<u>Concentración</u>
Cloruro de sodio	0,3 m
Sacarosa	0,58 m
Agua desionizada	cantidad suficiente hasta 1 litro
pH entre 5 y 8	

Composición de solución de almacenamiento

Se preparó una solución de almacenamiento según la siguiente composición:

<u>Componente</u>	<u>Concentración</u>
Cloruro de sodio	0,3 m
Sacarosa	0,87 m
Agua desionizada	cantidad suficiente hasta 1 litro

pH entre 5 y 8

Composición de reactivo de fijación

Se preparó un reactivo de fijación acuoso según la siguiente composición:

<u>Componente</u>	<u>Concentración</u>
Cloruro de sodio	155 mm
Fosfato disódico dihidratado	40 mm
Formaldehído	0,62 m
Ácido bórico	180 mm
EGTA	10 mm
Sulfato de dextrano (PM: 500.000)	0,016 µm
Hidróxido sódico	cantidad para ajuste del pH a 7,1
Agua desionizada	cantidad suficiente hasta 1 litro

Anticuerpo anti-HbA1c fluorescente

El anticuerpo anti-HbA1c fluorescente se preparó uniendo covalentemente una molécula de tinte fluorescente, Alexa Fluor® 647, al anticuerpo anti-HbA1c monoclonal con una proporción molecular de cinco moléculas de tinte por molécula de anticuerpo, según las instrucciones del fabricante. Alexa Fluor® 647 fue fabricado por Invitrogen Corporation, Carlsbad (California). El tinte tenía un pico de absorción a 647 nm.

Ejemplo 2 Preparación de un control de referencia marcado

Se tomó sangre entera de un donante, con 0,7 mm de ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) como anticoagulante. La sangre entera se almacenó a 4 °C durante no más de tres días.

El suero autólogo se preparó a partir de una parte de la sangre entera. La sangre entera se centrifugó a 300 g durante 5 minutos y se retiraron completamente las partículas del sobrenadante mediante una segunda centrifugación de 5 minutos a 13.000 g.

0,1 ml de la sangre entera se lavaron tres veces con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) mediante centrifugación a 300 g. Después del lavado, se añadió 1 ml de PBS mezclado con 0,01 ml de éster succinidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA-SE) al material en forma de pellet, y la suspensión celular se incubó durante tres horas a temperatura ambiente con mezclado ocasional para permitir que el éster succinidílico de carboxifluoresceína (CFSE) marcara las proteínas celulares. Después de la incubación, la suspensión celular se centrifugó a 300 g y se lavó una vez más con 1 ml de PBS. El material en forma de pellet se llevó a 0,05 ml de suero autólogo para formar sangre reconstituida y marcada. El PBS utilizado contenía 150 mm de cloruro sódico y 10 mm de fosfato sódico, con un pH de 7,4. El éster succinidílico de diacetato de carboxifluoresceína tenía una concentración de 10 mg/ml de dimetilsulfóxido, que se almacenó a -20 °C antes de usarlo.

La sangre reconstituida y marcada se mezcló con 0,4 ml del reactivo de esferación del Ejemplo 1 y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se añadieron 16 ml del reactivo de permeación del Ejemplo 1, se mezcló y se incubó durante 3 minutos más a temperatura ambiente para permear la membrana celular y dar lugar a la agregación de la proteína intracelular. A continuación, se añadieron 8 ml del reactivo de neutralización del Ejemplo 1 para inhibir reacciones adicionales del reactivo de permeación. La mezcla de neutralización formada, que tenía un volumen total de 24,45 ml, se añadió a modo de capa a 20 ml de la solución de lavado del Ejemplo 1 en un tubo de centrífuga y se centrifugó durante 10 minutos a 300 g. Tras retirar el sobrenadante, el material en forma de pellet se llevó a 5 ml de la solución de almacenamiento del Ejemplo 1 para formar una suspensión análoga, que es el control de referencia marcado. La suspensión análoga se dispuso a un volumen de 0,5 ml a viales de 1 ml, que se taparon, y se congeló a -50 °C en menos de una hora. Antes del uso, se descongeló un vial de control de referencia marcado congelado a temperatura ambiente y se mezcló suavemente para formar una suspensión análoga homogénea antes de añadirlo a una muestra de sangre para analizar, o de utilizarlo como control independiente.

Ejemplo 3 Análisis cuantitativo de la hemoglobina celular y porcentaje de hemoglobina glicada (HbA1c) de una muestra de sangre utilizando el control de referencia marcado como control interno

Se utilizó una muestra de sangre entera en un tubo de ensayo que contenía 0,7 mm de EDTA como anticoagulante. La muestra de sangre se almacenó a 4 °C durante no más de tres días. Para el análisis se utilizó un control de referencia marcado preparado utilizando sangre entera de un paciente diabético y el proceso de preparación del Ejemplo 2.

Se mezcló una alícuota de 4 µl de la muestra de sangre entera con 200 µl del reactivo de esferación del Ejemplo 1, que contenía también 8,3 µl de naranja de acridina, y se formó una mezcla de muestra teñida. Al cabo de 1 minuto de incubación, se mezclaron 3 µl de la mezcla de muestra teñida con 60 µl del reactivo de permeación del Ejemplo 1, formando la primera mezcla de muestra. Al cabo de 1,5 minutos de incubación, se añadieron 5 µl del control de

referencia marcado a la primera mezcla de muestra y se mezcló. Al cabo de 1 minuto de incubación, se añadieron 100 µl del reactivo de neutralización del Ejemplo 1 y se mezcló, formando una segunda mezcla de muestra. El reactivo de neutralización contenía 5 mg/l de anticuerpo anti-HbA1c fluorescente del Ejemplo 1. Al cabo de 10 minutos más de incubación, se añadieron 80 µl del reactivo de fijación del Ejemplo 1, formando una mezcla de muestra final.

La mezcla de muestra final se analizó en un citómetro FC500 MCL mediante mediciones de dispersión directa y dispersión lateral y mediciones de fluorescencia a 525 nm (FL1) y a 675 nm (FL4). Las Figs. 1A a 1C muestran los diagramas de dispersión obtenidos de dispersión directa (FS) frente a dispersión lateral (SS), FS frente a FL1 y FL1 frente a FL4, respectivamente.

