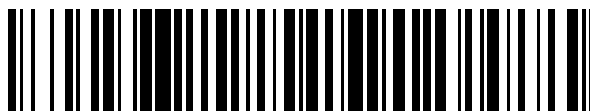


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 151**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/80 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.04.2012** **PCT/US2012/032603**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012** **WO12139047**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2012** **E 12718782 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019** **EP 2694960**

54 Título: **Identificación y enumeración de células granuladas tempranas (EGC)**

30 Prioridad:

07.04.2011 US 201161472974 P

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

18.07.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

RAMIREZ, CARLOS, A. y
LU, JIULIU

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 720 151 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

Identificación y enumeración de células granuladas tempranas (EGC)

5 **Antecedentes****Campo de la invención**

10 Las realizaciones de la presente memoria descriptiva se refieren en general al análisis de datos de acontecimientos celulares generados por un analizador de partículas, y más particularmente a la detección y enumeración de células granuladas tempranas (EGC) en muestras de sangre.

Antecedentes

15 Los analizadores de partículas se usan para analizar muestras celulares biológicas de manera que se determina el recuento y/o la distribución de uno o más tipos de células contenidas en las muestras. Los analizadores de partículas incluyen analizadores para hematología y citómetros de flujo. Los analizadores para hematología y citómetros de flujo miden y diferencian células sanguíneas de diversos tipos recogiendo y analizando señales producidas cuando las células pasan a través de una pequeña apertura o región de medición que se monitoriza mediante uno o más sensores. Por ejemplo, se hace fluir una muestra de sangre a través de una región de medición en la que una o más fuentes de energía y sensores asociados se configuran para detectar señales correspondientes a diversas características físicas de las células que pasan a su través. Una o más de las señales correspondientes a las mediciones de una única célula en la región de medición se denomina un acontecimiento celular. Entonces se analizan datos de acontecimientos celulares para una pluralidad de células de una muestra celular para determinar poblaciones diferenciadas basándose en características físicas de las células.

20 Para clasificar células, se usan mediciones de propiedades físicas, tales como volumen, conductividad, y dispersión de luz. Por ejemplo, se usa la tecnología de volumen, conductividad y dispersión (VCS) de Beckman Coulter, entre otras aplicaciones, para clasificar glóbulos blancos en subgrupos o poblaciones. Estas mediciones físicas forman un espacio multidimensional donde las células que comparten propiedades físicas similares se agrupan en conglomerados. Cada conglomerado corresponde a una población de un tipo específico de células sanguíneas.

35 La enumeración de glóbulos blancos (WBC, también denominados leucocitos) es una importante herramienta para detectar condiciones patológicas tales como diversas formas de infección. El diferencial de WBC de 5 partes ha sido durante mucho tiempo una prueba indispensable en la detección de condiciones hematológicas. El diferencial de 5 partes detecta y enumera los cinco subtipos principales de WBC que se encuentran normalmente en la sangre periférica, es decir, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos. Sin embargo, puede haber otros tipos de WBC en fases intermedias del proceso de maduración. Estos WBC que están en fases intermedias del proceso de maduración incluyen blastocitos, linfocitos variantes, y células granuladas tempranas (EGC), que también son indicadores de trastornos hematológicos. El término EGC se refiere a un subconjunto de células mieloides inmaduras compuesto principalmente de promielocitos, mielocitos, y metamielocitos. Otras células en fases intermedias de maduración, tales como, blastocitos y cayados generalmente no están incluidas en la población EGC.

45 La elevada presencia de EGC en la sangre periférica puede indicar la activación potenciada de médula ósea. El recuento de EGC, por ejemplo, puede ser indicativo de sepsis, que es una forma grave de infección bacteriana. En general, se produce un aumento en EGC circulantes durante una infección bacteriana. La presencia de EGC indica producción aumentada de células mieloides debida a infección o enfermedad inflamatoria grave. También pueden encontrarse EGC en pacientes con leucemia, síndrome mielodisplásico, y mielofibrosis. Por tanto, puede ser altamente deseable la enumeración rápida y exacta de las EGC en una muestra de sangre de un paciente para el tratamiento oportuno de infecciones agudas, sepsis, y otras condiciones. Potenciar la prueba diferencial de WBC de 5 partes de rutina añadiendo un recuento de EGC puede ofrecer capacidades de diagnóstico sustancialmente aumentadas.

55 En métodos convencionales de análisis, la presencia de EGC se asocia con cambios en la forma de una población de acontecimiento celular en un histograma o diagrama de dispersión bidimensional. Basándose en la forma de una o más poblaciones celulares, los analizadores de partículas convencionales pueden alertar al usuario final de la presencia de células inmaduras o atípicas.

60 La enumeración de EGC se realiza de manera convencional mediante de análisis manual de frotis de sangre. Este proceso es laborioso y es altamente propenso a error debido a diversos factores tales como el bajo número de células contabilizadas y la subjetividad humana.

65 Otro método convencional de enumeración de EGC se basa en fluorescencia. Los WBC se tiñen con un tinte de polimetina que tiñe el ARN y ADN de cada célula. Entonces pueden identificarse EGC al margen de los granulocitos maduros basándose en la mayor fluorescencia debido al mayor contenido de ARN y ADN en las EGC. Sin embargo, la tecnología a base de fluorescencia puede ser cara y puede no ser adecuada para analizadores de relativamente

bajo coste. Por tanto, existe la necesidad de poder determinar EGC mediante un método e instrumento no fluorescentes.

Todavía además, se ha dado a conocer otro método que mide granulocitos inmaduros a base de sólo CC. Sin embargo, la exactitud de esta medición puede verse comprometida en casos en los que los volúmenes de la subpoblación de neutrófilos, subpoblación de granulocitos inmaduros y cayados se solapan.

Aun otro método convencional de enumeración de EGC implica análisis por citometría de flujo que usa uno o más anticuerpos, tales como, por ejemplo, el anticuerpo contra CD16. Usando este método pueden identificarse EGC basándose en la ausencia de tinción de CD16 en células EGC. Sin embargo, el método implica el uso de múltiples anticuerpos para seleccionar secuencialmente diferentes tipos de células. Por tanto, los métodos de citometría de flujo que usan anticuerpos para identificar EGC pueden tener un coste prohibitivo y pueden provocar cambios en las características físicas de las células debido al uso de uno o más anticuerpos. Se ha descrito la separación de células madre hematopoyéticas pluripotentes (PHSC) de médula ósea de rata mediante dispersión relativa de ángulo bajo e intensidad de fluorescencia relativa para el antígeno Thy-1 (Goldschneider *et al.*, J Exp Med. 1 de agosto de 1980;152(2):419-37). Se ha usado un control de referencia hematológico que comprende células sanguíneas no de humanos, procesadas, para simular granulocitos inmaduros humanos y un medio de suspensión adecuado para el envío del componente a un analizador de sangre para analizar glóbulos blancos y granulocitos inmaduros usando una medición de impedancia de CC (documento US2005/255447).

Por consiguiente, permanece la necesidad de métodos y sistemas eficaces para identificar y enumerar EGC en muestras de sangre.

Breve resumen

Se dan a conocer métodos y sistemas para identificar y enumerar automáticamente células granuladas tempranas (EGC) en muestras de sangre analizadas en un analizador de partículas. La invención proporciona un método para identificar EGC que comprende promielocitos, mielocitos y metamielocitos en una muestra de sangre incluye analizar glóbulos blancos de la muestra de sangre usando un parámetro de dispersión de luz de ángulo bajo (LALS), separar las EGC de los otros glóbulos blancos usando el parámetro de LALS, y enumerar las EGC separadas, en el que la separación de EGC de los otros glóbulos blancos se basa adicionalmente en opacidad (OP).

En el presente documento se describe un aparato para identificar EGC en una muestra de sangre. El aparato incluye un procesador, al menos una memoria asociada al procesador, y un módulo para determinar EGC. La memoria está configurada para almacenar datos de acontecimientos celulares de un analizador de partículas, incluyendo los datos de acontecimientos celulares un parámetro de LALS. El módulo para determinar EGC está configurado para analizar glóbulos blancos de la muestra de sangre usando el parámetro de LALS, y para diferenciar y/o separar una población de EGC de otros glóbulos blancos basándose en el parámetro de LALS.

Características y ventajas adicionales de la presente memoria descriptiva, así como la estructura y funcionamiento de diversas realizaciones de la misma, se describen con detalle a continuación con referencia a los dibujos adjuntos. Cabe señalar que la memoria descriptiva no se limita a las realizaciones específicas descritas en el presente documento. Dichas realizaciones se presentan en el presente documento sólo con fines ilustrativos. Realizaciones adicionales resultarán evidentes para los expertos en la/s técnica(s) relevante(s) basándose en las enseñanzas contenidas en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un sistema descrito en la presente memoria descriptiva.

Las figuras 2a y 2b ilustran diagramas de dispersión de análisis diferencial de WBC basado en volumen y dispersión de luz. La figura 2a ilustra una muestra normal. La figura 2b ilustra una muestra con EGC.

Las figuras 3a y 3b ilustran el solapamiento de poblaciones de neutrófilos y EGC. La figura 3a ilustra un diagrama de dispersión basado en volumen y dispersión de luz de ángulo medio girado. La figura 3b ilustra un diagrama de dispersión basado en volumen y conductividad.

Las figuras 4a, 4b y 4c ilustran el uso de LALS para detectar la población de EGC tal como se describe en la presente memoria descriptiva. La figura 4a ilustra un diagrama de dispersión con conductividad y LALS. La figura 4b ilustra un diagrama de dispersión con conductividad y una medición derivada que incluye LALS. La figura 4c ilustra un diagrama de dispersión con una primera medición derivada que incluye LALS y una segunda medición derivada que incluye opacidad (OP).

