



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 902 648**

⑮ Int. Cl.:

C12M 1/42 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
G01N 15/14 (2006.01)
G01N 15/00 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/80 (2006.01)
G01N 15/10 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2012 PCT/US2012/035161**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2012 WO12151103**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2012 E 12779936 (9)**

⑨ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.10.2021 EP 2705136**

④ Título: **Método de análisis de glóbulos rojos nucleados y analizador hematológico automatizado**

⑩ Prioridad:

04.05.2011 US 201161482545 P

⑤ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.03.2022

⑦ Titular/es:

ABBOTT LABORATORIES (100.0%)
100 Abbott Park Road
Abbott Park, IL 60064-3500, US

⑧ Inventor/es:

WU, JIONG;
COLEMAN, MARILOU;
LIN, EMILY H.;
BUHL, MICHAEL R. y
VACCA, GIACOMO

⑨ Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 902 648 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

Método de análisis de glóbulos rojos nucleados y analizador hematológico automatizado

5 Antecedentes

Esta invención se refiere a sistemas y métodos de hematología. Más específicamente, esta invención se refiere a sistemas y métodos para analizar muestras de sangre para identificar, clasificar y/o cuantificar glóbulos rojos nucleados (nRBC) en una muestra de sangre.

10 Los glóbulos rojos nucleados suelen estar presentes en el feto y en la sangre periférica de los recién nacidos. Sin embargo, los nRBC se consideran anormales para los adultos. La presencia de nRBC en el torrente sanguíneo periférico de un adulto generalmente es una indicación de estrés medular grave. Los estudios han demostrado que la aparición de los nRBC en el torrente sanguíneo está altamente correlacionada con estadios graves de la enfermedad y/o mal pronóstico para pacientes clínicamente enfermos. Por lo tanto, la identificación y cuantificación precisa de los nRBC se ha vuelto cada vez más importante para el diagnóstico clínico.

15 Debido a que los nRBC comparten numerosas similitudes con los glóbulos blancos (WBC), la concentración de nRBC en una muestra de sangre típicamente se informa como un porcentaje del total de WBC en la muestra de sangre (es decir, %nRBC = nRBC/WBC x 100 %). Los enfoques tradicionales para analizar los nRBC incluyen: (1) separar los nRBC de los WBC por tamaño; (2) diferenciar los nRBC de los WBC por medio de la dispersión de la luz; o (3) analizar los nRBC por medio de detección de emisión de fluorescencia después de lisar y teñir la membrana celular con un colorante fluorescente impermeable.

20 25 Cada una de las técnicas enumeradas anteriormente han mostrado debilidades en las prácticas clínicas. Por ejemplo, es difícil eliminar por completo los fragmentos de glóbulos rojos lisados (RBC) en mediciones hematológicas rápidas. Debido a que los fragmentos de los RBC y el núcleo de los nRBC pueden ser similares en tamaño y características de dispersión de la luz, el análisis basado en el tamaño y/o la dispersión de la luz a veces es engañoso. Mientras tanto, el análisis basado en la emisión de fluorescencia puede verse afectado negativamente por: (1) "sublisis" de la muestra de manera que el colorante impermeable a la membrana celular y no puede alcanzar los núcleos de los nRBC; (2) "sobrelisis" de la muestra de manera que los núcleos de los WBC se tiñen e interfieren con el recuento de los nRBC; (3) la existencia de linfocitos frágiles, de manera que los glóbulos blancos son inesperadamente hipersensibles a un reactivo de lisis (lo que da falsos positivos); y/o (4) la existencia de nRBC resistentes a la lisis, de modo que los nRBC son inesperadamente insensibles a un reactivo de lisis (lo que da falsos negativos). En la práctica, la lisis excesiva o insuficiente es común debido a la variación en la rigidez de la membrana de las células sanguíneas entre las muestras de sangre. Como tal, la dependencia de técnicas de detección conocidas de dispersión de luz y/o emisión de fluorescencia puede dar como resultado un análisis inexacto y poco confiable para los nRBC, de esta manera se evitan diagnósticos y tratamientos correctos para pacientes clínicamente enfermos.

30 35 40 El documento US 2007/298408 A1 (Mizukami Toshihiro) describe un reactivo para medir un basófilo y/o un glóbulo rojo nucleado. El reactivo comprende (a) un alcohol que tiene de 4 a 8 átomos de carbono totales, y (b) uno o más colorantes fluorescentes seleccionados del grupo que consiste en un compuesto de la fórmula general (I) y un compuesto de la fórmula general (II).

45 50 55 El documento US 2006/269970 A1 (Paul, Ronald D) describe métodos para identificar diferencialmente células en un instrumento que emplea composiciones que contienen una combinación de anticuerpos seleccionados y colorantes fluorescentes que tienen diferentes patrones de distribución celular y especificidades, así como también anticuerpos y colorantes fluorescentes caracterizados por espectros de emisión superpuestos que forman patrones espectrales no compensables. Cuando se emplean las composiciones descritas en la presente descripción que consisten de colorantes fluorescentes y anticuerpos marcados con fluorocromo con espectros superpuestos que no pueden separarse o distinguirse basándose en medios de compensación ópticos o electrónicos, se establece una nueva huella fluorescente. Esta nueva huella fluorescente es el resultado de los espectros superpuestos y los patrones de tinción celular combinados de los colorantes y los anticuerpos marcados con fluorocromo elegidos para la composición. La nueva huella fluorescente da como resultado patrones de histograma que son útiles para la identificación de poblaciones o subtipos de células adicionales en enfermedades hematológicas.

60 65 El documento US 5 559 037 A (Kim Young R) describe un método y un dispositivo para el análisis citométrico de flujo simultáneo y cuantitativo de glóbulos rojos nucleados (nRBC) y glóbulos blancos (WBC) en una muestra de sangre completa. El método incluye la lisis de glóbulos rojos (RBC) y el citoplasma de los nRBC de una alícuota de una muestra de sangre completa para eliminar RBC y exponer los nRBC a una tinción nuclear vital y la inhibición de la penetración del colorante nuclear en los WBC, someter la alícuota teñida a mediciones de luz citométrica de flujo, obtención de al menos una señal para parámetros que incluyen luz dispersa en un primer y segundo intervalo de ángulos de dispersión y fluorescencia (FL), calificación de las señales obtenidas mediante el uso de la lógica de combinación en donde una señal calificada debe ser mayor que el segundo umbral de la señal de dispersión, mientras que al mismo tiempo debe ser mayor que el primer umbral de la señal de dispersión o el umbral de FL {[primera señal de ángulo de dispersión o señales de FL] y segunda señal de ángulo de las señales detectadas]}, construcción de un

gráfico tridimensional de las señales de intensidad calificada de fluorescencia y luz dispersa de las señales detectadas, y diferenciación de los nRBC y los WBC en el gráfico tridimensional construido y determinación del número de células de cada tipo.

- 5 El documento US 6 228 652 B1 (Rodríguez Carlos M) describe un instrumento de análisis de sangre que incluye un solo transductor para medir simultáneamente el volumen de CC, la conductividad de RF, la dispersión de la luz y las características de fluorescencia de las células sanguíneas que pasan a través de una zona de interrogación de células. Preferentemente, el transductor incluye una celda de flujo electroóptica que define una zona de interrogación de células que tiene una sección transversal cuadrada que mide aproximadamente 50x50 micras y tiene una longitud, medida en la dirección del flujo de la celda, de aproximadamente 65 micras.
- 10

Breve resumen

- 15 En la presente descripción se proporciona un analizador hematológico automatizado de acuerdo con la reivindicación 10 y un método de acuerdo con la reivindicación 1 para analizar muestras de sangre, y más específicamente para realizar un análisis de nRBC. El analizador y los métodos de hematología automatizados seleccionan una muestra de sangre por medio de tinción de fluorescencia con un colorante fluorescente permeable a la membrana celular. Luego se usa una estrategia de activación de fluorescencia para identificar, distinguir y separar partículas que contienen núcleos (por ejemplo, los nRBC y los WBC) de las partículas que no contienen núcleos (por ejemplo, RBC y/o fragmentos de RBC) dentro de la muestra de sangre. Como tal, la interferencia de los RBC no lisados y los fragmentos de los RBC lisados se puede eliminar sustancialmente antes del análisis posterior. En las reivindicaciones dependientes se describen etapas ventajosas opcionales del método. El analizador y los métodos de hematología automatizados permiten el desarrollo de reactivos relativamente más suaves, adecuados para ensayos de muestras que contienen WBC frágiles.
- 20
- 25

Breve descripción de las figuras

- 30 Las figuras adjuntas, que se incorporan en la presente descripción, forman parte de la descripción. Junto con esta descripción escrita, las figuras sirven además para explicar los principios de y para permitir que una persona experta en la técnica relevante, fabrique y use los sistemas y métodos presentados. En las figuras, los números de referencia similares indican elementos idénticos o funcionalmente similares.