En la Fig. 1A, la región A contenía los glóbulos rojos de la muestra de sangre y los análogos de glóbulos rojos del control de referencia marcado, que se seleccionan en este diagrama de dispersión para un posterior análisis diferencial utilizando fluorescencia como se muestra en las Figs. 1B y 1C. Las poblaciones fuera de la región A eran glóbulos blancos y plaquetas. En la Fig. 1B, la región B contenía los glóbulos rojos maduros de la muestra de sangre; la región C contenía reticulocitos de la muestra de sangre marcados con naranja de acridina; y la región D contenía los análogos de glóbulos rojos del control de referencia marcado marcados con CFSE. En la Fig. 1C, la región F contenía los glóbulos rojos maduros de la muestra de sangre, la región G contenía los reticulocitos de la muestra de sangre, y la región E contenía los análogos de glóbulos rojos del control de referencia marcado.

La hemoglobina celular media de la muestra (que tiene correlación con la MCH) se obtuvo a partir del promedio de los valores de dispersión lateral (SS) de glóbulos rojos individuales medidos con el citómetro FC500 MCL. El contenido de HbA1 de la muestra de sangre se obtuvo a partir del promedio de señales de fluorescencia de los glóbulos rojos individuales a 675 nm (FL4), tras la sustracción de un valor de fondo de fluorescencia. El valor de fondo de fluorescencia se obtuvo analizando muestras de sangre utilizando el procedimiento analítico anteriormente descrito, en ausencia del anticuerpo HbA1c y en presencia de un anticuerpo monoclonal de control isotópico no específico (IgG1) que estaba covalentemente conjugado a Alexa Fluor 647. El porcentaje de HbA1c de la muestra de sangre se obtuvo a partir de los valores medios de FL4/SS de todos los glóbulos rojos medidos de una muestra de sangre, que es un valor medio o promedio de porcentaje de HbA1c celular de los glóbulos rojos.

Ejemplo 4 Estabilidad del control de referencia después de descongelar

Se preparó un control de referencia marcado utilizando sangre entera de un paciente diabético y con el proceso de preparación descrito en el Ejemplo 2. Este control de referencia marcado se añadió a una muestra de sangre entera normal, como control interno, y la muestra de sangre se analizó utilizando el procedimiento de ensayo descrito en el Ejemplo 3.

Los ensayos se realizaron inmediatamente después de la descongelación de un vial de suspensión análoga congelada 1,5 horas, 2,5 horas y 20 horas después de descongelar, respectivamente. En los intervalos de tiempo entre las pruebas analíticas, la muestra de sangre y el control de referencia marcado se mantuvieron a temperatura ambiente antes de añadir el control de referencia marcado a la muestra de sangre. Los ajustes del citómetro se mantuvieron constantes durante este experimento.

Los análisis de las señales de dispersión lateral y las señales de FL4 de los glóbulos rojos de la muestra de sangre y de los análogos del control de referencia se llevaron a cabo por separado. Más concretamente, los glóbulos rojos maduros y los reticulocitos de la muestra de sangre y de los análogos de glóbulos rojos del control de referencia se diferenciaron primero por los diagramas de dispersión FS frente a FL1 como se ilustra en la Fig. 1B. Tras la diferenciación, se obtuvieron los diagramas de dispersión celular para cada una de dichas poblaciones. Las señales de FL4 de los glóbulos rojos maduros, reticulocitos y análogos se obtuvieron a partir de los diagramas de dispersión de FL1 frente a FL4 como se ilustra en la Fig. 1C.

Las Figs. 2A y 2B muestran, respectivamente, las señales de dispersión lateral promedio y las señales FL4 promedio frente al tiempo después de descongelar el control de referencia marcado. Las curvas designadas por la letra A se obtuvieron a partir de los glóbulos rojos de la muestra de sangre y las curvas designadas por la letra B se obtuvieron a partir de los análogos de glóbulos rojos del control de referencia marcado. En las Figs. 2A y 2B el tiempo cero es el momento de finalización de la descongelación.

Como puede observarse, las señales de dispersión lateral promedio de los glóbulos rojos de la muestra y de los análogos de glóbulos rojos del control de referencia marcado permanecieron estables al cabo de 20 horas, lo que indica que el contenido de hemoglobina de los análogos se mantuvo estable tras la descongelación. Por otra parte, se observó una pequeña disminución de las señales de FL4 en las dos primeras horas posteriores a la descongelación, lo que indicaba una pequeña disminución de la cantidad de antígeno de HbA1c tanto en los glóbulos rojos de la muestra de sangre como de los análogos del control de referencia. Sin embargo, tras la disminución inicial, las señales FL4 de los análogos de glóbulos rojos permanecieron estables en el transcurso de 20 horas. Como puede observarse, las señales FL4 de los análogos eran ligeramente más estables que las de los glóbulos rojos de la muestra de sangre.

Ejemplo 5 Uso del control de referencia en la simulación de la variación interanalítica debida al cambio del voltaje del detector FL4

En este experimento se utilizó una muestra de sangre entera normal, con el control de referencia marcado obtenido de un paciente diabético como control interno.

Se preparó la muestra de sangre utilizando el procedimiento analítico descrito en el Ejemplo 3 y se analizó en un citómetro FC500 MCL a diferentes voltajes del tubo fotomultiplicador (PMT) del detector FL4. Se obtuvieron las señales de dispersión lateral y las señales FL4 de los glóbulos rojos maduros y de los análogos de glóbulos rojos para cada ajuste del PMT, con el proceso anteriormente descrito. Para cada ajuste del PMT, el porcentaje de HbA1c de los glóbulos rojos de la muestra de sangre se obtuvo dividiendo el valor promedio de FL4 por el valor de dispersión lateral promedio de los glóbulos rojos. De modo similar, el porcentaje de HbA1c de los análogos del control de referencia marcado se obtuvo dividiendo el valor promedio de FL4 por el valor de dispersión lateral promedio de los análogos para cada ajuste del PMT.