La figura 5 ilustra una población celular en un diagrama de dispersión de CC frente a MALS.

La figura 6 ilustra la misma muestra celular de la figura 5 en un diagrama de dispersión con mediciones derivadas tal

como se describe en la presente memoria descriptiva.

La figura 7 ilustra un método de detección y enumeración de EGC según una realización de la presente memoria descriptiva.

La figura 8 ilustra un método de identificación de una población de EGC según una realización de la presente memoria descriptiva.

La figura 9 muestra un analizador de acontecimientos celulares y un sistema correspondiente tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

Las características y ventajas de la presente memoria descriptiva se harán más evidentes a partir de la descripción detallada explicada a continuación cuando se toma junto con los dibujos. En los dibujos, números de referencia similares generalmente indican elementos idénticos, funcionalmente similares y/o estructuralmente similares. Generalmente, el dibujo en el que un elemento aparece primero se indica mediante el/los dígito(s) más a la izquierda en el correspondiente número de referencia.

Descripción detallada

La presente memoria descriptiva se refiere al procesamiento y análisis de datos de acontecimientos celulares generados por un analizador de partículas. Aunque la presente memoria descriptiva se describe en el presente documento con referencia a realizaciones ilustrativas para aplicaciones particulares, debe entenderse que la memoria descriptiva no se limita a ello. Los expertos en la técnica con acceso a las enseñanzas en el presente documento reconocerán modificaciones, aplicaciones y realizaciones adicionales dentro del alcance definido por las reivindicaciones adjuntas y campos adicionales en los que la memoria descriptiva sería de utilidad significativa.

Visión general

Tal como se describió anteriormente, la detección y enumeración de células granuladas tempranas (EGC) es de gran valor de diagnóstico para detectar un intervalo de condiciones hematológicas. Los métodos y sistemas dados a conocer en el presente documento permiten la identificación y enumeración de EGC en muestras celulares analizando datos de acontecimientos celulares generados por un analizador de partículas. La presente memoria descriptiva proporciona un enfoque superior a las técnicas existentes en que la presente memoria descriptiva no requiere ningún colorante, tinte, o anticuerpo especiales o caros para separar las EGC de la población de neutrófilos que generalmente se solapa.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “parámetro” y “medición” se usan generalmente de manera intercambiable. Con respecto a la presente memoria descriptiva, un láser emite un haz de energía que se refleja o se desvía de una partícula, es decir, una célula, y esa energía se mide como parámetro mediante uno o más detectores. Por tanto, generalmente se considera que la energía es un parámetro medido. Determinados parámetros no se miden directamente, sino que más bien se calculan. A modo de ejemplo específico, la opacidad (OP) y RMALS son parámetros calculados a partir de la CC y RF medidas para parámetro de opacidad, y MALS y CC para el parámetro de RMALS.

Realizaciones de la presente memoria descriptiva utilizan mediciones de dispersión de luz de ángulo bajo (LALS) para detectar y enumerar automáticamente poblaciones de EGC en muestras de sangre. Además, la enumeración de EGC según realizaciones de la presente memoria descriptiva no requiere repetir la prueba de la muestra en el detector de partículas. La información de EGC enumerada puede o bien incorporarse como parte de la prueba diferencial de 5 partes para glóbulos blancos, o bien presentarse por separado.

Los entornos a modo de ejemplo en los que puede ponerse en práctica esta memoria descriptiva incluyen analizadores de partículas tales como citómetros de flujo y analizadores para hematología. El analizador para hematología DxH 800™, por ejemplo, usa una variación de la tecnología volumen, conductividad, y dispersión (VCS) propiedad de Coulter para consultar datos de células dentro de una región de medición de un analizador de partículas. VCS usa al menos tres fuentes de energía independientes que funcionan coordinadas entre sí para consultar datos de células: una fuente de energía de corriente continua (CC) de baja frecuencia para medir volumen; una fuente de energía de alta frecuencia para medir conductividad (OP), y una o más fuentes de luz láser para medir dispersión. La medición de volumen se realiza usando el principio de Coulter de impedancia eléctrica para medir físicamente el volumen que desplaza toda la célula en un diluyente isotónico. Este método clasifica de manera exacta todos los tipos de célula independientemente de su orientación en la trayectoria de la luz. Corriente alterna en el intervalo de frecuencias de radio (RF) provoca un cortocircuito en la capa lipídica bipolar de una membrana celular, permitiendo que la energía penetre en la célula. Esta fuente de energía se usa para recoger información sobre tamaño y estructura interna de célula, incluyendo composición química y volumen nuclear. Una o más fuentes de energía láser y sensores o detectores de dispersión de luz de ángulos múltiples proporcionan información sobre la estructura interna, granularidad, y morfología de superficie de la célula. Las mediciones de dispersión de luz pueden incluir dispersión de luz de ángulo medio superior (UMALS) medida, por ejemplo, en un intervalo de entre

20-65 grados desde el eje, dispersión de luz de ángulo medio inferior (LMALS) medida, por ejemplo, en un intervalo de entre 10-20 grados desde el eje. La combinación de UMALS y LMALS se denomina comúnmente MALS, pero UMALS y LMALS constituyen mediciones de dispersión de luz independientes que usan detectores de luz contiguos.

5 Además, los instrumentos VCS usan la medición de CC de volumen altamente exacta, para obtener otras mediciones que se ajusten para tamaño de célula a partir de conductividad y dispersión. La patente estadounidense n.º 5.616.501 (de Rodríguez *et al.*) contiene una descripción detallada del analizador de partículas y el uso de tecnología VCS.

10 Además de las mediciones anteriores, el analizador para hematología DxH 800™ también incluye una medición de LALS y una medición de pérdida de luz axial (ALL o AL2). LALS se mide, por ejemplo, en un intervalo entre 0-10 grados desde el eje. ALL se mide como la pérdida de luz a lo largo del eje, por ejemplo, a 0-1,0 grados desde el eje. Un experto en la técnica entendería, sin embargo, que los ángulos de dispersión de luz a modo de ejemplo correspondientes a UMALS, LMALS, LALS, y ALL son relativos entre sí, y pueden cambiar debido a factores tales como características individuales del detector de partículas y reactivos u otros materiales mezclados con las muestras celulares. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que las enseñanzas en esta divulgación no se limitan a dispositivos que usan tecnología VCS o sus variantes.

La figura 1 ilustra un analizador 100 de partículas. La figura 1 es sólo con fines ilustrativos, y debe entenderse que los analizadores de partículas pueden incluir más o menos módulos, módulos diferentes, y diseños diferentes que los mostrados en la figura 1. El analizador 100 de partículas incluye un detector 124 de partículas y un analizador 122. El detector 124 de partículas incluye un dosificador 102 de muestras de partículas y un dosificador 104 de fluido de arrastre. El dosificador 102 de muestras incluye una muestra de partículas preparada según los requisitos de una prueba o análisis deseados. Por ejemplo, puede diluirse una muestra de sangre con un diluyente hasta un grado predeterminado de concentración celular. El tipo de diluyente y el grado de dilución difieren según la prueba que se esté ejecutando – el análisis de glóbulos blancos (WBC) requiere menos dilución que los glóbulos rojos (RBC) porque el número de WBC en una muestra es bajo comparado con RBC. Un dosificador 104 de fluido de arrastre alberga un fluido de arrastre tal como, por ejemplo, solución salina. El fluido de arrastre permite el fluido suave de la muestra de partícula en el detector de partículas. La muestra de partículas del dosificador 102 de muestras de partículas y el fluido de arrastre del dosificador 104 de fluido de arrastre se inyectan a una velocidad constante predeterminada. El dosificador 106 de disolución canaliza la muestra de partículas y fluido de arrastre a una celda 108 de flujo. La celda 108 de flujo es, en general, un tubo de un diámetro pequeño diseñado para que pase a su través una única partícula. La disolución en el dosificador 106 de disolución se inyecta en una celda 108 de flujo a una velocidad constante a través de enfoque hidrodinámico. El enfoque hidrodinámico inyecta la disolución a una velocidad constante y con presión suficiente que, en general, las partículas aparecen en fila única a intervalos constantes dentro de la celda 108 de flujo. Debe tenerse en cuenta que algunos detectores de partículas pueden tener una zona de medición sin una celda de flujo.

Se coloca un dispositivo 110 sensor dentro del detector 124 de partículas de modo que pueda emplearse uno o más medios sensores para detectar partículas que fluyen a través de la región 120 de medición. Las fuentes 112 de energía y sensores 114 asociados se colocan dentro del dispositivo 110 sensor de manera sustancialmente transversal a la celda 108 de flujo. Las fuentes 112 de energía y sensores 114 emplean uno o más de medios sensores eléctricos u ópticos para detectar partículas en la región 120 de medición. Por ejemplo, un conjunto de fuentes 112 de energía y sensores 114 asociados pueden emplear una medición de luz para medir las características de dispersión de luz y pérdida de luz de una célula que pasa a través de la región 120 de medición. Las mediciones de dispersión de luz pueden incluir UMALS, LMALS y LALS. La pérdida de luz se mide como la pérdida de luz axial (ALL o AL2), es decir, la pérdida de luz a lo largo del eje, por ejemplo, a 0-1,0 grados desde el eje. Otros conjuntos de fuentes 112 de energía y sensores 114 pueden emplear una medición de CC para medir el volumen (V) de una célula, y una medición de RF para medir las características de conductividad (OP) de una célula. Las fuentes 112 de energía y sensores 114 también pueden incluir otros medios, tales como, por ejemplo, un medio acústico donde se usan ultrasonidos para detectar diversas características de una célula en la región 120 de medición.