- 35 Las Figuras 1A-1D muestran histogramas de una muestra de sangre completa, que muestran WBC, nRBC y residuos de RBC después de la lisis.
- La Figura 1A es un histograma que muestra las mediciones de la pérdida de luz axial (ALL).
- La Figura 1B es un histograma que muestra las mediciones de la dispersión de ángulo intermedio (IAS).
- La Figura 1C es un histograma que muestra las mediciones de la dispersión lateral polarizada de 90° (PSS).
- La Figura 1D es un histograma que muestra mediciones de fluorescencia (FL1).
- 40 La Figura 2 es un diagrama esquemático que ilustra un instrumento de hematología.
- Las Figuras 3A-3F son citogramas que ilustran un análisis de una muestra de sangre que contiene nRBC a un %NRBC del 75 %.
- La Figura 3A es un citograma que representa la pérdida de luz axial frente a la dispersión de ángulo intermedio.
- La Figura 3B es un citograma que representa la dispersión lateral polarizada de 90° frente a la pérdida de luz axial.
- 45 La Figura 3C es un citograma que representa la dispersión lateral polarizada de 90° frente a la dispersión de ángulo intermedio.
- La Figura 3D es un citograma que representa FL1 frente a la pérdida de luz axial.
- La Figura 3E es un citograma que representa FL1 frente a dispersión de ángulo intermedio.
- La Figura 3F es un citograma que representa FL1 frente a una dispersión lateral polarizada de 90°.
- 50 Las Figuras 4A-4F son citogramas que ilustran un análisis de una muestra de sangre que contiene nRBC como un %NRBC de 1,0 %.
- La Figura 4A es un citograma que representa la pérdida de luz axial frente a la dispersión de ángulo intermedio.
- La Figura 4B es un citograma que representa la dispersión lateral polarizada de 90° frente a la pérdida de luz axial.
- La Figura 4C es un citograma que representa la dispersión lateral polarizada de 90° frente a la dispersión de ángulo intermedio.
- 55 La Figura 4D es un citograma que representa FL1 frente a pérdida de luz axial.
- La Figura 4E es un citograma que representa FL1 frente a dispersión de ángulo intermedio.
- La Figura 4F es un citograma que representa FL1 frente a una dispersión lateral polarizada de 90°.
- 60 La Figura 5 es un gráfico que ilustra la correlación del %NRBC según se determina mediante la activación manual frente a los resultados de referencia, en donde los resultados de referencia se obtuvieron mediante una revisión microscópica.
- La Figura 6 es un gráfico que ilustra la correlación del %NRBC según se determina mediante la activación manual frente a los resultados de referencia, en donde los resultados de referencia se obtuvieron mediante un analizador hematológico "CELL-DYN" Sapphire™.
- 65 La Figura 7 es un gráfico que ilustra la correlación del %NRBC, según se determina mediante agrupamiento automático frente a resultados de referencia, en donde los resultados de referencia se obtuvieron mediante una revisión microscópica.

La Figura 8 es un gráfico que ilustra la correlación del %NRBC, según se determina por agrupamiento automático frente a resultados de referencia, en donde los resultados de referencia se obtuvieron mediante un analizador hematológico "CELL-DYN" Sapphire™.

5 Descripción detallada

En la presente descripción se proporcionan sistemas y métodos para analizar muestras de sangre y, más específicamente, para realizar un análisis de nRBC para identificar, clasificar y contar los nRBC en una muestra de sangre. En general, los sistemas y métodos descritos seleccionan los casos que contienen núcleos frente a los casos que no contienen núcleos por medio de una tinción de fluorescencia y una estrategia de activación de fluorescencia. Como tal, la interferencia de los glóbulos rojos no lisados (RBC), como los glóbulos rojos resistentes a la lisis (rstRBC) y los fragmentos de RBC se elimina sustancialmente antes del análisis posterior. En otras palabras, los sistemas y métodos descritos en la presente descripción utilizan al menos un colorante fluorescente y un sistema de activación de fluorescencia para seleccionar los casos que contienen núcleos, para identificar y cuantificar de ese modo de forma precisa y fiable los WBC y los nRBC. La información de dispersión de la luz, opcionalmente en combinación con la información de fluorescencia, se usa luego para separar aún más los nRBC de los WBC. Los sistemas y métodos descritos aseguran de esta manera el recuento y la diferenciación precisa de los nRBC, los WBC y las subpoblaciones de WBC. Los sistemas y métodos también permiten el desarrollo de reactivos para los WBC relativamente más suaves, adecuados para ensayos de muestras que contienen linfocitos frágiles (u otros WBC frágiles), incluidas muestras envejecidas.

Los sistemas y métodos de acuerdo con la presente invención muestran grandes ventajas sobre los métodos tradicionales porque la interferencia de los fragmentos de RBC se elimina sustancialmente y los resultados del ensayo se vuelven mucho menos sensibles a la fuerza de la lisis. En otras palabras, las técnicas tradicionales de análisis de nRBC son muy sensibles a la fuerza de la lisis. Si la fuerza del agente de lisis es demasiado débil, los fragmentos de RBC o RBC no lisados también se recogerán en el análisis de los WBC. Estos fragmentos de RBC o RBC no lisados se superponen a los nRBC en muchas dimensiones, lo que dificulta el análisis de los nRBC. Por otro lado, si la fuerza del agente de lisis fuera demasiado fuerte (para tratar mejor los fragmentos de RBC), un cierto porcentaje de linfocitos podría dañarse y podría reconocerse como nRBC. Por lo tanto, la fuerza del agente de lisis es un problema en el análisis de los WBC. Una característica clave de los métodos descritos en la presente descripción es la reducción de la interferencia de fragmentos de RBC o RBC no lisados en el análisis de WBC y nRBC nucleados. En consecuencia, se pueden tolerar mejor las variaciones en la fuerza del agente de lisis. Incluso si el agente de lisis es más débil de lo habitual, los RBC no lisados no interfieren con el ensayo de los nRBC.

35 En los sistemas y métodos descritos en la presente descripción, la cuantificación e identificación de los nRBC y los WBC se pueden obtener simultáneamente en un único ensayo. Alternativamente, en los sistemas y métodos descritos en la presente descripción, la cuantificación e identificación de los nRBC se puede llevar a cabo sin el análisis de los WBC.

40 (1) Uso de colorante(s) fluorescente(s).

Los WBC y los nRBC contienen una concentración relativamente alta de ADN en sus núcleos. Sin embargo, los RBC maduros no contienen ADN. Por lo tanto, se selecciona un colorante fluorescente para diferenciar dos clases de células sanguíneas; específicamente, las células sanguíneas que contienen ácidos nucleicos y las células sanguíneas que no contienen ácidos nucleicos. El propósito del colorante es penetrar fácilmente en las células vivas, unirse al ADN con alta afinidad y emitir una fuerte fluorescencia con un desplazamiento de Stokes adecuado cuando el colorante se excita con una fuente de luz adecuada. El pico de absorción del colorante en la banda visible coincide sustancialmente con la longitud de onda de la fuente de luz (dentro de los 50 nm de longitud de onda de la fuente de luz, con mayor preferencia, dentro de los 25 nm de longitud de onda de la fuente de luz), para excitar adecuadamente el colorante y lograr resultados óptimos.