La Fig. 3 muestra los porcentajes de los glóbulos rojos maduros de la muestra de sangre y los análogos de glóbulos rojos del control para diferentes ajustes del PMT. Como puede observarse, el aumento del voltaje del PMT aumentó el porcentaje de HbA1c de la muestra de sangre (curva A) y del control (curva B). Sin embargo, tras dividir el porcentaje de HbA1c de la muestra de sangre por el porcentaje de HbA1c del control de referencia para cada ajuste del PMT, y multiplicarlo por un factor de 6 para normalizar los datos, los porcentajes de HbA1c corregidos obtenidos de la muestra de sangre (curva C) para diferentes ajustes del PMT eran constantes y reproducibles.

Ejemplo 6 Uso del control de referencia marcado en la simulación de la variación intraanalítica debida al cambio de la concentración de glóbulos rojos en una muestra

Se prepararon muestras de ensayo que tenían diferentes concentraciones de glóbulos rojos del siguiente modo. Se centrifugó una muestra de sangre entera con EDTA como anticoagulante (ver Ejemplo 2) a 300 g. Se retiró el suero y a continuación se resuspendieron las células empaquetadas en una cantidad de suero, aproximadamente un tercio del volumen de las células empaquetadas. Se distribuyeron 100 µl de las células resuspendidas en nueve tubos, uno a uno, y a cada tubo se añadió un volumen diferente del suero, de cero a 160 µl. Las concentraciones reales de los glóbulos rojos de estas muestras de ensayo se determinaron contando las células en el citómetro.

Las muestras de ensayo se procesaron y analizaron de acuerdo con el procedimiento analítico descrito en el Ejemplo 3, con el control de referencia marcado obtenido de sangre entera de un paciente diabético como control interno.

La Fig. 4 muestra los porcentajes de HbA1c de los glóbulos rojos de las muestras de ensayo y los análogos de glóbulos rojos del control de referencia frente a las concentraciones de glóbulos rojos de la muestra de ensayo. Como puede observarse, los porcentajes de HbA1c de las muestras de ensayo (curva A) y del control de referencia (curva B) disminuyeron con el aumento de la concentración de glóbulos rojos de las muestras de ensayo. Sin embargo, tras dividir el porcentaje de HbA1c de las muestras de ensayo por el porcentaje de HbA1c del control de referencia, y multiplicarlo por un factor de 6 para normalizar los datos, los porcentajes de HbA1c corregidos obtenidos de las muestras de sangre (curva C) con diferentes concentraciones de glóbulos rojos eran sustancialmente equivalentes.

Ejemplo 7 Corrección de la variación interanalítica en la medición del porcentaje de HbA1c utilizando el control de referencia

Se utilizaron tres series de 20 muestras de sangre para evaluar la variación interanalítica en la medición del porcentaje de HbA1c utilizando el control de referencia marcado como control interno. El porcentaje de HbA1c de cada muestra de sangre fue determinado por un laboratorio de referencia utilizando tres métodos estándar de medición de HbA1c diferentes, concretamente utilizando cromatografía de afinidad en Primus® Ultra2 (Primus Diagnostics, Missouri), inmunoturbidimetría en Roche® Unimate (Roche Diagnostic Corporation, Indiana), y cromatografía de intercambio iónico en Tosoh® G7 (Tosoh Bioscience Inc., California). Los porcentajes de HbA1c del laboratorio de referencia fueron conforme a la estandarización NGSP (David Sachs para el grupo de trabajo ADA/EASD/IDF del análisis de HbA1c; Clinical Chemistry 2005; 51: 681-683). Entre la primera y la segunda series hubo un intervalo de tiempo de 4 semanas, y entre la segunda y la tercera series hubo un intervalo de tiempo de 2 semanas.

En paralelo con las mediciones de HbA1c llevadas a cabo por el laboratorio de referencia, las 20 muestras de sangre de cada serie se analizaron utilizando el método de la presente invención con el procedimiento de ensayo descrito en el Ejemplo 3 utilizando el control de referencia marcado obtenido a partir de sangre entera de un paciente diabético como control interno. Las condiciones experimentales y los ajustes del citómetro permanecieron idénticas en los análisis de las tres series de muestras de sangre.

Los porcentajes de HbA1c obtenidos utilizando el método de la presente invención se calcularon a partir de datos brutos recogidos en un citómetro FC500 MCL del siguiente modo:

1. Se sustrajo una fracción de 13,3% de las señales FL1 generados por naranja de acridina y/o CFSE de las señales FL4 de anticuerpo anti-HbA_{1c}-Alexa Fluor 647 para compensar el efecto de propagación de FL1 a FL4. Esta es una compensación FL1-FL4, utilizada habitualmente en mediciones de fluorescencia multicolor en citómetros de flujo.

2. Se sustrajo un valor de fondo de fluorescencia, obtenido como se describe en el Ejemplo 3 de los valores de FL4 resultantes.

3. El valor de FL4 corregido de un glóbulo rojo obtenido tras las etapas 1 y 2 que representaban el contenido de HbA_{1c} celular del glóbulo rojo se dividió por el valor de dispersión lateral (SS), que reflejaba la hemoglobina celular del glóbulo rojo, para obtener FL4/SS para cada glóbulo rojo. El promedio de los valores de FL4/SS de todos los glóbulos rojos medidos de una muestra de sangre era el promedio de los porcentajes de HbA_{1c} celular de la muestra, que tenían una correlación con el porcentaje de HbA_{1c} de la misma muestra de sangre obtenida del laboratorio de referencia.

4. Para normalizar los valores de FL4/SS y llevarlos al intervalo de porcentaje de HbA_{1c} podría utilizarse el promedio de los valores de porcentaje de HbA_{1c} de los tres métodos de referencia (ver Tabla 1A). Esto se llevó a cabo cuando debía asignarse un valor de referencia del control de referencia marcado. Para una muestra de sangre para analizar, los valores de FL4/SS podrían normalizarse utilizando el valor de referencia del control de referencia marcado (ver la Tabla 1B). La Fig. 5A muestra la correlación de los valores de FL4/SS normalizados con los valores de porcentaje de HbA_{1c} de las mismas muestras de sangre obtenidas del laboratorio de referencia. Cabe observar que en las Tablas 1A y 1B el valor FL4/SS de la muestra de sangre del control de referencia es el promedio de los valores FL4/SS de todas las células medidas o los análogos de glóbulos rojos.