Los sensores 114 están conectados a un procesador 118 de señales. Los sensores 114 convierten mediciones eléctricas u ópticas detectadas a los correspondientes pulsos de señal eléctrica que se procesan en el procesador 118 de señales. Para cada partícula que pasa a través de la región 120 de medición, se recogen pulsos de señal eléctrica correspondientes a una secuencia de mediciones, por ejemplo, en el procesador 118 de señales. A partir de estos pulsos de señal eléctrica se forma una señal que es ilustrativa de las mediciones captadas para un parámetro de medición mientras una partícula está fluyendo a través de la región de medición. La entrada al procesador 118 de señales puede ser señal analógica o digital. Pueden usarse uno o más convertidores analógico-digitales (ADC) para convertir las señales analógicas a digitales antes de, durante, o después del procesamiento en el procesador 118 de señales. La duración cubierta por la señal puede comenzar tras la entrada de la partícula en la región de medición hasta su salida de la región de medición. En ejemplos de la presente memoria descriptiva, el procesador 118 de señal puede realizar procesamiento adicional de cada señal para derivar uno o más parámetros de medición que describen la partícula que se detectó.

La detección de una partícula dentro de la región 120 de medición se denomina un acontecimiento o acontecimiento celular. El procesador 118 de señales analiza la señal derivada correspondiente a cada partícula detectada que fluye a través de la región 120 de medición para determinar un acontecimiento correspondiente. Entonces, los acontecimientos detectados se transmiten al analizador 122. El analizador 122 está conectado al procesador 118 de señales para recibir datos de acontecimientos. El analizador 122 puede colocarse en un ordenador conectado al detector de partículas. Debe tenerse en cuenta que el analizador 122 puede colocarse o bien incorporado al analizador 100 de partículas que comprende el detector 124 de partículas, o bien por separado uniéndose al analizador 100 de partículas a través de una infraestructura de comunicación.

La generación de señales y detección de acontecimientos se realizan por separado para cada medición eléctrica u óptica activa por separado. El analizador 122 puede recibir datos de acontecimientos correspondientes a cada medición activa. Entonces, el analizador 122 puede analizar los datos de acontecimientos recibidos para determinar uno o más recuentos, poblaciones celulares, u otra característica correspondiente a la célula. En ejemplos de la presente memoria descriptiva, el analizador 122 puede producir la presentación visual de diagramas de dispersión, histogramas, u otras ilustraciones gráficas y/o textuales de los acontecimientos recibidos. Los diagramas de dispersión, histogramas, y/u otras ilustraciones gráficas pueden ser multidimensionales.

“Sensibilidad” y “especificidad” son medidas estadísticas del rendimiento de una prueba de clasificación binaria. La sensibilidad mide la proporción de positivos reales que se identifican correctamente. La especificidad mide la proporción de negativos que se identifican correctamente. Una especificidad del 100% significa que la prueba reconoce todos los negativos reales. Una sensibilidad del 100% significa que la prueba reconoce todos los positivos reales. Por tanto, a diferencia de una prueba de alta especificidad, los resultados negativos en una prueba de alta sensibilidad se usan para descartar la enfermedad. Un resultado positivo en una prueba de alta especificidad puede confirmar la presencia de enfermedad. Sin embargo, la especificidad sola no indica suficientemente la exactitud de la prueba para reconocer casos positivos. También se requiere la información de la sensibilidad. Para cualquier prueba, habitualmente hay concesión mutua entre estas mediciones. Por ejemplo, en un ensayo de diagnóstico en el que uno está sometiendo a prueba personas para determinar si tienen una determinada afección, el ensayo puede estar ajustado para pasar por alto un determinado porcentaje de personas enfermas que están correctamente identificadas como que tiene la afección (baja especificidad), con el fin de reducir el riesgo de perder el porcentaje de personas sanas que están correctamente identificadas como que no tienen la afección (alta sensibilidad). Esta concesión mutua puede representarse gráficamente usando una curva característica de funcionamiento del receptor (ROC).

La “exactitud” de un sistema de medición es el grado de cercanía de mediciones de una cantidad a su valor real (verdadero).

En un ejemplo, la memoria descriptiva da a conocer un método para enumerar EGC con al menos aproximadamente el 80% de exactitud, y más particularmente con al menos aproximadamente el 85% de exactitud. En otros ejemplos, la memoria descriptiva da a conocer un método para enumerar EGC con al menos aproximadamente el 90% de exactitud.

En otro ejemplo, la memoria descriptiva da a conocer un método para enumerar EGC con al menos aproximadamente el 85% de sensibilidad, más particularmente con al menos aproximadamente el 90% de sensibilidad, e incluso más particularmente con al menos aproximadamente el 95% de sensibilidad. En todavía otro ejemplo, la memoria descriptiva da a conocer un método para enumerar EGC con al menos aproximadamente el 80% de especificidad, y más particularmente con al menos aproximadamente el 85% de especificidad. En otros ejemplos, la memoria descriptiva da a conocer un método para enumerar EGC con al menos aproximadamente el 90% de especificidad.

Uso de LALS para identificar y enumerar EGC

Los inventores observaron que las EGC pueden diferenciarse de otros tipos de células, que incluyen específicamente neutrófilos, en base a sus aspectos únicos de granularidad, lobularidad nuclear, y/o estructura de superficie celular. Los inventores descubrieron que estos aspectos únicos pueden medirse y usarse como base para identificar la población de EGC. En una realización específica, pueden usarse LALS para discernir el grado de granularidad celular, lobularidad nuclear, y/o estructura de superficie celular. Específicamente, los presentes inventores han descubierto que el parámetro de LALS es altamente sensible a cambios sutiles en granularidad, lobularidad y/o características de superficie de EGC comparado con WBC maduros. Sin embargo, también se entiende que LALS puede combinarse con otros parámetros para la especificidad y sensibilidad en enumeración de EGC. Más particularmente, un ejemplo de la presente memoria descriptiva incluye un método y instrumento no fluorescentes que mide EGC usando LALS y al menos una medición del grupo de dispersión de luz frontal, dispersión lateral, pérdida de luz axial, CC, RF y opacidad. Todavía adicionalmente, la luz de dispersión frontal se selecciona de UMALS, LMALS, MALS.

Las figuras 2a y 2b ilustran un diagrama de dispersión diferencial de WBC de una muestra de sangre normal (la figura 2a) y una muestra de sangre que contiene EGC (la figura 2b). Las poblaciones 202a y 202b representan las

poblaciones de neutrófilos de la muestra normal y de la muestra que contiene EGC, respectivamente. La forma de las poblaciones 202b es alargada a lo largo del eje de volumen cuando se compara con la forma de la población 202a. Las poblaciones 201a y 201b representan monocitos, las poblaciones 203a y 203b representan linfocitos, la población 204 representa eosinófilos, y la población 205 representa RBC sin lisar. Muchos métodos convencionales identifican la presencia de EGC basándose en la elongación de la forma de la población de neutrófilos, tal como la mostrada en la figura 2b. Las figuras 19 y 20 de la patente estadounidense n.º 5.125.737 (de Rodríguez *et al.*), por ejemplo, ilustran la elongación de la forma de la población de neutrófilos a lo largo del eje de volumen o CC en diagramas de dispersión que mapean respectivamente CC frente a OP y CC frente a RMALS. RMALS es dispersión de luz de ángulo medio girado, normalmente se calcula como $\log(\text{UMALS} + \text{LMALS})/\text{CC}$.

Las figuras 3a y 3b ilustran, respectivamente, diagramas de dispersión de CC frente a RMALS y CC frente a OP de otra muestra de sangre. La muestra de sangre ilustrada en las figuras 3a y 3b incluye una referencia manual del 62,25% de neutrófilos segmentados, 12,75% de cayados, 3% de metamielocitos y 0,75% de mielocitos. En ambos diagramas de dispersión, tal como se observa en los conglomerados 302 y 303, no puede identificarse la población de EGC por separado de la población de neutrófilos. Por tanto, aunque la elongación de la forma de la población de neutrófilos puede usarse como indicador respecto a la presencia de EGC en la muestra de sangre, los diagramas de dispersión basándose en CC, RMALS y OP, tal como se usan de manera convencional, no identifican por separado una población de EGC ni/o no enumeran las EGC.

La figura 4a es una ilustración de un diagrama de dispersión que mapea OP frente a LALS según una realización de la presente memoria descriptiva. El conglomerado 402 ilustra en un diagrama de dispersión de OP frente a LALS, los mismos acontecimientos celulares mostrados en las figuras 3a y 3b. La elongación de la forma de la población 402 a lo largo del eje de LALS permite señalar a la muestra para la presencia de EGC.

Realizaciones de la presente memoria descriptiva usan LALS para identificar poblaciones de EGC. A continuación se describen ejemplos en los que LALS se combina con otros parámetros, tales como MALS, ALL, OP y/o CC, para identificar y enumerar poblaciones de EGC. LALS puede combinarse con otros parámetros y/o parámetros derivados que incluyen derivados de LALS para identificar la población de EGC. Se entiende que LALS puede usarse según otras combinaciones de parámetros o parámetros derivados diversos para identificar y enumerar EGC basándose en las enseñanzas en esta divulgación. La presente memoria descriptiva, sin embargo tal como se mencionó previamente, no se limita solamente al uso de LALS para identificar y enumerar EGC porque el parámetro de LALS es solo una manera de detectar la granularidad, lobularidad, y/o características de superficie celular de EGC. Estas características celulares son las que permitieron a los presentes inventores discernir las EGC de sus poblaciones de neutrófilos que se solapan estrechamente.

Combinar LALS con MALS para identificar y enumerar EGC

Según otro ejemplo de la presente memoria descriptiva, puede usarse LALS con uno o más de MALS y CC y RF para identificar y enumerar EGC. Según un ejemplo, el LALS se usa con MALS y CC. Según la invención, puede usarse OP para diferenciar más claramente la población de EGC de otras poblaciones celulares tales como neutrófilos. Un ejemplo todavía adicional usa LALS, MALS, OP y CC en la construcción de parámetros derivados para diferenciar las EGC.