55 El colorante fluorescente se selecciona preferentemente: 1) capaz de unirse a ácidos nucleicos, 2) capaz de penetrar las membranas celulares de los WBC y los nRBC, 3) excitable a una longitud de onda seleccionada cuando se somete a una fuente de luz, 4) emite fluorescencia al excitarse con una fuente de luz y 5) es bioestable y soluble en un líquido. El colorante se puede seleccionar del grupo que consiste de: naranja de acridina, SYBR 11, colorante de la serie SYBR Green, yoduro de hexidio, SYTO 11, SYTO 12, SYTO 13, SYTO 14, SYTO 16, SYTO 21, SYTO RNA Select, SYTO 24, SYTO 25 y cualquiera de sus equivalentes. El colorante fluorescente se usa para activar los WBC y los nRBC, y "filtrar" los RBC no lisados y los fragmentos de RBC en función de un activador de fluorescencia configurado en el analizador hematológico. El colorante está presente típicamente a una concentración de aproximadamente 0,1 ng/mL a aproximadamente 0,1 mg/mL. Si bien hay varios colorantes disponibles, el seleccionado generalmente se empareja con la fuente de excitación del analizador hematológico, de manera que se usa un solo colorante para teñir y excitar con la emisión de fluorescencia en los nRBC y todas las subpoblaciones de WBC que se pretenden identificar, cuantificar y/o analizar. Como tal, puede usarse un solo colorante (es decir, exclusivo) para identificar, cuantificar y analizar los nRBC y todas las subpoblaciones de WBC a la vez.

En una modalidad, se proporciona un reactivo como colorante fluorescente, con combinaciones de 1) al menos un surfactante, 2) al menos un tampón, 3) al menos una sal, y/o 4) al menos un agente antimicrobiano, en cantidades suficientes para realizar tinciones y activar hasta 1000×10^3 células por microlitro. El al menos un surfactante, como "TRITON" X-100 o saponina, se usa para destruir las membranas de los RBC y reducir el tamaño de los fragmentos de RBC. El al menos un surfactante está presente típicamente a una concentración de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 5 %. El al menos un agente antimicrobiano, como los de las familias "TRIADINE" o "PROCLIN", se emplean para evitar la contaminación del reactivo con microorganismos. La concentración del al menos un agente antimicrobiano es suficiente para conservar el reactivo de análisis durante la vida útil requerida. El al menos un tampón, como solución salina tamponada con fosfato (PBS) o ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico (HEPES), se usa para ajustar el pH de la mezcla de reacción para controlar la lisis de los RBC y conservar los WBC. El al menos un tampón está presente típicamente a una concentración de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 3 %. El pH varía típicamente de aproximadamente 3 a aproximadamente 12. La al menos una sal, como NaCl o Na₂SO₄, se usa para ajustar la osmolalidad para aumentar el efecto de lisis y/u optimizar la conservación de WBC. La al menos una sal puede estar presente en una concentración de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 3 %. En ciertos casos, el al menos un tampón puede servir como la al menos una sal, o la al menos una sal puede servir como el al menos un tampón. En general, se usa una osmolalidad o hipotonía más baja para acelerar la lisis de los RBC. La osmolalidad varía típicamente de aproximadamente 20 a aproximadamente 250 mOsm.

Se puede hacer que la lisis de los RBC ocurra a una temperatura superior a la temperatura ambiente (por ejemplo, entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 50 °C, como aproximadamente 40 °C) durante un período de tiempo relativamente corto (por ejemplo, menos de aproximadamente 25 segundos, menos de aproximadamente 17 segundos, o incluso menos de aproximadamente 9 segundos), después de mezclar la muestra de sangre y el reactivo en una relación de aproximadamente una parte en volumen de muestra a aproximadamente 35 partes en volumen de reactivo. Los datos para el análisis se recogen con una pluralidad de canales ópticos y al menos un canal de fluorescencia.

Las Figuras 1A-1D muestran histogramas de una muestra de sangre completa, que muestran la separación de los WBC, los nRBC y los residuos de RBC después de la lisis, en función de mediciones ópticas y de fluorescencia. Más específicamente, la Figura 1A es un histograma que muestra la separación de partículas en función de las mediciones de la pérdida de luz axial (ALL). La Figura 1B es un histograma que muestra la separación de partículas en función de las mediciones de dispersión de ángulo intermedio (IAS). La Figura 1C es un histograma que muestra la separación de partículas en función de las mediciones de dispersión lateral polarizada de 90° (PSS). La Figura 1D es un histograma que muestra la separación de partículas en función de las mediciones de fluorescencia (FL1). En los histogramas, el eje horizontal indica el valor del canal de detección (o los nombres de los canales, es decir, es decir, IAS, PSS o FL1). El eje vertical indica recuentos de los componentes de la muestra de sangre. En los histogramas, las líneas 100 indican residuos de RBC, las líneas 200 indican WBC y las líneas 300 indican los nRBC. Como se muestra al comparar la Figura 1D con las Figuras 1A-1C, la información de fluorescencia, en lugar de las mediciones ópticas, muestra una separación mucho mejor entre las partículas que contienen núcleos (por ejemplo, los WBC y los nRBC) y las partículas que no contienen núcleos (residuos de RBC). Como se usa en la presente descripción, "residuos de RBC" es sinónimo de "fragmentos de RBC".

(2) Uso de un activador de fluorescencia.

Las células sanguíneas emiten diferentes magnitudes de señales de fluorescencia tras la excitación del colorante fluorescente por una fuente de luz. Las diferencias en la magnitud de las señales de fluorescencia surgen en parte por la cantidad de ácidos nucleicos, específicamente, ADN, dentro de las células. Cuanto mayor sea la cantidad de ADN, mayor será la posibilidad de señales de fluorescencia más altas. Además, la eficacia de la penetración a las membranas celulares, el tamaño del colorante, la cinética de unión entre el colorante y el ADN, la afinidad entre el colorante y el ADN, y otros factores, afectan las señales de fluorescencia. Los RBC maduros emiten señales de fluorescencia mínimas porque no hay ADN dentro de los RBC maduros. Los nRBC emiten señales de fluorescencia muy fuertes, porque no solo el ADN está dentro de los núcleos de los nRBC, sino que también la tinción es más fácil porque las membranas de los nRBC se destruyen durante el procedimiento de lisis. Los RBC no lisados o los fragmentos de RBC no emiten fluorescencia, aunque pueden emitir autofluorescencia muy débil. Como se muestra con referencia a la Figura 1D, las células que emiten señales de fluorescencia mucho más fuertes son las células que tienen núcleos, es decir, específicamente los WBC y los nRBC (cuando están presentes).

Como tal, los sistemas y métodos presentados en la presente descripción usan un activador de fluorescencia para recoger y analizar los WBC y los nRBC. Por ejemplo, un activador de fluorescencia, generalmente establecido entre las señales de los RBC y las señales de los WBC y los nRBC, puede usarse para recoger señales de los WBC y los nRBC por separado para un análisis posterior.

(3) Uso de una pluralidad de canales ópticos y al menos un canal de fluorescencia para el análisis.

Como se usa en la presente, el término "información de fluorescencia" significa los datos recogidos de un canal de fluorescencia de un analizador hematológico. Como se usa en la presente, el término "canal de fluorescencia" significa

un dispositivo de detección, tal como un tubo fotomultiplicador, establecido en una banda de longitud de onda apropiada para medir la cantidad de fluorescencia emitida por una muestra.