5. Como se muestra en la Fig. 5, había una ligera correlación no lineal de los valores FL4/SS con los resultados del laboratorio de referencia en el extremo superior, lo cual se cree que fue debido al impedimento estérico entre las moléculas de anticuerpos conjugados dentro de las células y que dependía de la densidad de antígenos en las células. Para corregir esta débil correlación no lineal en el extremo superior, los valores FL4/SS normalizados se sometieron a la siguiente transformación:

$$\text{Valor FL4/SS transformado} = e^{0,157 \times \text{valor FL4/SS normalizado} + 1}$$

Esta fórmula fue válida en el intervalo de valores FL4/SS de aproximadamente 3 a 15.

Para la transformación inversa se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Valor FL4/SS normalizado} = (\text{LN}(\text{valor FL4/SS transformado}) - 1) / 0,157$$

Debe entenderse que las fórmulas anteriormente descritas se adaptaron a los datos de porcentaje de HbA_{1c} estandarizados según NGSP. La transformación anterior se desarrolló empíricamente y proporcionó una mejor correlación lineal con los valores de HbA_{1c} del laboratorio de referencia (ver Figs. 5A y 5B). Las diversas transformaciones matemáticas de los datos correspondientes al citómetro de flujo pueden usarse para proporcionar una correlación lineal con los datos del laboratorio de referencia. Preferiblemente, se utilizó una fórmula exponencial simple anteriormente mostrada puesto que resultaba sencillo realizar la transformación directa o inversa de los datos como se describe en la presente memoria.

Los símbolos utilizados en los cálculos anteriormente descritos se resumen en las Tablas 1A y 1B.

Tabla 1A. Asignación de un valor de referencia de porcentaje de HbA_{1c} al control de referencia marcado utilizando muestras de sangre con valores de porcentaje de HbA_{1c} conocidos.

Parámetros	Símbolos
Valor de FL4/SS corregido de la muestra de sangre	a
Valor de FL4/SS corregido del control de referencia marcado	b
Porcentaje de HbA _{1c} de las muestras de sangre del laboratorio de referencia	c
Valor de FL4/SS normalizado del control de referencia marcado	d = b*c ^{transformación inversa}
Valor de referencia asignado de porcentaje de HbA _{1c} del control de referencia marcado	e = d ^{transformado}

Tabla 1B. Determinación del porcentaje de HbA1c de una muestra de sangre utilizando el valor de referencia del control interno

Parámetros	Símbolos
Valor de FL4/SS corregido de la muestra de sangre	a
Valor de FL4/SS corregido del control de referencia marcado	b
valor de referencia de porcentaje de HbA1c del control de referencia marcado	e
Valor de FL4/SS normalizado de la muestra de sangre	$f = a * e^{\text{transformación inversa}} / b$
Porcentaje de HbA1c/SS de la muestra de sangre	$g = f^{\text{transformado}}$

5 Utilizando valores de porcentaje de HbA1c de la primera serie de muestras de sangre del laboratorio de referencia, se asignó un valor de referencia de porcentaje de HbA1c del control de referencia marcado según la Tabla 1A del siguiente modo:

el valor FS/SS corregido medio de 20 muestras, (a) = 6,19;

10

el valor FS/SS corregido medio del control de referencia marcado en las 20 muestras, (b) = 7,63;

los valores promedio de porcentaje de HbA1c del laboratorio de referencia correspondientes a las 20 muestras, (c) = 7,13;

15

los valores promedio de porcentaje de HbA1c del laboratorio de referencia resultantes de la transformación inversa correspondientes a las 20 muestras, $c^{\text{transformación inversa}} = 6,01$;

el valor FS/SS corregido normalizado medio del control de referencia marcado en las 20 muestras, (d) = $7,63 * 6,01 / 6,19 = 7,41$;

20

el valor de referencia asignado de porcentaje de HbA1c del control de referencia marcado, (e) = $d^{\text{transformado}} = 8,70$.

Utilizando el valor de referencia asignado de porcentaje de HbA1c (e) del control de referencia marcado, se calculó el porcentaje de HbA1c (g) de cada muestra de sangre de las tres series según la Tabla 1B, y los resultados se muestran en la Tabla 2. Como se ha definido anteriormente, el porcentaje de HbA1c (g) de la muestra de sangre es el promedio de porcentajes de HbA1c celular. Como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, la primera serie de muestras de sangre se utilizó para asignar al control de referencia el valor de referencia, por lo tanto, el porcentaje de HbA1c de la primera serie se calculó como un grupo de control en la evaluación.

30

Tabla 2. Cálculo de los porcentajes de HbA1c de las muestras para las tres series de muestras

Primera serie				
N.º de muestra	a	b	f	g
1	7,15	7,53	7,03	8,2
2	4,19	7,9	3,93	5,04
3	6,8	7,71	6,54	7,59
4	4,06	7,64	3,93	5,04
5	7,4	7,93	6,91	8,05
6	6,69	7,65	6,48	7,51
7	4,47	7,8	4,25	5,3
8	6,97	7,4	6,98	8,13
9	8,16	7,48	8,08	9,67
10	6,07	7,64	5,88	6,84
11	5,96	7,6	5,81	6,76
12	5,92	7,53	5,82	6,78
13	6,94	7,43	6,92	8,05
14	5,16	7,92	4,82	5,8
15	6,68	7,37	6,72	7,81
16	5,48	7,53	5,39	6,33
17	5,86	7,9	5,49	6,44
18	8,44	7,32	8,55	10,4

19	6,03	7,71	5,79	6,75
20	5,47	7,55	5,37	6,31
Promedio	6,19	7,63	6,03	7,14

Segunda serie				
N.º de muestra	a	b	f	g
1	5,95	7,09	6,22	7,22
2	7	7,32	7,08	8,27
3	6,03	7,17	6,23	7,23
4	7	7,16	7,24	8,47
5	3,79	7,4	3,79	4,93
6	8,69	6,78	9,5	12,07
7	5,28	7,06	5,54	6,49
8	7,78	6,91	8,35	10,08
9	5,2	6,88	5,6	6,55
10	3,65	7,04	3,85	4,97
11	7,05	6,56	7,96	9,48
12	3,6	7,18	3,71	4,87
13	5,6	7,06	5,88	6,85
14	6,54	6,95	6,97	8,12
15	6,23	6,8	6,8	7,9
16	7,44	6,35	8,68	10,62
17	4,12	7,23	4,22	5,27
18	6,88	6,7	7,61	8,97
19	6,05	7,34	6,11	7,09
20	8,24	6,23	9,8	12,67
Promedio	6,11	6,96	6,56	7,91