Se entiende que las funciones derivadas son vías conocidas para potenciar diferencias sutiles en poblaciones estrechamente relacionadas. La selección de una función derivada y las variables acompañantes o parámetros adicionales está dentro del nivel de destreza de una persona que trabaja en este campo. En las figuras, OP, RLS, F1, F2, P1 y P2 son funciones derivadas.

En un ejemplo, un parámetro derivado que incorpora LALS y CC para diferenciar EGC de neutrófilos basándose en las propiedades distintivas de lobularidad nuclear y estructura de superficie de EGC y neutrófilos. Las EGC tienen LALS más baja comparada con neutrófilos. Además, la medición de CC se utiliza en la medición derivada para aumentar la separación entre EGC y neutrófilos basándose en la característica de que las EGC son habitualmente mayores en tamaño que los neutrófilos. Por ejemplo, la figura 19 de la patente estadounidense n.º 5.125.737 ilustra que las EGC tienen un volumen mayor que los neutrófilos.

Según la invención, una medición derivada puede incorporar OP (que es función de RF y CC) para aumentar la separación de las EGC de los neutrófilos. Las EGC tienen OP menor comparado con los neutrófilos.

En determinados ejemplos, el parámetro derivado también puede incorporar MALS. La MALS contribuye a aumentar la separación entre EGC y neutrófilos detectando diferencias estructurales sutiles en dispersión de luz de ángulo medio. Sin embargo, tal como se observa en la figura 3a, MALS sola no puede lograr una separación distintiva entre las poblaciones de EGC y de neutrófilos.

Se muestra en las figuras 4b y 4c la muestra celular de la figura 4a cuando se incorporan parámetros derivados para crear diagramas de dispersión. La figura 4b muestra la elongación de la población 402b de neutrófilos a lo largo del eje P1. La figura 4c muestra la diseminación de la población 402c de neutrófilos con relación a el eje P2, cuando se

introduce esa medición derivada. El resultado final de aplicar las realizaciones a modo de ejemplo a una muestra de sangre, tal como se muestra en la figura 4c, puede producir un diagrama de dispersión en el que pueden reconocerse claramente las EGC al margen de los neutrófilos. En la figura 4c, la población 406 de EGC, se distingue suficientemente de la población 404 de neutrófilos y población 408 sin definir. En el diagrama de dispersión ilustrado, la población 406 de EGC representa el 8,8% de la población de WBC, y la población 408 sin definir representa el 7,8% de la población de WBC. La población de EGC parece estar compuesta casi por completo por metamielocitos, mielocitos, y promielocitos. En algunos ejemplos, un pequeño porcentaje de blastocitos mieloides en su transición hacia la fase de promielocitos puede incluirse en la población de EGC. La población sin definir parece comprender los neutrófilos desgranulados, neutrófilos envejecidos y cayados.

Para llegar a los parámetros derivados de las realizaciones dadas a conocer, se entiende que los valores de coeficientes apropiados pueden ser una combinación de coeficientes que producen una separación sustancialmente óptima entre las poblaciones de una muestra celular. La selección de valores de coeficientes puede calcularse de manera dinámica. Por ejemplo, según una realización, los valores de coeficientes pueden volver a calibrarse repetidamente hasta que se cumpla un conjunto predeterminado de umbrales con respecto a la separación entre poblaciones celulares mapeada en un diagrama de dispersión.

Combinar LALS con ALL para identificar EGC

En otro ejemplo de la presente memoria descriptiva puede considerarse LALS junto con la medición de ALL. La magnitud de la ALL de una célula es representativa de sus propiedades de superficie y características de absorción. La patente estadounidense n.º 7.008.792 proporciona una descripción de medición de ALL como parte de un método para enumerar NRBC.

Los inventores observaron que los parámetros de LALS y ALL se mueven en direcciones opuestas para EGC y neutrófilos. Por tanto, según un ejemplo de la presente memoria descriptiva, se crea una medición derivada basándose en LALS y ALL, en particular la diferencia entre LALS y ALL. Considerar la diferencia entre LALS y ALL contribuye a aumentar la separación entre las poblaciones de EGC y neutrófilos.

Los inventores también observaron que, en general, las EGC muestran parámetros de CC mayor y OP menor comparado con neutrófilos. Por tanto, según un ejemplo de la presente memoria descriptiva, se considera que una medición derivada basándose en la diferencia entre OP y CC aumenta la separación de la población de EGC de la población de neutrófilos.

Puede realizarse conversión, rotación, y escalado adicionales sobre los parámetros derivados iniciales con el fin de llegar a un posicionamiento optimizado de las poblaciones de EGC y de neutrófilos.

Además pueden expandirse y escalarse parámetros derivados intermedios para ocupar la zona de presentación visual deseada. La expansión y el escalado contribuyen a aumentar la separación entre las poblaciones de modo que pueda llevarse a cabo de manera exacta la selección y la enumeración automáticas.

Los parámetros derivados pueden usarse para generar histogramas, diagramas de dispersión, y/o otras presentaciones visuales gráficas en las que las poblaciones de EGC y neutrófilos están suficientemente separadas de modo que puede lograrse enumeración automatizada de las respectivas poblaciones.

La figura 5 ilustra una población 502 de neutrófilos que incluye EGC en un diagrama de dispersión convencional de CC frente a MALS. Tal como se ilustra, el diagrama de dispersión convencional de CC frente a MALS no separa suficientemente la población de EGC de la población de neutrófilos.

La figura 6 ilustra la misma muestra celular tal como se muestra en la figura 5, en un diagrama de dispersión que representa gráficamente los parámetros derivados según un ejemplo de la presente memoria descriptiva. En la figura 6, la población 604 de EGC está claramente separada de la población 602 de neutrófilos.

Método para identificar y enumerar EGC usando LALS

La figura 7 ilustra un método 700 para identificar y enumerar EGC en una muestra de sangre según una realización de la presente memoria descriptiva. El método 700 puede implementarse en un detector y analizador de partículas tal como el ilustrado en la figura 1.

En la etapa 702, se prepara una muestra de sangre para su análisis. Por ejemplo, y sin pérdida de la generalidad, en análisis de hematología puede lisarse una muestra de sangre completa para eliminar los glóbulos rojos antes de una prueba diferencial de 5 partes para glóbulos blancos. La etapa de preparación también puede incluir añadir un diluyente a la muestra y opcionalmente un fluido de arrastre para facilitar el flujo de la muestra a través de una región de medición. Entonces, la muestra de partículas preparada se inyecta en una trayectoria que incluye la región de medición a una velocidad sustancialmente constante usando un proceso tal como enfoque hidrodinámico para garantizar presión suficiente para mover las partículas en una fila única a través de la trayectoria.

En la etapa 704, las células de la muestra de sangre se someten a medición en una región de medición del analizador de partículas. Las células en un diluyente, y opcionalmente en un fluido de arrastre, pasan una a una a través de una región de medición. Durante el intervalo de tiempo que una célula está en la región de medición, una pluralidad de fuentes de energía y sensores funcionan para someter la célula a consulta de datos y para recoger las señales generadas mediante las respectivas consultas de datos. Tal como se describió anteriormente, según una realización de la presente memoria descriptiva una pluralidad de fuentes de energía y sensores correspondientes funcionan para recoger señales de medición para una medición de LALS y uno o más de parámetros de CC, OP, MALS y ALL.

En la etapa 706, se generan datos de acontecimientos celulares correspondientes a las señales de medición recogidas. Por ejemplo, los datos de acontecimientos celulares para una célula pueden comprender datos que representan todos los parámetros de esa célula durante el intervalo en el que esa célula pasó a través de la región de medición. Generar datos de acontecimientos celulares puede incluir la generación de señales eléctricas para señales ópticas, RF y otras detectadas en los diversos sensores.

En la etapa 708, se accede a los datos de acontecimientos celulares, por ejemplo, mediante un componente de analizador. Según una realización, algo o todo el procesamiento de las etapas 708-716 puede realizarse de manera en tiempo real o cercana a tiempo real a medida que se miden las células en el detector de partículas. Según otra realización, el procesamiento de las etapas 708-716 puede realizarse sobre datos de medición almacenados que se han generado previamente mediante el detector de partículas.

En la etapa 710, se diferencia una población de EGC de los datos de acontecimientos celulares según una realización de la presente memoria descriptiva. La diferenciación de la población de EGC se describe adicionalmente a continuación con relación a la figura 8.

En la etapa 712, puede notificarse la población de EGC diferenciada. Según una realización, notificar incluye la presentación visual y/o salida impresa de una o más poblaciones celulares en uno o más histogramas, diagramas de dispersión, u otra forma gráfica y/o textual de presentación visual. Según otra realización, notificar incluye escribir los diversos datos de población celular a un medio de almacenamiento legible de ordenador con el fin de que esa información almacenada esté disponible para posterior recuperación y análisis.

En la etapa 714, se enumeran las EGC. Después de que se separa la población de EGC del resto de las poblaciones celulares incluyendo la población de neutrófilos, puede hacerse recuento de las EGC. Hacer recuento de las EGC puede basarse en hacer recuento de acontecimientos celulares individuales que caen dentro de una zona, seleccionar los acontecimientos celulares en una zona, y/o estimular los acontecimientos celulares en una zona.

En la etapa 716, se notifican las EGC enumeradas. Las EGC enumeradas pueden notificarse como un recuento absoluto y/o como porcentaje del recuento total de glóbulos blancos. Las EGC enumeradas también pueden notificarse como porcentaje y/o fracción de cualquier otra población celular, tal como, por ejemplo, neutrófilos. Como en el caso de notificar la población de EGC diferenciada, la notificación puede incluir presentación visual, salida impresa, y/o almacenaje a un medio legible por ordenador.