En una modalidad, el análisis de la muestra de sangre se realiza por medio de la tecnología de separación por dispersión polarizada de ángulos múltiples (MAPSS), con mejora de la información de fluorescencia. Se necesitan al menos un fotodiodo, o al menos un tubo fotomultiplicador, o ambos al menos un fotodiodo y al menos un tubo fotomultiplicador, para detectar la luz dispersada por cada glóbulo que pasa a través de una celda de flujo. Se emplean dos o más fotodiodes para medir las señales en ALL, que miden aproximadamente 0° de dispersión, y señales IAS, que miden dispersiones de ángulo bajo (por ejemplo, de aproximadamente 3° a aproximadamente 15°). Se usan dos o más tubos fotomultiplicadores para detectar señales de dispersión lateral polarizada de 90° (PSS) y señales de dispersión lateral despolarizada de 90° (DSS). Se necesitan tubos fotomultiplicadores adicionales para las mediciones de FL1 dentro de los intervalos de longitud de onda apropiados, en dependencia de la elección de la longitud de onda de la fuente de luz. Cada evento capturado en el sistema exhibe así una pluralidad de dimensiones de información, como ALL, IAS (uno o más canales), PSS, DSS y fluorescencia (uno o más canales). La información de estos canales de detección se usa para un análisis adicional de las células sanguíneas.

La Figura 2 es un diagrama esquemático que ilustra la iluminación y la detección óptica de un aparato adecuado para el análisis hematológico (incluida la citometría de flujo). Con referencia ahora a la Figura 2, un aparato 10 comprende una fuente de luz 12, un espejo frontal 14 y un espejo trasero 16 para curvar el haz, un módulo expansor de haz 18 que contiene una primera lente cilíndrica 20 y una segunda lente cilíndrica 22, una lente de enfoque 24, un ajustador de haz 26, una celda de flujo 28, una lente de dispersión delantera 30, un detector de diana 32, un primer tubo fotomultiplicador 34, un segundo tubo fotomultiplicador 36 y un tercer tubo fotomultiplicador 38. El detector de diana 32 tiene un detector interno 32a para una dispersión de luz de 0° y un detector externo 32b para una dispersión de luz de 7°.

En la discusión que sigue, la fuente de luz es preferentemente un láser. Sin embargo, otras fuentes de luz pueden usarse como, por ejemplo, lámparas (por ejemplo, de mercurio, xenón). La fuente de luz 12 puede ser un láser refrigerado por aire y polarizado verticalmente Coherent Cube, disponible comercialmente de Coherent, Inc., Santa Clara, CA. Pueden usarse láseres que tienen longitudes de onda que varían de 350 nm a 700 nm. Las condiciones de funcionamiento del láser son sustancialmente similares a las de los láseres que se actualmente con los analizadores hematológicos automatizados "CELL-DYN".

Se pueden encontrar detalles adicionales con relación a la celda de flujo, las lentes, la lente de enfoque, el mecanismo de ajuste de haz fino y la lente de enfoque láser en la patente de Estados Unidos núm. 5,631,165, particularmente en la columna 41, línea 32 hasta la columna 43, línea 11. El sistema de trayectoria óptica de avance que se muestra en la Figura 2 incluye una lente esférica plano-convexa 30 y un detector de fotodiodes de dos elementos 32 ubicado en el plano focal posterior de la lente. En esta configuración, cada punto dentro del detector de fotodiode de dos elementos 32 se asigna a un ángulo de recogida específico de luz de las células que se mueven a través de la celda de flujo 28. El detector 32 puede ser un detector diana capaz de detectar la pérdida de luz axial (ALL) y la dispersión frontal de ángulo intermedio (IAS). La Patente de Estados Unidos núm. 5,631,165 describe varias alternativas para este detector en la columna 43, líneas 12-52.

El primer tubo fotomultiplicador 34 (PMT1) mide la dispersión lateral despolarizada (DSS). El segundo tubo fotomultiplicador 36 (PMT2) mide la dispersión lateral polarizada (PSS), y el tercer tubo fotomultiplicador 38 (PMT3) mide la emisión de fluorescencia de 440 nm a 680 nm, en dependencia del colorante fluorescente seleccionado y la fuente de luz empleada. El tubo fotomultiplicador recoge las señales fluorescentes en un amplio intervalo de longitudes de onda para aumentar la fuerza de la señal. Las emisiones de dispersión lateral y fluorescente se dirigen a estos tubos fotomultiplicador mediante divisores de haz dicroicos 40 y 42, que transmiten y reflejan eficientemente en las longitudes de onda requeridas para permitir una detección eficiente. La Patente de Estados Unidos núm. 5,631,165 describe varios detalles adicionales con relación a los tubos fotomultiplicador en la columna 43, línea 53 hasta la columna 44, línea 4.

La sensibilidad aumenta en los tubos fotomultiplicador 34, 36 y 38, cuando se mide la fluorescencia, mediante el uso de un sistema de recogida por inmersión. El sistema de recogida por inmersión es uno que acopla ópticamente la primera lente 30 a la celda de flujo 28 por medio de una capa de coincidencia de índice de refracción, lo que permiten la recogida de luz en un gran ángulo. La Patente de Estados Unidos núm. 5,631,165 describe varios detalles adicionales de este sistema óptico en la columna 44, líneas 5-31.

El condensador 44 es un sistema de lentes ópticas con corrección de aberración suficiente para la formación de imágenes de difracción limitada usada en microscopía de alta resolución. La Patente de Estados Unidos núm. 5,631,165 describe varios detalles adicionales de este sistema óptico en la columna 44, líneas 32-60.

Las funciones de otros componentes que se muestran en la Figura 2, es decir, una hendidura 46, una lente de campo 48 y una segunda hendidura 50, se describen en la patente de Estados Unidos núm. 5,631,165, en la columna 44, línea 63 hasta la columna 45, línea 26. Los filtros ópticos 52 o 56 y un polarizador 52 o 56, que se insertan en las trayectorias de luz de los tubos fotomultiplicadores para cambiar la longitud de onda o la polarización o tanto la longitud

de onda como la polarización de la luz detectada, también se describen en la Patente de Estados Unidos núm. 5,631,165, en la columna 44, línea 63 hasta la columna 45, línea 26. Los filtros ópticos que son adecuados para su uso en la presente descripción incluyen filtros de paso de banda y filtros de paso largo.