Tercera serie				
N.º de muestra	a	b	f	g
1	9,54	8,03	8,8	10,83
2	5,77	7,94	5,38	6,33
3	6,55	7,74	6,27	7,27
4	10,35	7,67	10	13,06
5	5,36	7,91	5,02	5,98
6	7,73	7,84	7,3	8,55
7	9,42	7,98	8,74	10,72
8	6,56	7,83	6,21	7,21
9	7,53	7,85	7,11	8,3
10	8,13	7,04	8,55	10,41
11	5,9	7,97	5,49	6,43
12	4,19	8,08	3,84	4,97
13	7,39	7,94	6,9	8,03
14	8,46	8,31	7,54	8,88
15	4,2	7,85	3,97	5,07
16	8,17	7,76	7,79	9,24
17	7,51	7,74	7,2	8,41
18	4,92	7,89	4,62	5,62
19	6,11	7,78	5,82	6,77
20	5,1	8,03	4,71	5,69
Promedio	6,94	7,86	6,56	7,89

Para demostrar la utilidad del control de referencia marcado, se llevó a cabo una determinación similar de porcentajes de HbA1c sin utilizar el control de referencia marcado. En la primera serie, los 20 valores FS/SS corregidos se normalizaron utilizando su valor medio (a) y el promedio de los 20 valores del laboratorio de referencia resultantes de la transformación inversa ($c^{\text{transformación inversa}}$) con la ecuación de $(f) = (\text{promedio de } c^{\text{transformación inversa}}) / (\text{promedio de } a)$; (g) se calculó mediante transformación de (f). Los siguientes resultados se obtuvieron utilizando el factor de normalización de la primera serie para la segunda y tercera series y se compararon con los resultados de las tres series utilizando el control de referencia (Tabla 3).

Además, tomando la primera serie como referencia y calculando los datos de la segunda y tercera serie con o sin utilizar el control de referencia marcado como control interno, se obtuvieron las relaciones del promedio de los valores de porcentaje de HbA1c obtenidos a los valores del laboratorio de referencia, las cuales se muestran en la Tabla 4.

5 **Tabla 3.** Promedio de porcentajes de HbA1c de las tres series de muestras de sangre

Series	Promedio sin el control interno	Promedio con el control interno	Valores del laboratorio de referencia
1	7,09	7,14	7,13
2	7,05	7,91	8,05
3	8,10	7,89	7,85

Tabla 4.

Series	Relación sin el control interno	Relación con el control interno
1	1,0	1,0
2	0,88	0,98
3	1,03	1,01

Además, la desviación estándar de los resultados de las tres series sin el control interno fue de 0,079, mientras que la desviación estándar de los resultados de las tres series con el control interno fue de 0,015.

Ejemplo 8 Corrección de la variación intraanalítica en la medición del porcentaje de HbA1c utilizando el control de referencia

Para analizar la variación intraanalítica, se analizaron los datos obtenidos de las tres series de muestras de sangre del Ejemplo 7.

Los porcentajes de HbA1c obtenidos utilizando el presente método, utilizando y sin utilizar el control de referencia marcado como control interno se representaron frente a los porcentajes de HbA1c proporcionados por el laboratorio de referencia, como se muestra en las Figs. 6A y 6F. Las Figs. 6A y 6b muestran las curvas de correlación de la primera serie de muestras de sangre. Las Figs. 6C y 6D, y las Figs. 6E y 6F muestran, respectivamente, las curvas de correlación de las segundas y terceras series. Entre ellas, las Figs. 6A, 6C y 6E muestran las curvas de correlación de los porcentajes de HbA1c obtenidos utilizando el presente método sin utilizar el control interno. Las Figs. 6B, 6D y 6F muestran las curvas de correlación de los porcentajes de HbA1c obtenidos utilizando el presente método utilizando el control interno.

Para cada experimento se representó desde el origen la línea recta mejor ajustada. El coeficiente de correlación (r^2) y la pendiente (y) de las curvas de correlación se muestran en la Tabla 5. El punto de corte (x) es cero.

Tabla 5.

Series	r^2	r^2	y	y
	Sin el control interno	Con el control interno	Sin el control interno	Con el control interno
1	0,9469	0,9609	0,9872	0,9972
2	0,8075	0,9661	0,8589	0,9796
3	0,8662	0,9275	1,0270	1,0026

Los resultados muestran que los porcentajes de HbA1c de las muestras de sangre obtenidas utilizando el método de la presente invención con el control de referencia marcado como control interno tienen una correlación con los resultados obtenidos de métodos de referencia existentes sustancialmente mayor que los obtenidos sin utilizar el control interno. Por lo tanto, el uso del control interno de la presente invención mejora la consistencia intraanalítica.