La figura 8 ilustra un método 800 para diferenciar la población de EGC de otras poblaciones celulares de la muestra celular.

En la etapa 802, se crea una primera medición derivada que comprende LALS. Según una realización, un primer parámetro derivado comprende la medición de LALS y una medición de CC.

En la etapa 804, se crea una segunda medición derivada que comprende OP. Según una realización, un segundo parámetro derivado comprende la medición de OP y una medición de MALS.

En la etapa 806, se realiza agrupamiento de acontecimientos celulares. Según una realización, se crea un diagrama de dispersión que tiene la primera medición como un eje, y la segunda medición como otro eje. El agrupamiento de poblaciones celulares puede realizarse manualmente y/o automáticamente. El agrupamiento puede incluir calibrar iterativamente los coeficientes y/o términos de medición hasta que se separen poblaciones celulares seleccionadas mediante al menos una distancia umbral predeterminada. La etapa de agrupamiento también puede incluir seleccionar una o más poblaciones celulares.

En la etapa 808 la población de EGC se identifica basándose en el agrupamiento realizado en la etapa anterior. El conglomerado de EGC puede diferenciarse del conglomerado de neutrófilos basándose en el primer y segundo parámetros derivados tal como se muestra en la figura 4c.

Según otra realización, pueden crearse el primer y segundo parámetros derivados en las etapas 802 y 804. La primera medición derivada por consiguiente puede incluir parámetros de LALS y MALS. El segundo parámetro

derivado puede incluir parámetros de CC y OP. Según esta realización, el agrupamiento en la etapa 806 puede incluir crear un diagrama de dispersión con un eje basándose en el primer y segundo parámetros derivados.

Otras realizaciones de ejemplo

Otras realizaciones de ejemplo de la presente memoria descriptiva pueden incluir la identificación y/o enumeración de granulocitos inmaduros basándose en LALS y dos o más parámetros. Pueden usarse diagramas de dispersión, histogramas, y/o otros tipos de gráficos en dos o más dimensiones en la diferenciación y enumeración de la población de EGC. Por ejemplo, una realización puede incluir la generación de una imagen de superficie tridimensional basándose en parámetros derivados y otra medición física o derivada, y la población de EGC puede identificarse y enumerarse basándose en las posiciones de los correspondientes acontecimientos celulares en la superficie tridimensional.

La figura 9 ilustra otro ejemplo de la presente memoria descriptiva. Un sistema 900 según un ejemplo de la presente memoria descriptiva, incluye un detector 124 de partículas conectado a un analizador 122. El analizador 122 también puede conectarse a una pantalla 920 y un almacenamiento 921. El detector 124 de partículas detecta acontecimientos de partículas usando uno o más parámetros de medición, e incluye el procesador 118 de señales que procesa los parámetros de medición detectados para construir una señal para cada acontecimiento de partícula que representa la duración de esa partícula en una región de medición. El procesador 118 de señales, tal como se observó anteriormente, genera acontecimientos celulares correspondientes a la medición de células respectivas dentro de la región de medición. El procesador 118 de señales puede realizar procesamiento de las señales recibidas para optimizar la generación de acontecimientos celulares, por ejemplo, reduciendo el ruido en las señales recibidas. Las instrucciones para ensamblar la señal correspondiente a la duración de una partícula en la región de medición y la determinación de los parámetros correspondientes a la señal pueden implementarse en cualquier lenguaje de programación adecuado incluyendo un lenguaje de descripción de hardware (HDL), Assembly, C y C++, y puede incluir uno o más de componentes de hardware, firmware o software.

Tal como se describió anteriormente con respecto a la figura 1, el analizador 122 puede colocarse o bien dentro del analizador 100 de partículas o bien por separado conectado al detector 124 de partículas a través de un medio de comunicaciones. El analizador 122 recibe datos de acontecimientos celulares correspondientes a cada partícula detectada por el detector 124 de partículas. Los datos de acontecimientos pueden incluir, entre otras cosas, parámetros para LALS, OP, CC y MALS.

El analizador 122 incluye componentes que incluyen un procesador 902, un dispositivo 903 de memoria, un dispositivo 904 de almacenamiento, un dispositivo 905 de entrada, un dispositivo 906 de salida, un módulo 907 para determinar EGC y una infraestructura 908 de comunicaciones. El procesador 902 puede ser cualquier microprocesador u otro procesador capaz de ejecutar instrucciones de procesamiento. El dispositivo 903 de memoria puede incluir una memoria de acceso aleatoria. El dispositivo 904 de almacenamiento incluye un medio de almacenamiento persistente legible por ordenador tal como una memoria flash o un disco duro. El procesador 902 ejecuta las instrucciones para recibir datos de acontecimientos del analizador de partículas, procesar los datos recibidos e emitir los datos de resultados procesados. El dispositivo 903 de memoria y el dispositivo 904 de almacenamiento proporcionan cualquier requisito de almacenamiento y de memoria temporal y permanente del procesador 902. La infraestructura 908 de comunicación interconecta los componentes del analizador 122 entre sí, y puede incluir un medio de comunicaciones, que incluye pero no se limita a un bus de interconexión de componentes periféricos (PCI), bus de arquitectura estándar industrial extendida (EISA), Ethernet y/o WIFI. El dispositivo 905 de entrada puede incluir conectividad al analizador 100 de partículas a través de la infraestructura 908 de comunicación y la capacidad de recibir datos incluyendo datos de acontecimientos del analizador 100 de partículas.

El módulo 907 para determinar EGC incluye la funcionalidad para procesar el detector 124 de partículas de datos de acontecimientos celulares para identificar y enumerar poblaciones de EGC en la muestra de sangre. Por ejemplo, el módulo 907 para determinar EGC puede incluir las instrucciones o un programa informático para implementar las etapas 708-716 del método 700. El módulo 907 para determinar EGC puede comprender un módulo 942 de acceso a datos y un módulo 944 diferenciador de EGC, y un módulo 946 notificador de EGC. El módulo 942 de acceso a datos puede acceder a los datos de acontecimientos celulares recibidos del detector de partículas. Acceder a los datos puede implicar acceder a un dispositivo de almacenamiento para recuperar datos de acontecimientos celulares almacenados previamente, o recibir datos de acontecimientos celulares en tiempo real de un detector de partículas. El módulo 944 diferenciador de EGC puede incluir la funcionalidad para identificar y enumerar la población de EGC, por ejemplo, tal como se describió anteriormente con relación a las etapas 710 y 714 del método 700. El módulo notificador de EGC puede incluir la funcionalidad para notificar la información de EGC, por ejemplo, tal como se describió anteriormente con relación a las etapas 712 y 716 del método 700.

El módulo 907 para determinar EGC puede implementarse en cualquier lenguaje de programación adecuado incluyendo un lenguaje de descripción de hardware (HDL), Assembly, C y C++, y puede incluir uno o más de componentes de hardware, firmware o software. Las instrucciones y/o el programa informático que implementa el módulo 907 para determinar EGC pueden almacenarse, por ejemplo, en el medio 904 de almacenamiento legible por ordenador.

El módulo 906 de salida incluye la funcionalidad para manipular la información de población celular incluyendo la información de población de EGC determinada en el módulo 907 para determinar EGC de manera apropiada para la aplicación. En un ejemplo, el módulo 906 de salida puede generar uno o más gráficos según ajustes de gráfico configurados previamente para presentar visualmente las poblaciones celulares diferenciadas determinadas en módulos de procesamiento incluyendo el módulo 907 para determinar EGC.

El módulo 906 de salida está conectado usando una infraestructura 908 de comunicaciones a la pantalla 920 y/o el dispositivo 921 de almacenamiento. Los datos de resultados del módulo 906 de salida se transmiten a la pantalla 920 para su presentación visual y para su análisis por parte de un operador. Por ejemplo, la pantalla 920 puede ilustrar los datos de resultados en forma de un histograma, diagrama de dispersión u otra forma de presentación visual gráfica y/o textual. En otro ejemplo, los datos de resultados pueden almacenarse en un dispositivo 921 de almacenamiento externo para su posterior procesamiento y análisis.

En esta divulgación, se dieron a conocer métodos y sistemas que pueden mejorar el valor de diagnóstico de la enumeración automatizada de células sanguíneas. En particular, realizaciones de la presente memoria descriptiva permiten la identificación y enumeración automatizadas de EGC en muestra de células sanguíneas que pueden ser críticas para la detección y tratamiento de diversas condiciones de infección. Los métodos y sistemas dados a conocer producen mejoras sustanciales en la rentabilidad y eficiencia con respecto a los métodos y sistemas actuales y pueden conducir a mejoras significativas en el análisis de datos de analizadores de partículas.

La descripción anterior de la memoria descriptiva se ha presentado con fines de ilustración y descripción. No pretende ser exhaustiva o limitar la memoria descriptiva a la forma precisa dada a conocer, y pueden ser posibles otras modificaciones y variaciones a la luz de las enseñanzas anteriores. La realización se eligió y describió con el fin de explicar lo mejor posible los principios de la memoria descriptiva y su aplicación práctica para así permitir a otros expertos en la técnica a utilizar lo mejor posible la memoria descriptiva en diversas realizaciones y diversas modificaciones tal como sean aptos para el uso particular contemplado.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos no limitativos se proporcionan sólo con fines ilustrativos con el fin de facilitar una comprensión más completa de realizaciones representativas ahora contempladas. No debe interpretarse que estos ejemplos limiten cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria descriptiva, incluyendo las que pertenecen a los métodos, sistemas y/o aparatos para identificar y/o enumerar células de granulocitos tempranos.