- 5 Los tubos fotomultiplicadores 34, 36 y 38 detectan dispersión lateral (luz dispersa en un cono cuyo eje es aproximadamente perpendicular al rayo láser incidente) o fluorescencia (luz emitida por las células a una longitud de onda diferente a la del rayo láser incidente).
- 10 La información óptica y de fluorescencia recogida puede usarse para distinguir (o diferenciar) los nRBC de los WBC (y las subpoblaciones de WBC). Por ejemplo, se pueden usar citogramas bidimensionales (por ejemplo, citogramas que muestran PSS frente a ALL; ALL frente a IAS; y/o FL1 frente a ALL/IAS/PSS) puede usarse para identificar y distinguir partículas.
- 15 Las Figuras 3A-3F son citogramas que ilustran un análisis de una muestra de sangre que contiene nRBC a un %NRBC del 75 %. Más específicamente, la Figura 3A es un citograma que representa la pérdida de luz axial frente a la dispersión de ángulo intermedio. La Figura 3B es un citograma que representa la dispersión lateral polarizada de 90° frente a la pérdida de luz axial. La Figura 3C es un citograma que representa la dispersión lateral polarizada de 90° frente a la dispersión de ángulo intermedio. La Figura 3D es un citograma que representa FL1 frente a la pérdida de luz axial. La Figura 3E es un citograma que representa FL1 frente a dispersión de ángulo intermedio. La Figura 3F es 20 un citograma que representa FL1 frente a una dispersión lateral polarizada de 90°. Los valores de %NRBC obtenidos a partir de los citogramas fueron 80,7 (según se determinó mediante activación manual mediante el uso de PSS frente a ALL) y 76,3 (según se determinó mediante análisis de agrupamiento automático realizado con el software MATLAB).
- 25 Las Figuras 4A-4F son citogramas que ilustran un análisis de una muestra de sangre que contiene nRBC como un %NRBC de 1,0 %. Más específicamente, la Figura 4A es un citograma que representa la pérdida de luz axial frente a la dispersión de ángulo intermedio. La Figura 4B es un citograma que representa la dispersión lateral polarizada de 90° frente a la pérdida de luz axial. La Figura 4C es un citograma que representa la dispersión lateral polarizada de 90° frente a la dispersión de ángulo intermedio. La Figura 4D es un citograma que representa FL1 frente a pérdida de 30 luz axial. La Figura 4E es un citograma que representa FL1 frente a dispersión de ángulo intermedio. La Figura 4F es un citograma que representa FL1 frente a una dispersión lateral polarizada de 90°. Los valores de % NRBC obtenidos a partir de los citogramas fueron 1,2 (según se determinó mediante activación manual mediante el uso de PSS frente a ALL) y 1,2 (según se determinó mediante análisis de agrupamiento automático realizado con el software MATLAB).
- 35 En un estudio que usó un total de 136 muestras que contenían nRBC, se emplearon tanto las revisiones manuales del microscopio como los resultados del analizador hematológico "CELL-DYN" Sapphire™ como referencia para las cuantificaciones de los nRBC. Se incluyó naranja de acridina, a una concentración de 3 µg/mL, en el reactivo a. La muestra de sangre y el reactivo se mezclaron a una relación de una parte en volumen de muestra por 35 partes en volumen de reactivo. La mezcla se incubó durante un período de 25 segundos a una temperatura de 40 °C. Se aplicó una duración de medición de la muestra de 9 segundos, con uso de FL1 como único activador. Se recogieron 40 mediciones de ALL, IAS, PSS y FL1 para cada muestra. Los datos se analizaron mediante el uso tanto de la activación manual (PSS frente a ALL, o PSS frente a IAS) como el análisis de agrupamiento automático mediante el uso del software MATLAB. Las correlaciones de %NRBC entre los resultados del método de la presente invención y los resultados de referencia se informaron como se muestra en las Figuras. 5-8.
- 45 La Figura 5, por ejemplo, compara los resultados (obtenidos por activación manual) con los resultados de referencia, en donde los resultados de referencia se obtuvieron mediante una revisión microscópica. Como se muestra, los sistemas y métodos de la presente invención produjeron resultados de acuerdo con la fórmula de pendiente y R^2 de: $Y = 1,0404X$; ($R^2 = 0,968$).
- 50 La Figura 6 compara los resultados (obtenidos por activación manual) con los resultados de referencia, en donde los resultados de referencia se obtuvieron mediante un analizador hematológico "CELL-DYN" Sapphire™. Como se muestra, los sistemas y métodos de la presente invención produjeron resultados de acuerdo con la fórmula de pendiente y R^2 de: $Y = 1,1004X$; ($R^2 = 0,956$).
- 55 La Figura 7 compara los resultados (obtenidos por agrupamiento automático) con los resultados de referencia, en donde los resultados de referencia se obtuvieron mediante una revisión microscópica. Como se muestra, los sistemas y métodos de la presente invención produjeron resultados de acuerdo con la fórmula de pendiente y R^2 de: $Y = 1,0215X$; ($R^2 = 0,963$).
- 60 La Figura 8 compara los resultados (obtenidos por agrupamiento automático) con los resultados de referencia, en donde los resultados de referencia se obtuvieron mediante un analizador hematológico "CELL-DYN" Sapphire™. Como se muestra, los sistemas y métodos de la presente invención produjeron resultados de acuerdo con la fórmula de pendiente y R^2 de: $Y = 1,0800X$ ($R^2 = 0,950$)
- 65 Las distancias de Bhattacharyya (BD) entre los nRBC y los linfocitos también se calcularon en función de las posiciones medias de los grupos y los coeficientes de variación de distribución. La separación de grupos se considera "buena" si

BD excede 3 y se considera "aceptable" si BD es mayor que 2 y menor o igual que 3. El valor promedio de BD para las pruebas fue de $4,64 \pm 1,89$, con un intervalo de 2,10 a 11,95, para las 136 muestras. Se observaron buenas separaciones (en las que BD excede de 3) entre los nRBC y los linfocitos en más del 85 % (116/136) de las muestras que contenían nRBC.

5 Por el contrario, con la dificultad de equilibrar la "sobrelisis" y "sublisis" para los métodos tradicionales de medición de nRBC, los métodos descritos en la presente descripción conservan los WBC y proporcionan la mejor separación entre los nRBC y los linfocitos (la subpoblación de WBC más cercana a los nRBC). Además, la interferencia de fragmentos de RBC se elimina sustancialmente.

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para realizar un análisis de glóbulos rojos nucleados, nRBC, con un analizador hematológico automatizado, el método comprende:
 - 5 (a) diluir una muestra de sangre completa con un reactivo, en donde el reactivo incluye un glóbulo rojo, RBC, un agente de lisis y un colorante fluorescente de unión a ácidos nucleicos permeable a la membrana celular;
 - 10 (b) incubar la muestra de sangre diluida de la etapa (a) durante un período de incubación de menos de 25 segundos, a una temperatura que varía de 30 °C a 50 °C, para lisar de esta manera los glóbulos rojos, RBC;
 - 15 (c) suministrar la muestra incubada de la etapa (b) a una celda de flujo en el analizador hematológico;
 - (d) excitar la muestra incubada de la etapa (c) con una fuente de excitación cuando la muestra incubada atraviesa la celda de flujo;
 - (e) recoger una pluralidad de señales de dispersión de luz y una señal de emisión de fluorescencia de la muestra excitada; caracterizado porque
 - (f) antes de realizar un análisis de los nRBC, excluir las partículas libres de núcleos y retener las partículas que contienen núcleos mediante el uso de un activador de fluorescencia que se limita a las señales de emisión de fluorescencia y se establece en una magnitud de fluorescencia que es mayor que las señales de emisión de fluorescencia de los RBC, incluidos sus fragmentos, y es menor que las señales de emisión de fluorescencia de los glóbulos blancos, WBC y los nRBC; y
 - (g) realizar un análisis de los nRBC con solo las partículas que contienen núcleos retenidas por el activador de fluorescencia en la etapa (f) en donde la realización del análisis de los nRBC solo en partículas que contienen núcleos comprende identificar, clasificar y contar nRBC en función de la dispersión de la luz y la emisión de señales de fluorescencia recogidas en la etapa (e) o en función de las señales de dispersión de luz recogidas en la etapa (e), en donde los nRBC se distinguen en la etapa (g) de los glóbulos blancos, WBC, en función de la pluralidad de señales de dispersión de luz solas o en combinación con la magnitud de la señal de emisión de fluorescencia.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el reactivo incluye (a) al menos un surfactante, (b) al menos un tampón o al menos una sal, (c) al menos un agente antimicrobiano y (d) al menos un colorante fluorescente.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la fuente de excitación tiene una longitud de onda que varía de 350 nm a 700 nm.
- 35 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la emisión de fluorescencia se recoge a una longitud de onda que varía en un intervalo de 360 nm a 750 nm, mediante un filtro de paso de banda o un filtro de paso largo.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la pluralidad de señales de dispersión de luz incluye una o más de: (1) pérdida de luz axial, (2) dispersión de ángulo intermedio, (3) dispersión lateral polarizada de 90° y (4) dispersión lateral despolarizada de 90°.
- 40 6. El método de acuerdo con a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el período de incubación es de menos de 17 segundos.
- 45 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el período de incubación es de menos de 9 segundos.
- 50 8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra de sangre diluida se incuba a una temperatura de 40 °C.
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el reactivo contiene un único colorante fluorescente que, cuando se empareja con la fuente de excitación, se usa para identificar, cuantificar y analizar los nRBC y una pluralidad de subpoblaciones de los WBC a la vez.
- 55 10. Un analizador hematológico automatizado que comprende un procesador y un medio legible por ordenador que comprende instrucciones que, cuando son ejecutadas por el procesador, hacen que el analizador hematológico lleve a cabo el método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