REIVINDICACIONES

1. Un control de referencia congelado para el análisis célula a célula en un analizador de tipo citómetro de flujo que comprende:
5
análogos celulares formados de células sanguíneas permeadas que contienen en su interior proteínas intracelulares agregadas y uno o más sitios antigénicos de los mismos conservados, que tienen una membrana celular permeable a un anticuerpo; y
10
una solución de almacenamiento que comprende una sal en una concentración de 0,05 M a 2 M y un sacárido en una concentración de 0,1 M a 2 M, en donde dicha solución de almacenamiento no contiene agentes protectores que interfieren con el análisis que deba llevarse a cabo;
15
en donde dichos análogos celulares se suspenden en dicha solución de almacenamiento y dichos análogos celulares mantienen dichos uno o más sitios antigénicos conservados de dichas proteínas después de descongelar dicho control de referencia congelado.
2. El control de referencia de la reivindicación 1, en donde dichos análogos celulares están formados de células sanguíneas de un individuo que tiene un nivel normal o anormal de un antígeno de interés.
20
3. El control de referencia de la reivindicación 2, en donde dicho individuo es un mamífero, un ave, o un reptil.
4. El control de referencia de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dichos análogos celulares son análogos de glóbulos rojos formados de glóbulos rojos permeados que comprenden sitios antigénicos conservados de una o más variantes de hemoglobina.
25
5. El control de referencia de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dichos análogos celulares comprenden además un marcador celular unido a uno o más componentes celulares de dichas células sanguíneas permeadas.
30
6. El control de referencia de la reivindicación 5, en donde dicho marcador celular es un tinte fluorescente.
7. El control de referencia de la reivindicación 6, en donde dicho tinte fluorescente es éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE).
35
8. El control de referencia de la reivindicación 4, en donde dichos análogos celulares y dicha solución de almacenamiento se congelan, y dichos análogos celulares mantienen dichos sitios antigénicos conservados de dichas una o más variantes de hemoglobina tras la descongelación.