Ejemplo 1

A continuación en la tabla 1 se muestra una evaluación de la enumeración de EGC frente a un diferencial manual de referencia de 400 células sobre un conjunto de 1536 muestras únicas recogidas en siete sitios diferentes. El coeficiente de correlación r se determinó comparando el % de EGC frente a la suma del % de promielocitos, el % de mielocitos y el % de metamielocitos. El criterio positivo usado para el cálculo del área bajo la curva ROC fue que la suma del % de promielocitos, el % de mielocitos y el % de metamielocitos fuese mayor del o igual al 1%.

Tabla 1: Análisis estadístico de EGC respecto a diferencial manual de referencia						
Muestras	Muestras que cumplen criterios positivos	Coeficiente de correlación (r)	Área bajo la curva ROC	Sensibilidad	Especificidad	Criterios para sensibilidad y especificidad
1536	502	0,87	0,89	84,5	80,8	> 0,52

En el ejemplo anterior, 502 de las 1536 muestras se registraron por técnicos de hematología entrenados como que contenían EGC. Entonces se analizaron las mismas muestras usando el instrumento DxH800 programado con el protocolo de detección de EGC de la presente memoria descriptiva. El coeficiente de correlación (r) se determinó en función del número de muestras registradas por el instrumento como que contenían EGC con relación al número de muestras registradas por los técnicos entrenados.

La sensibilidad es la razón de EGC positivas verdaderas con respecto a EGC positivas verdaderas y recuentos de falsos negativos. La especificidad, por otro lado, es la razón de EGC negativas verdaderas con respecto a EGC negativas verdaderas y recuentos de falsos positivos. El área bajo la curva ROC (curva de funcionamiento del receptor) es una medida de la exactitud del enfoque analítico combinando la sensibilidad y la especificidad del método de enumeración de EGC. El criterio para la sensibilidad y especificidad enumeradas refleja la escala variable de valores cambiando sensibilidad por especificidad y viceversa. Por tanto, por ejemplo, un criterio de 1,0 sería donde se ha aumentado la especificidad a costa de un descenso en sensibilidad. Se entiende que un experto en la técnica puede llegar al valor óptimo.

Una evaluación similar sobre un conjunto de 315 muestras recogidas usando marcador CD16 de citometría de flujo

como referencia sobre dos sitios diferentes proporcionó los resultados que se muestran en la tabla 2. CD16 es un marcador asociado con neutrófilos, pero no con EGC. Por tanto, pueden usarse anticuerpos anti-CD16 marcados para seleccionar neutrófilos y separarlos de la población de EGC, que generalmente aparece en una región que se solapa estrechamente de un diagrama de dispersión para la población de neutrófilos. Las células menos maduras tienen menos dispersión de luz que las células maduras. Por tanto, usando una combinación de anticuerpos anti-CD16 y dispersión de luz, pueden seleccionarse poblaciones de EGC. Usando este método, se examinaron 315 muestras y se identificaron 164 de las muestras como que contenían EGC. Cuando se comparó el enfoque de análisis de selección de CD16 con el método analítico de la presente memoria descriptiva, la presente memoria descriptiva proporcionó los resultados expuestos en la tabla 2.

Tabla 2: Análisis estadístico de EGC respecto a CD16 de citometría de flujo						
Muestras	Muestras que cumplen criterios positivos	Coeficiente de correlación (r)	Área bajo la curva ROC	Sensibilidad	Especificidad	Criterios para sensibilidad y especificidad
315	164	0,90	0,90	82,3	80,8	>0,50

Por tanto, el presente método también ha demostrado que la presencia de células con mayores o menores niveles de inmadurez, tal como blastos o neutrófilos juveniles (es decir, cayados), no tiene impacto significativo sobre la exactitud.

El anterior análisis de datos de las muestras recogidas demuestra que la presente memoria descriptiva tiene altos niveles de correlación, sensibilidad y especificidad en comparación con la inspección diferencial manual de las muestras.

REIVINDICACIONES

1. Método no fluorescente para enumerar células de granulocitos tempranos (EGC) que comprenden promielocitos, mielocitos y metamielocitos en una muestra de sangre, en el que el método comprende:
5 analizar glóbulos blancos de la muestra de sangre usando un parámetro de dispersión de luz de ángulo bajo (LALS);
 separar las EGC de otros glóbulos blancos usando el parámetro de LALS; y
10 enumerar las EGC separadas, en el que la separación de EGC de los otros glóbulos blancos se basa además en la opacidad (OP).
2. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa de separación comprende:
15 agrupar los datos de análisis para generar de ese modo una pluralidad de poblaciones; e identificar la población de EGC de la pluralidad de poblaciones.
3. Método según la reivindicación 2, en el que la población de EGC está separada sustancialmente de una población de neutrófilos de la pluralidad de poblaciones.
- 20 4. Método según las reivindicaciones 1-3, que comprende además:
 enumerar las EGC basándose en la población separada de EGC; y
 notificar las EGC enumeradas.
- 25 5. Método según la reivindicación 4, en el que las EGC enumeradas se notifican como un porcentaje de un número total de glóbulos blancos.