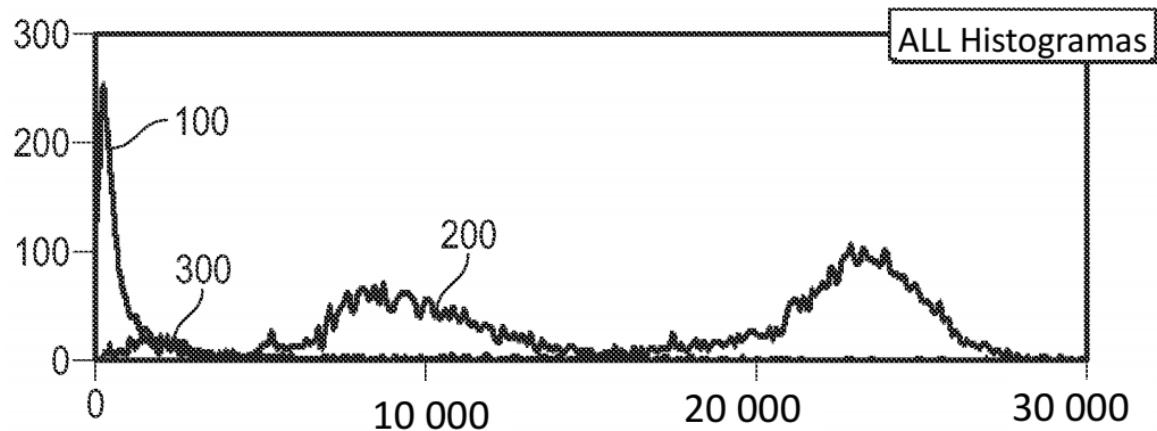


Figura 1A

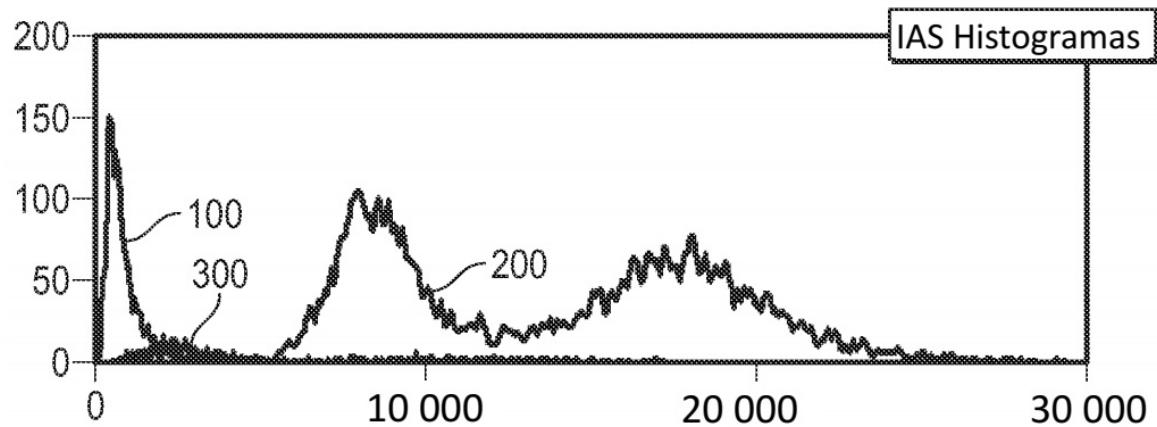


Figura 1B

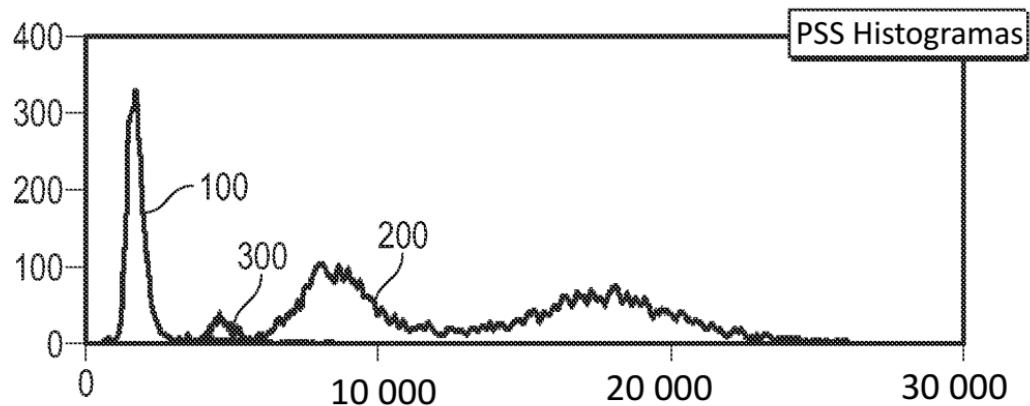


Figura 1C

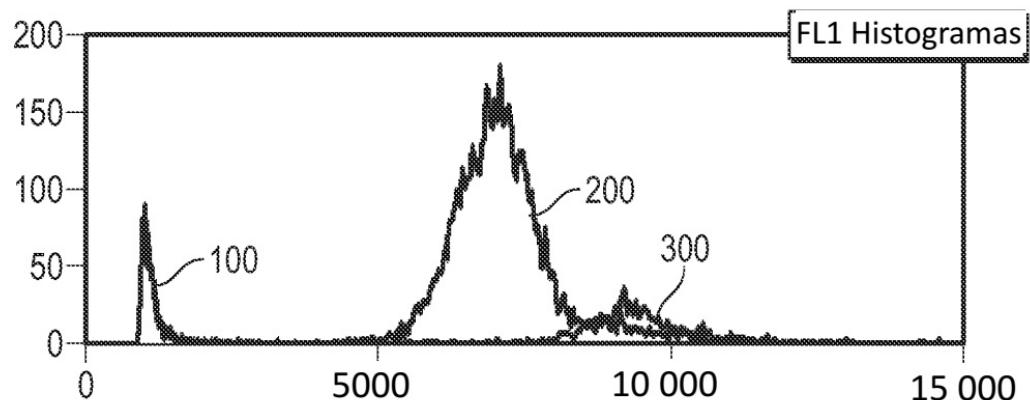