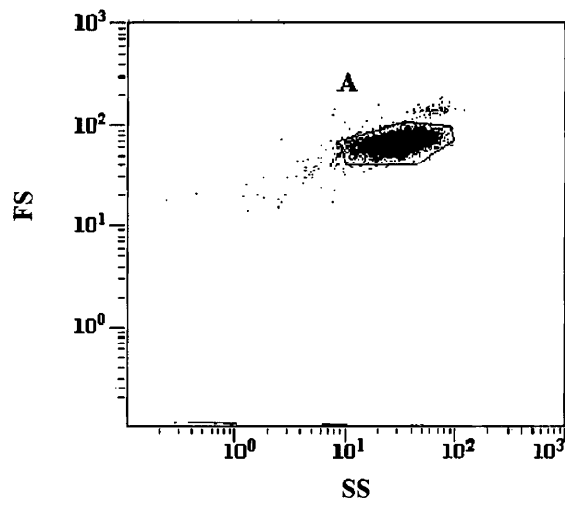


Fig. 1A

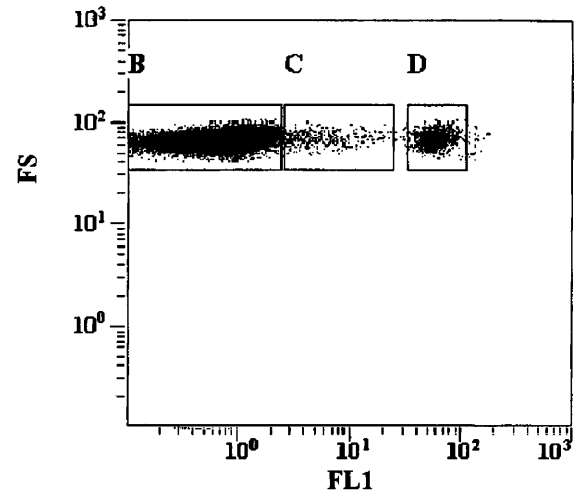


Fig. 1B

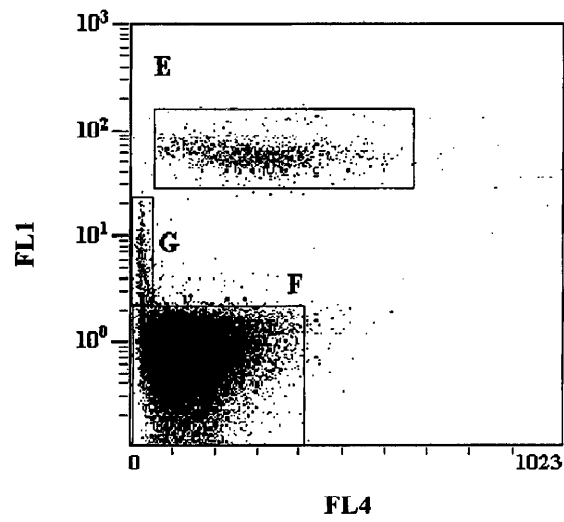


Fig. 1C

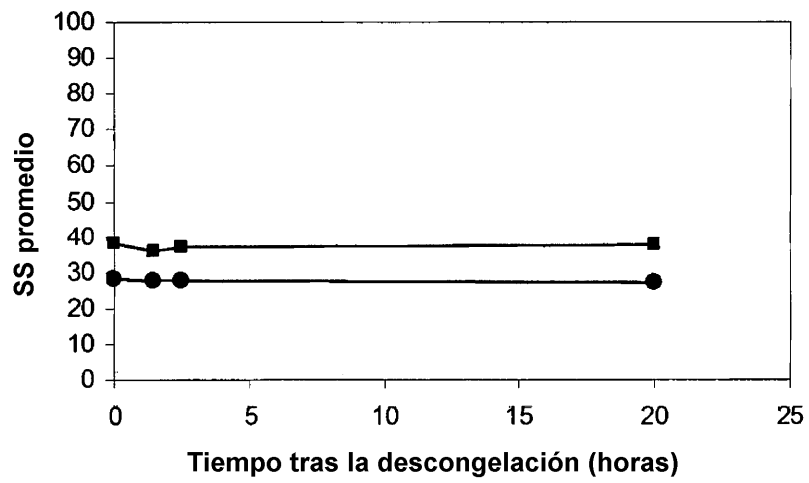


Fig. 2A

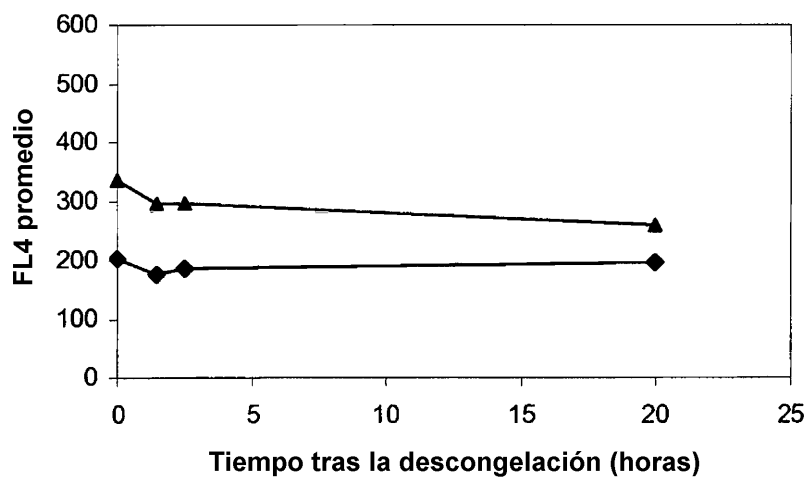


Fig. 2B

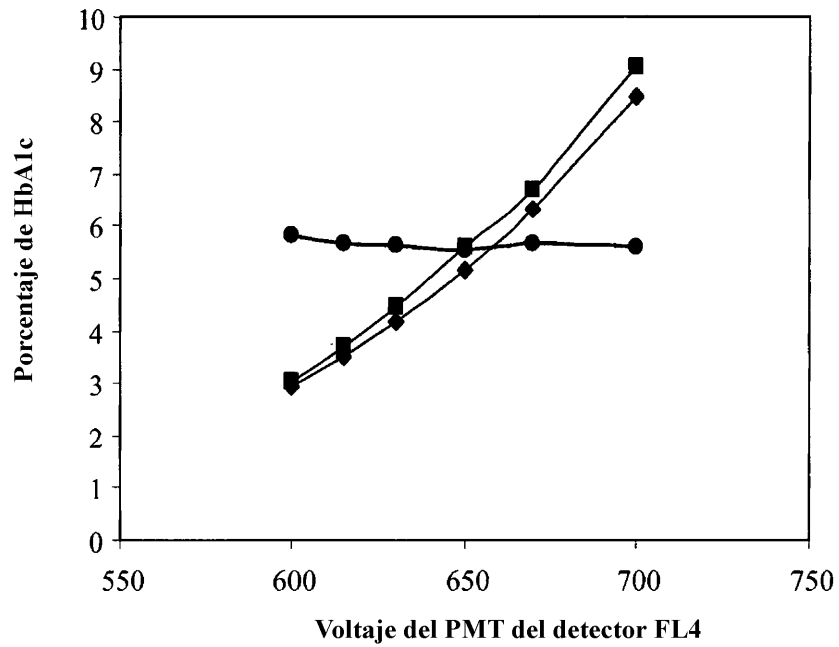


Fig. 3

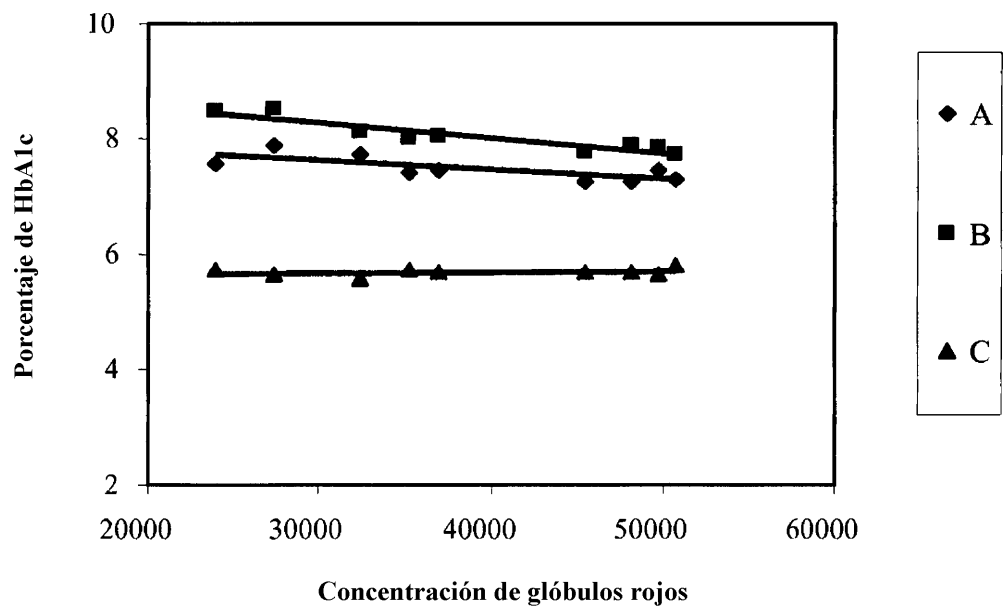


Fig. 4

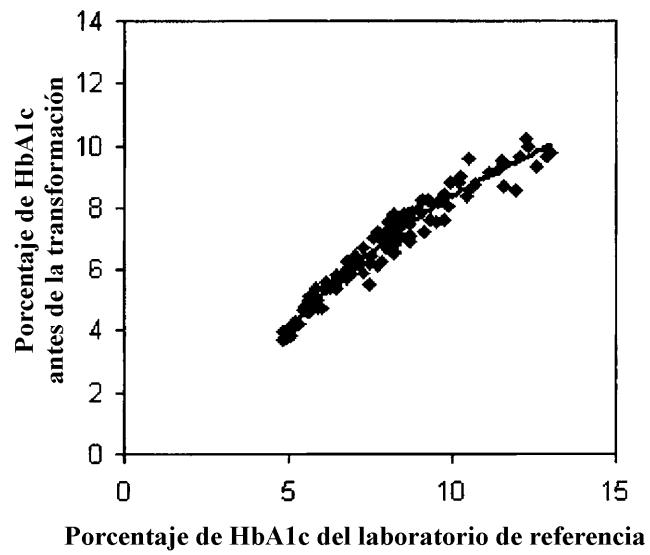