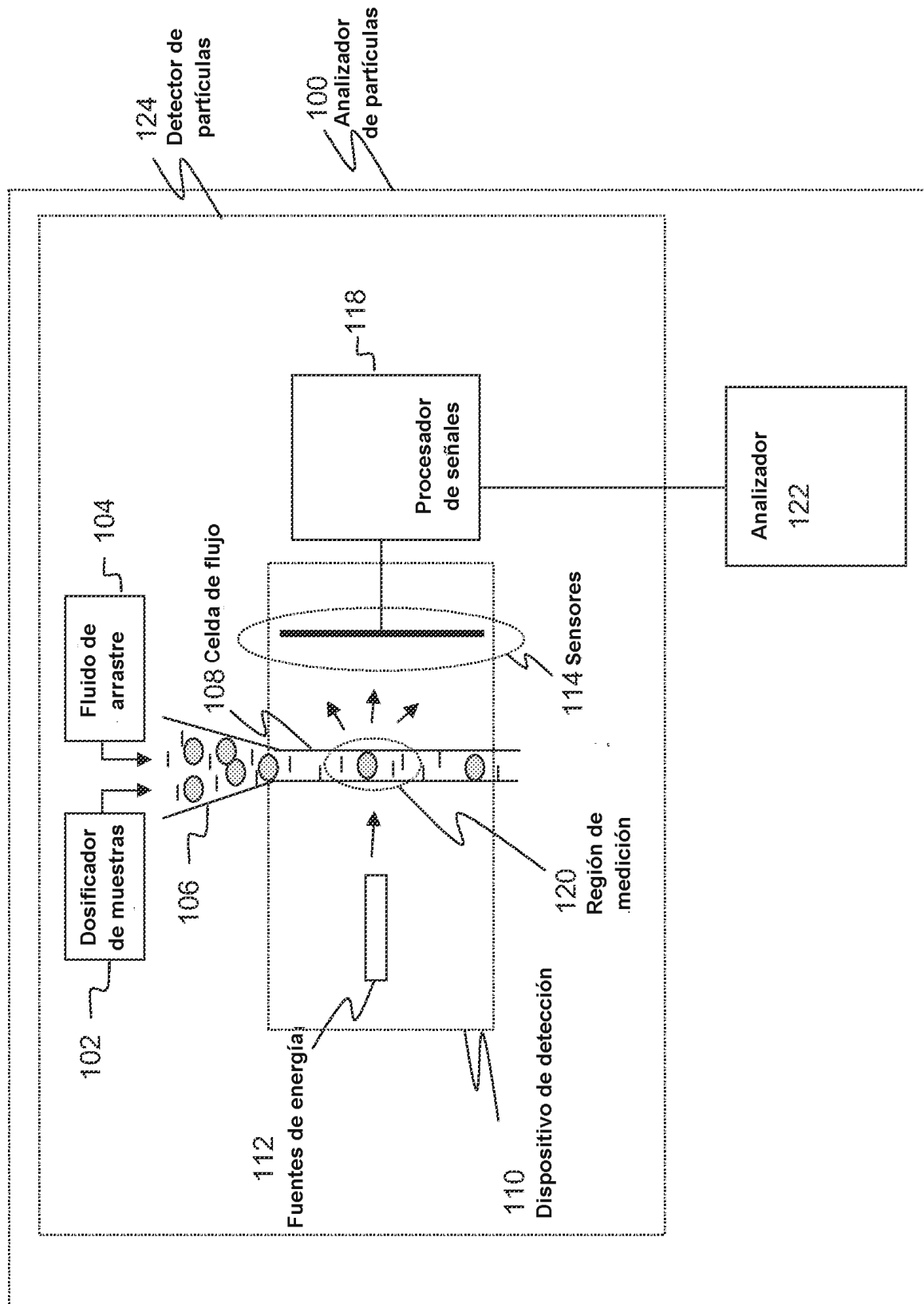


FIG. 1

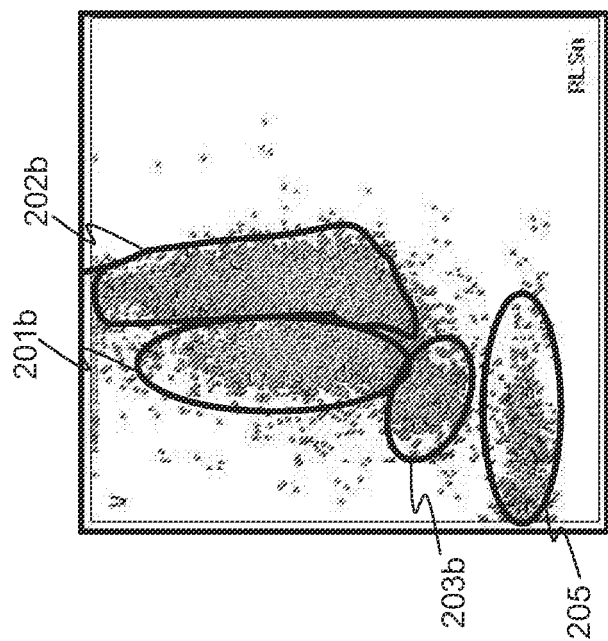


FIG. 2b

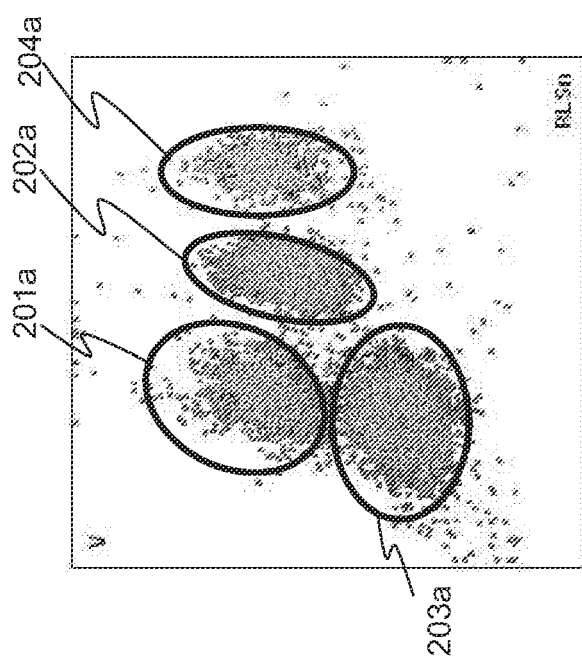


FIG. 2a

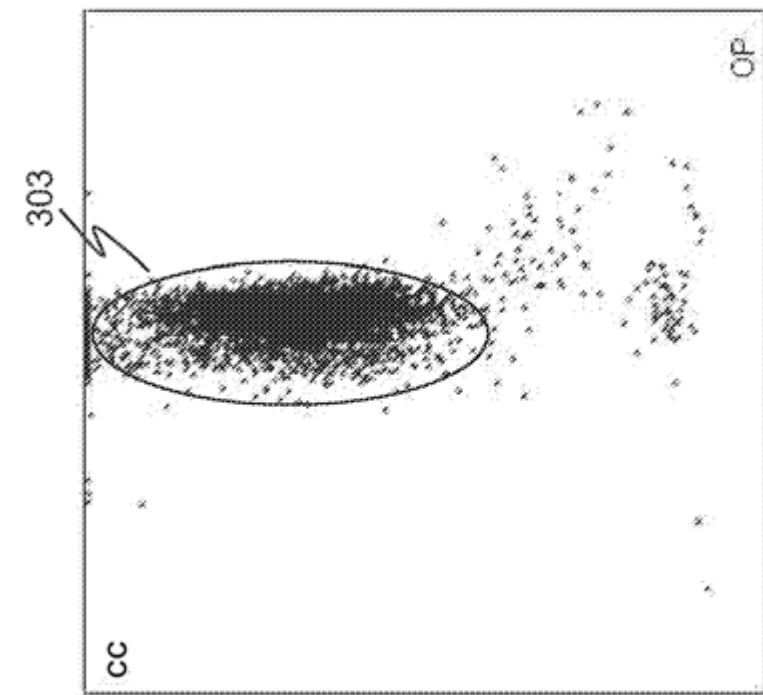


FIG. 3a

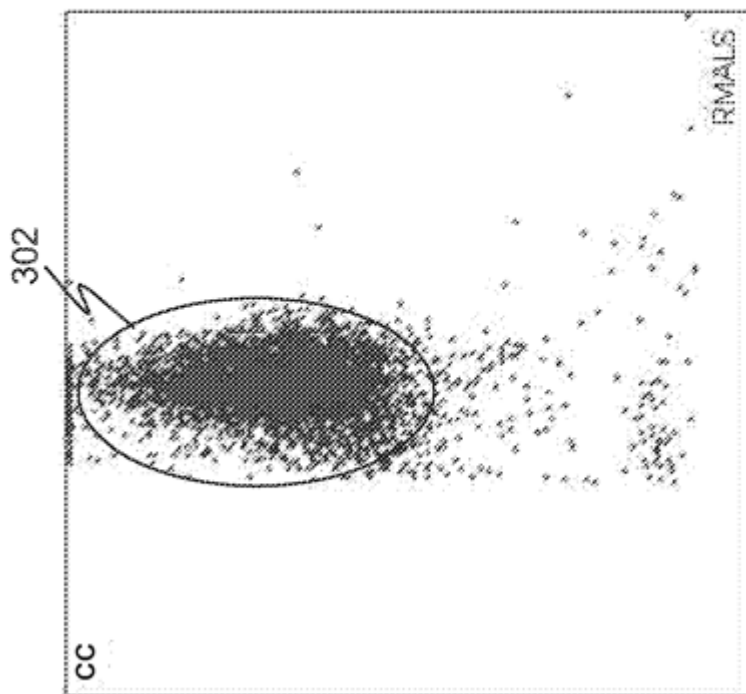


FIG. 3b

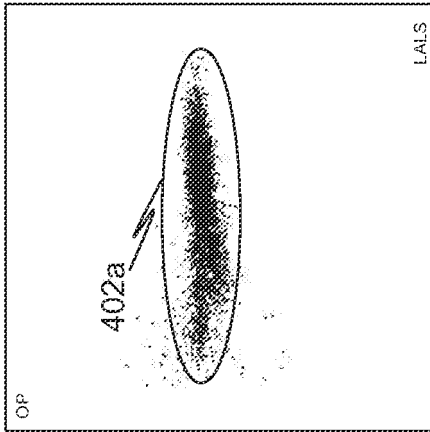


FIG. 4a

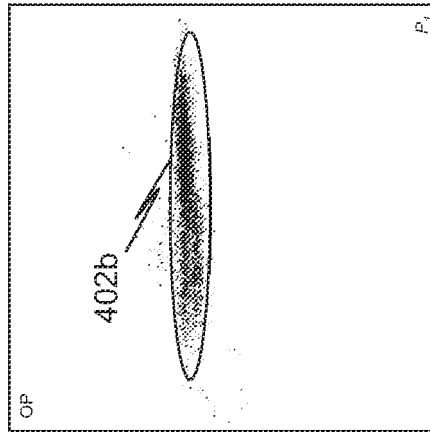