Figura 1D

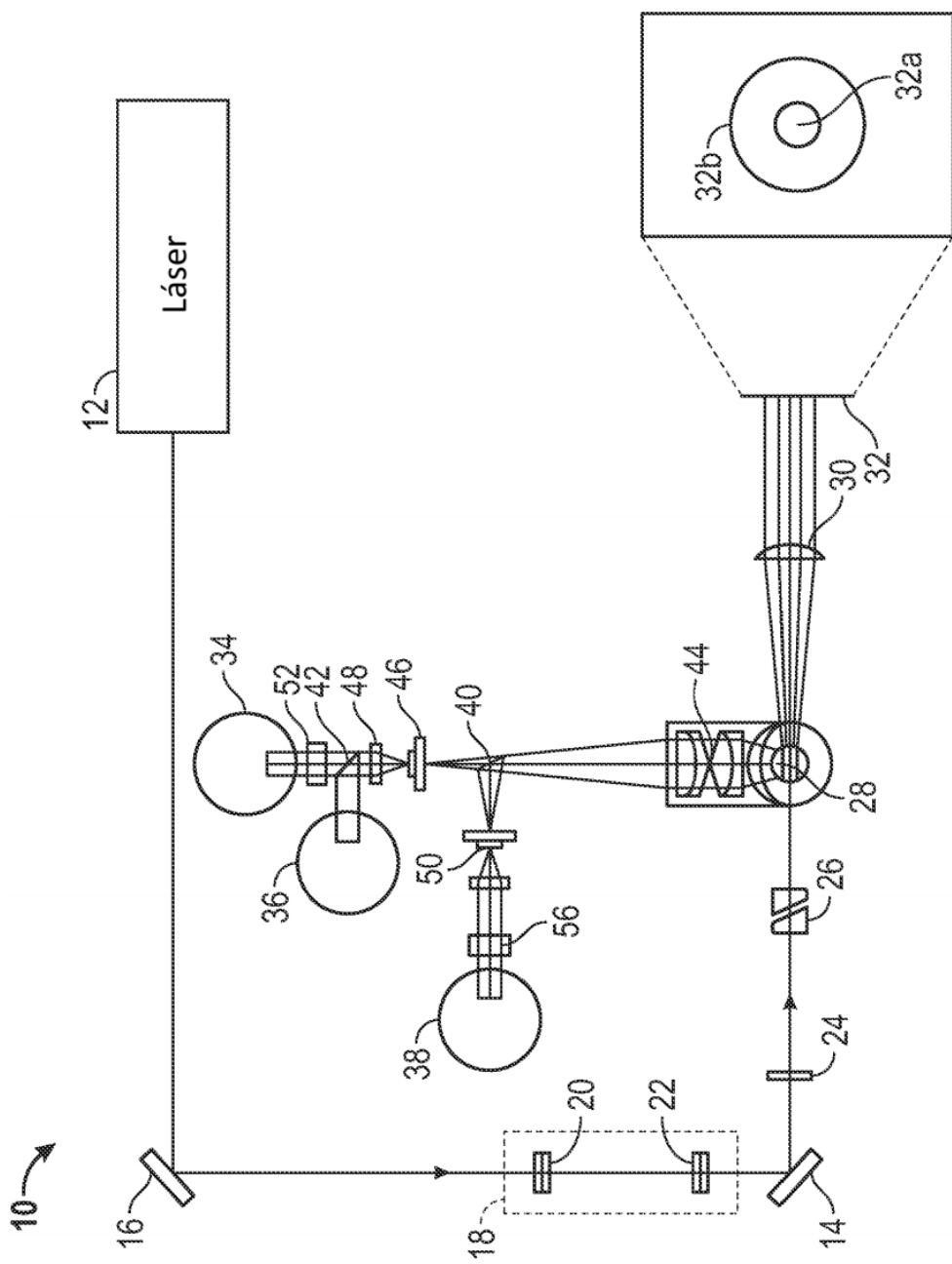


Figura 2

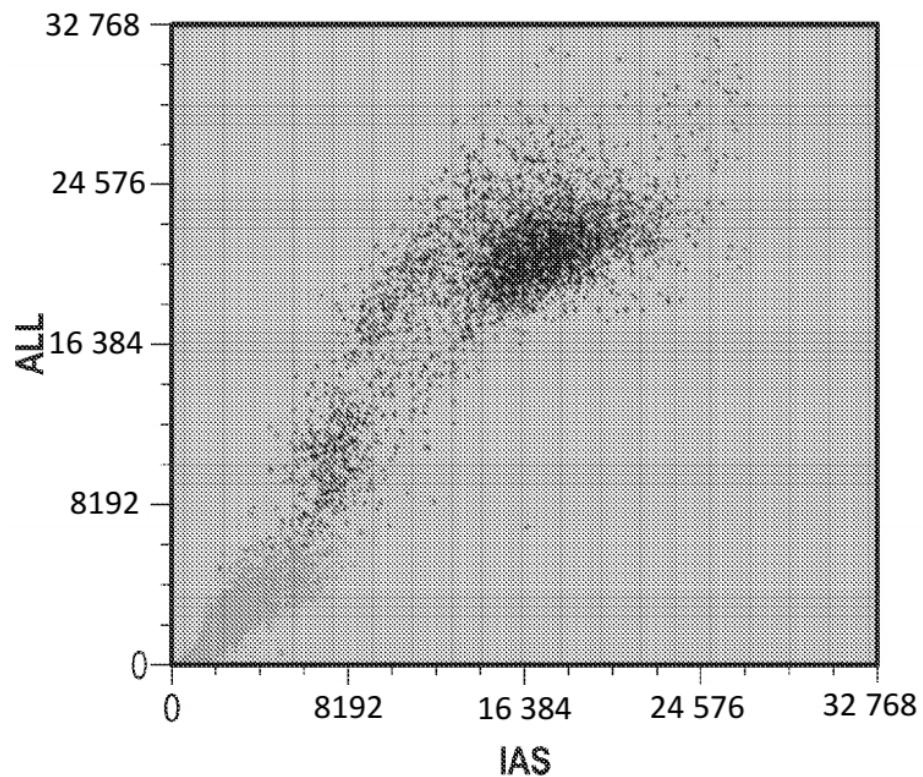


Figura 3A

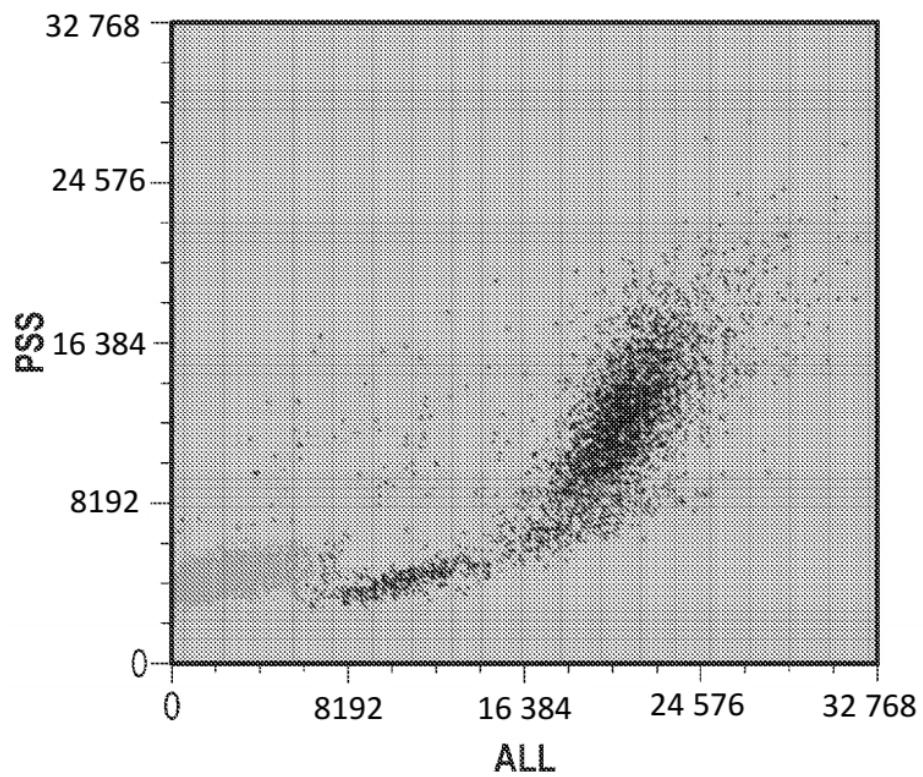


Figura 3B