Fig. 5A

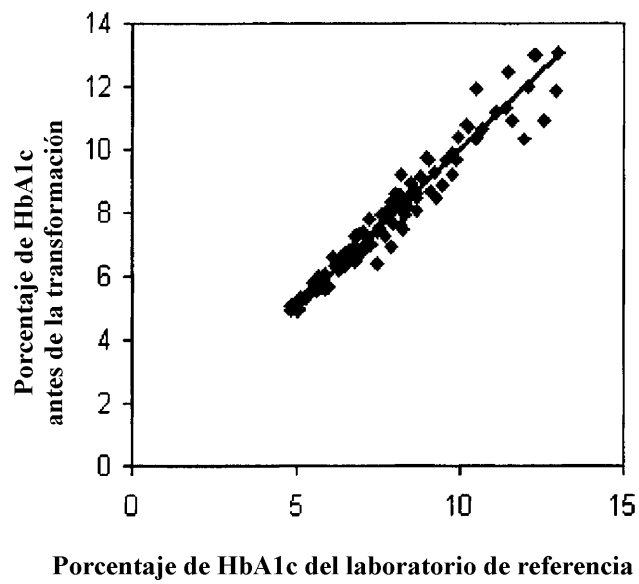


Fig. 5B

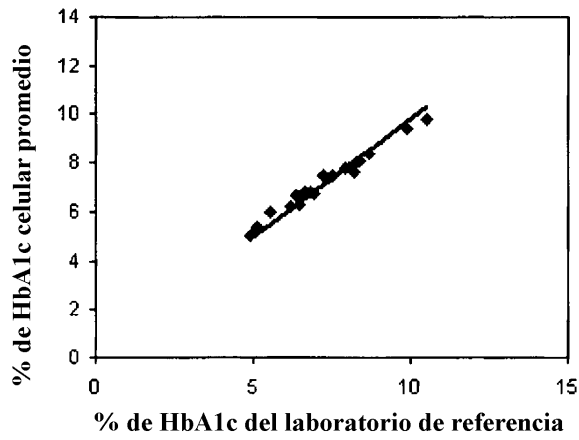


Fig. 6A

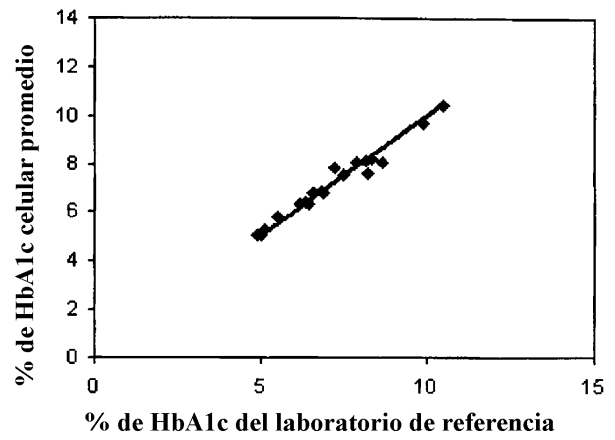


Fig. 6B

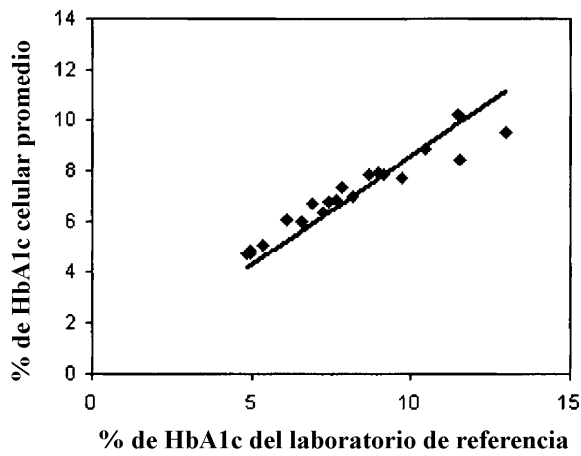


Fig. 6C

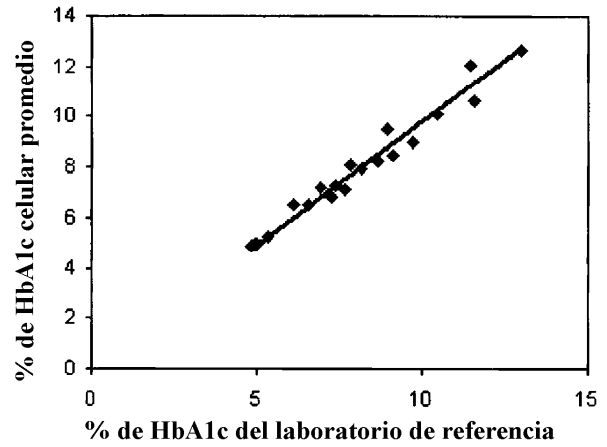


Fig. 6D

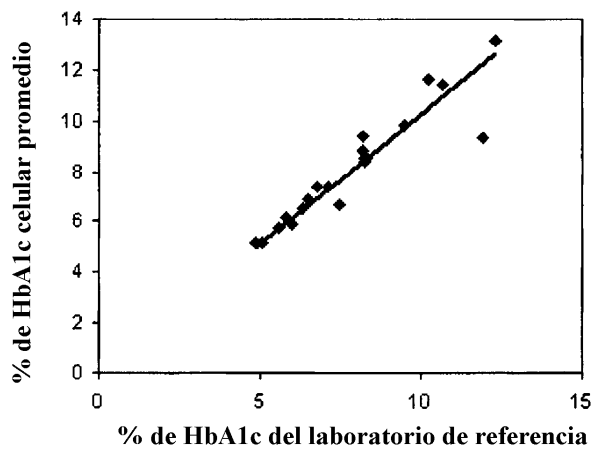


Fig. 6E

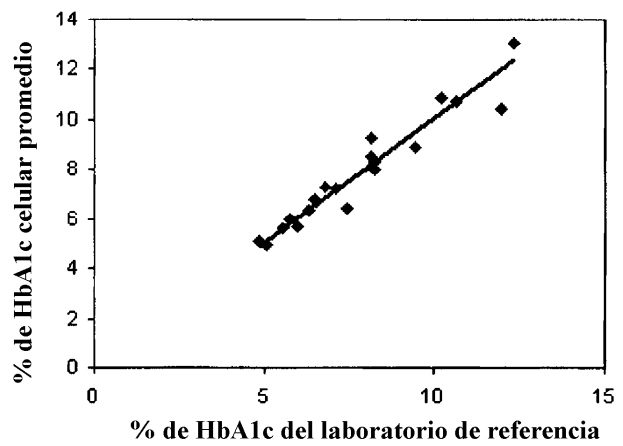


Fig. 6F