FIG. 4b

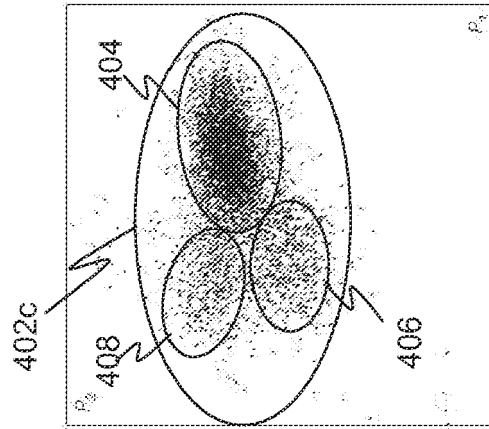


FIG. 4c

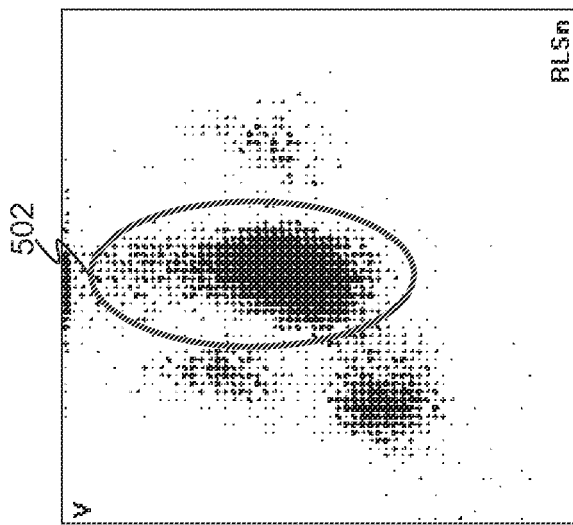


FIG. 5

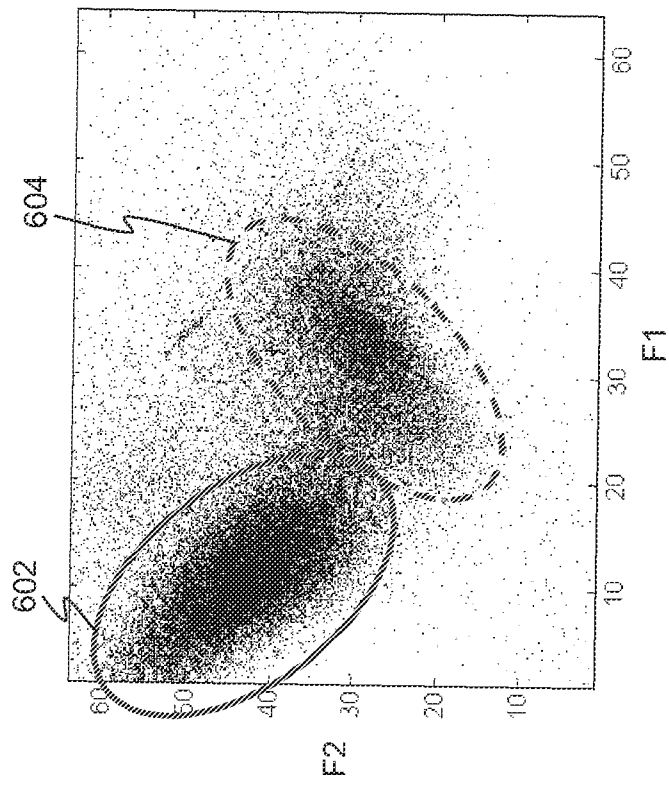


FIG. 6

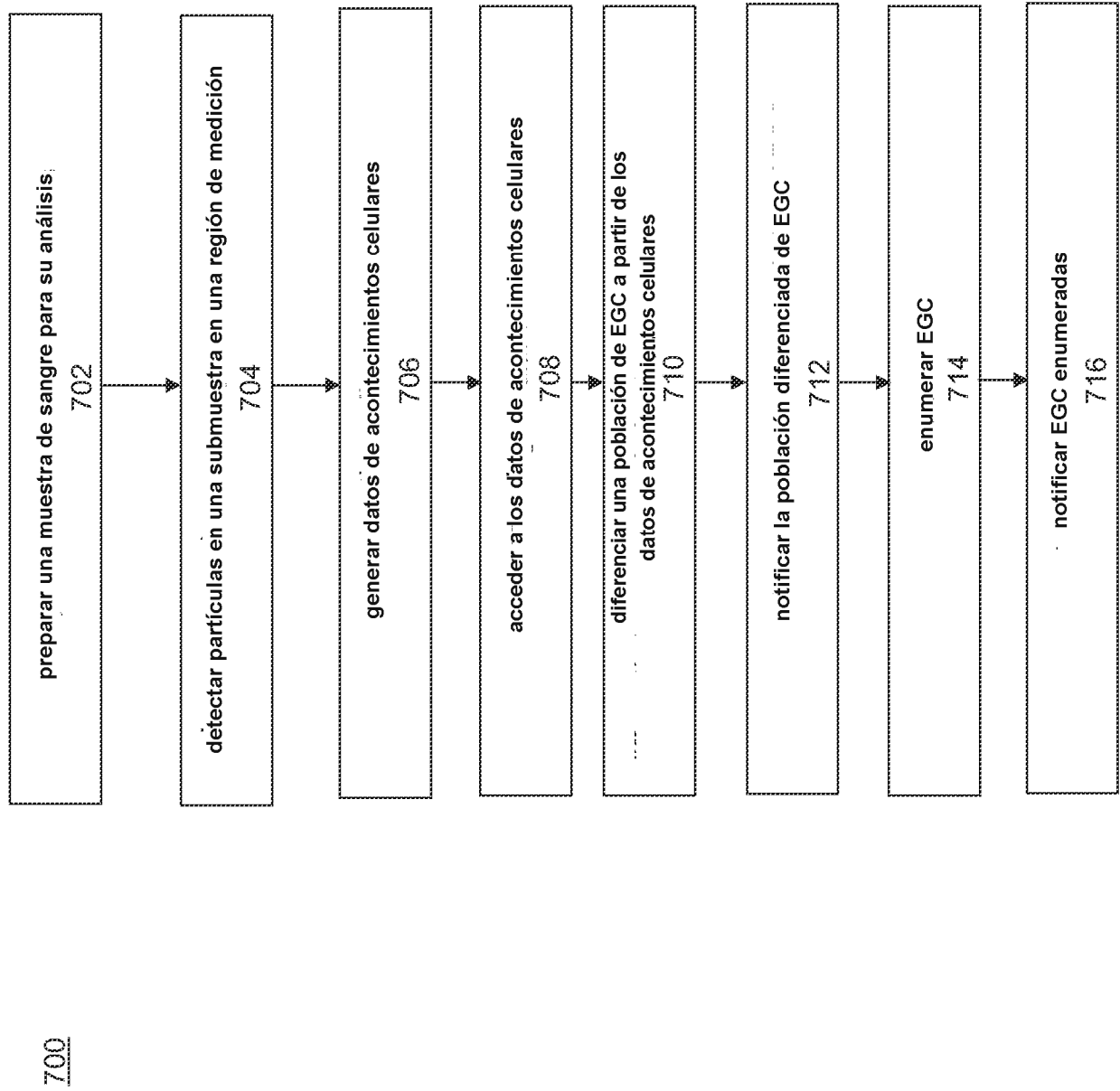


FIG. 7

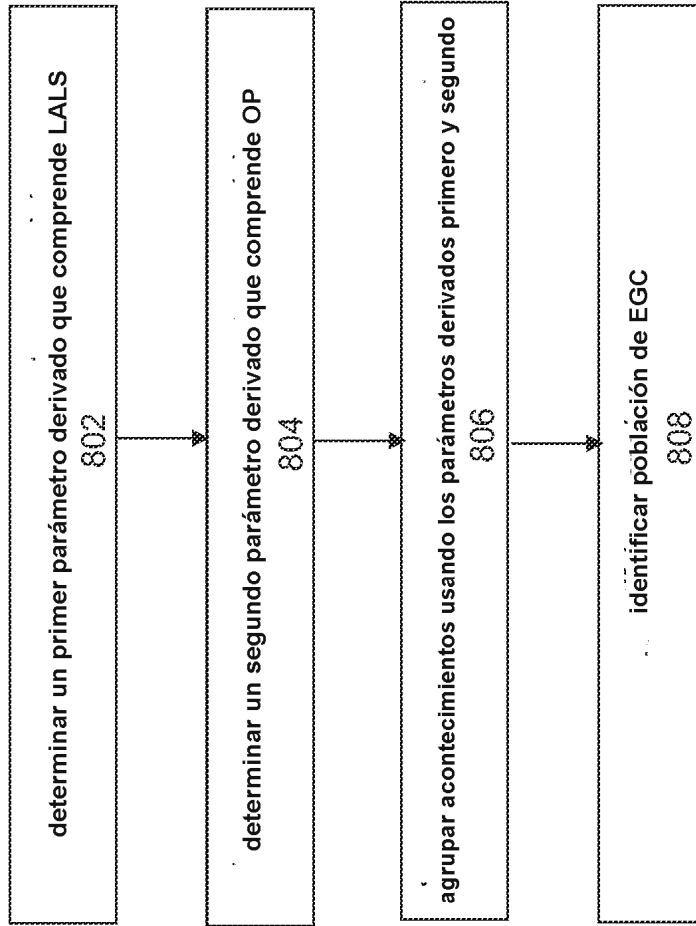


FIG. 8

900

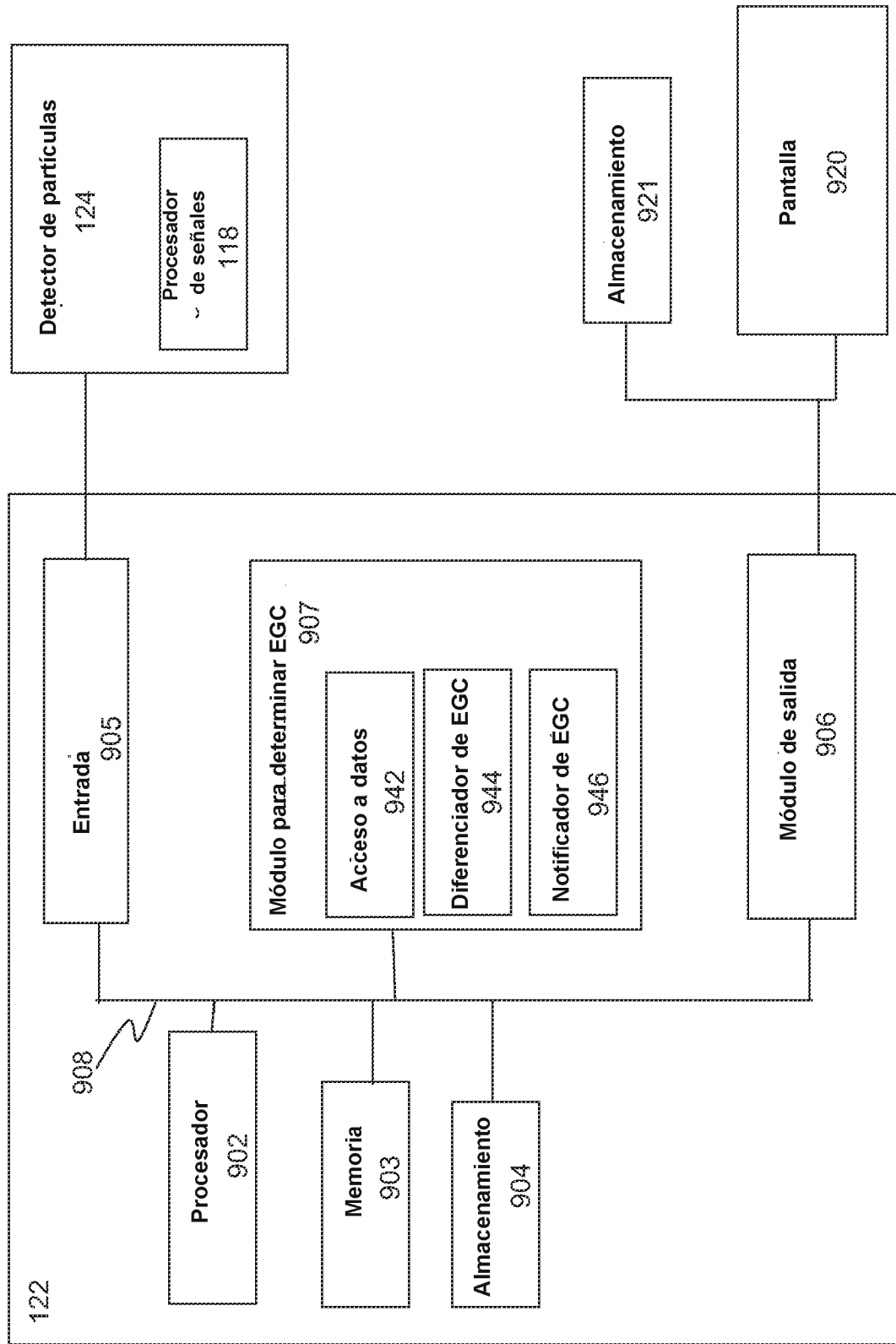


FIG. 9