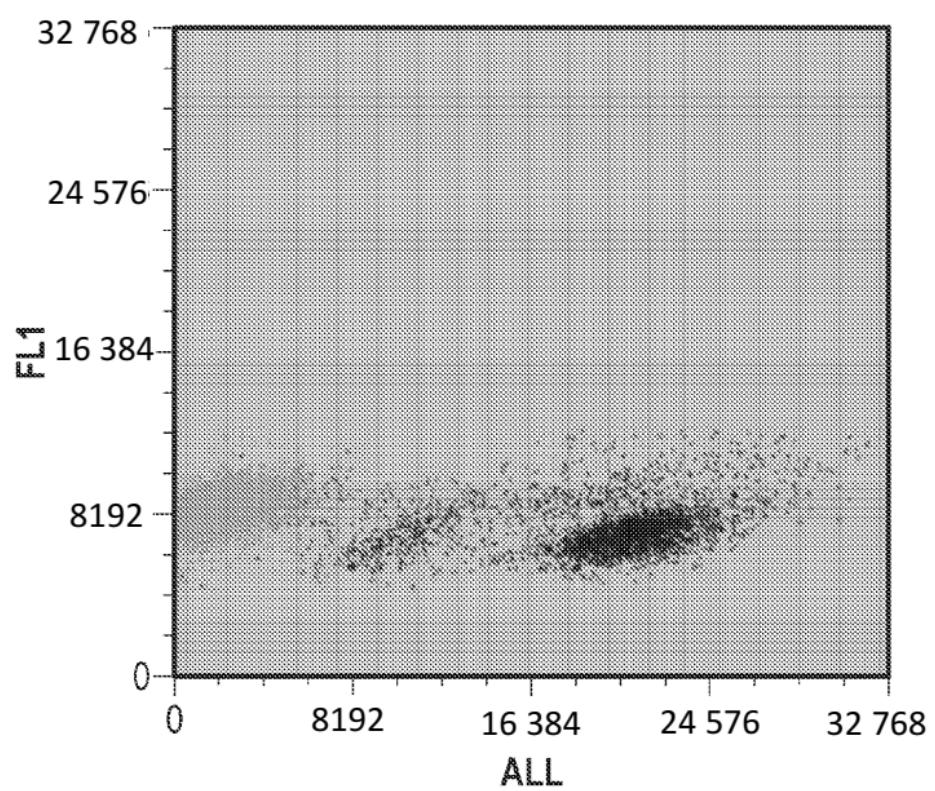
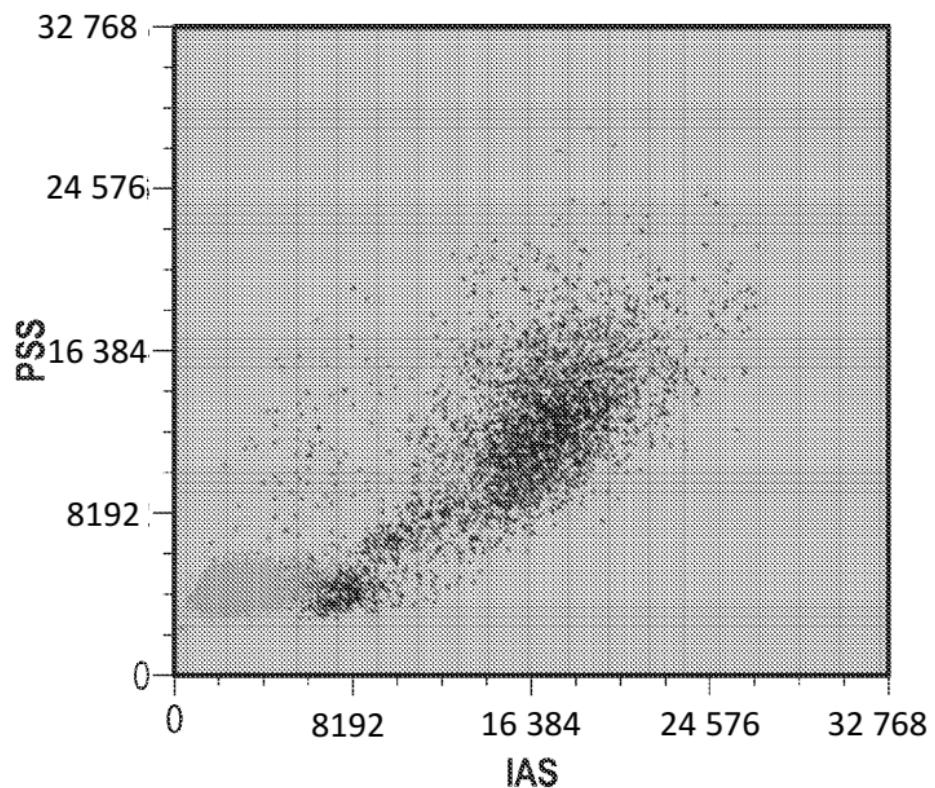


Figura 3D

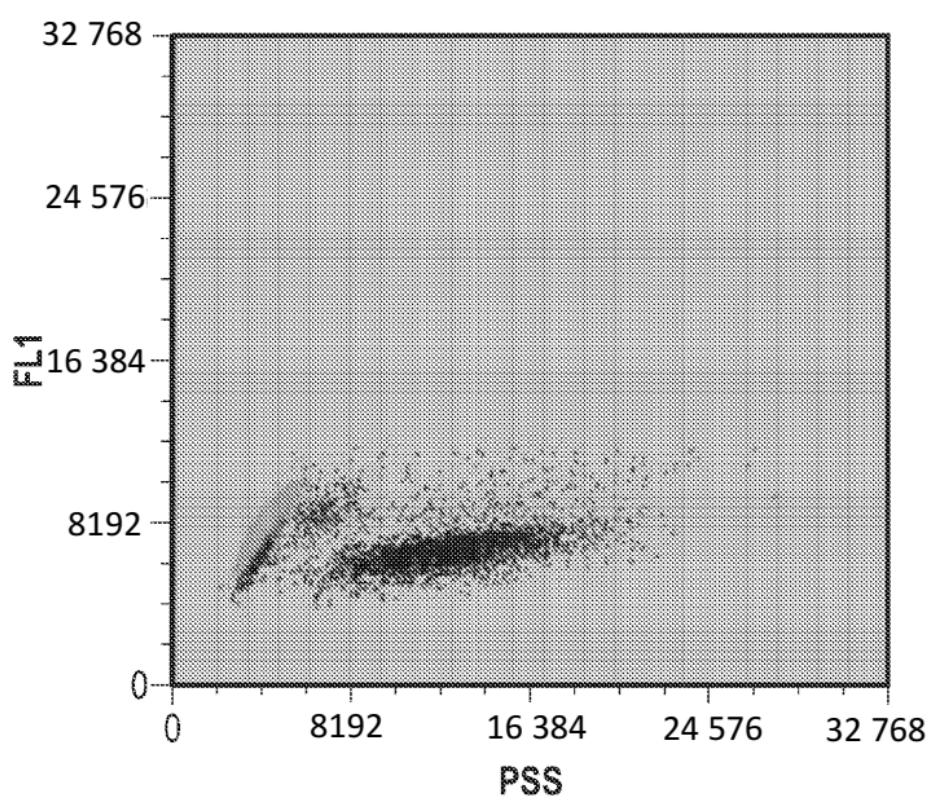
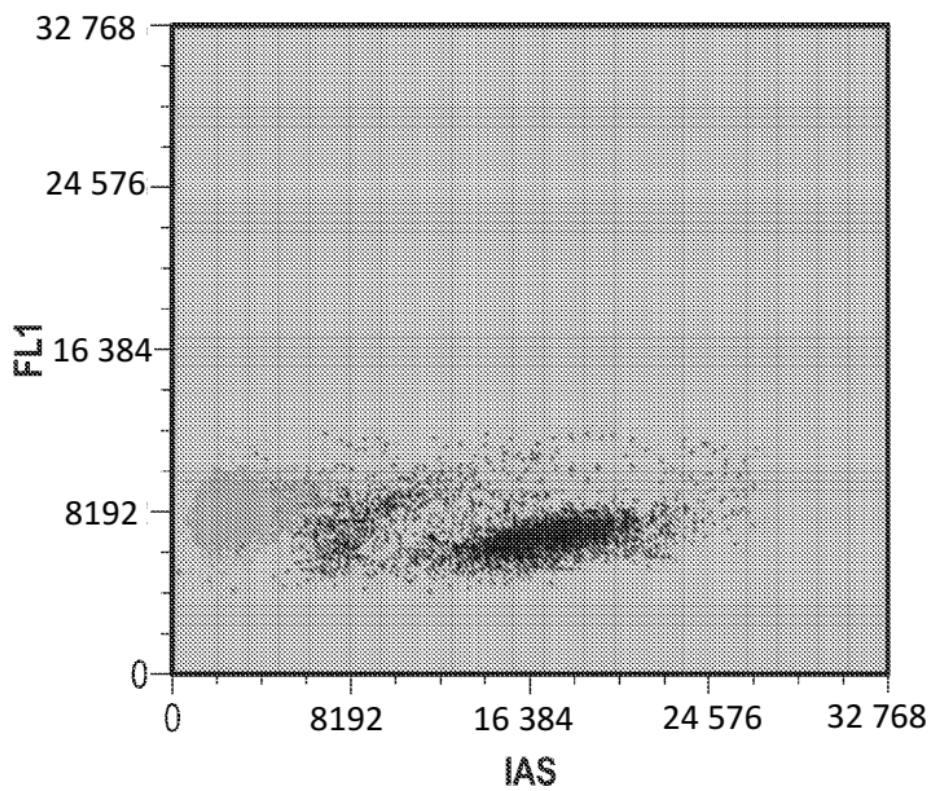


Figura 3F

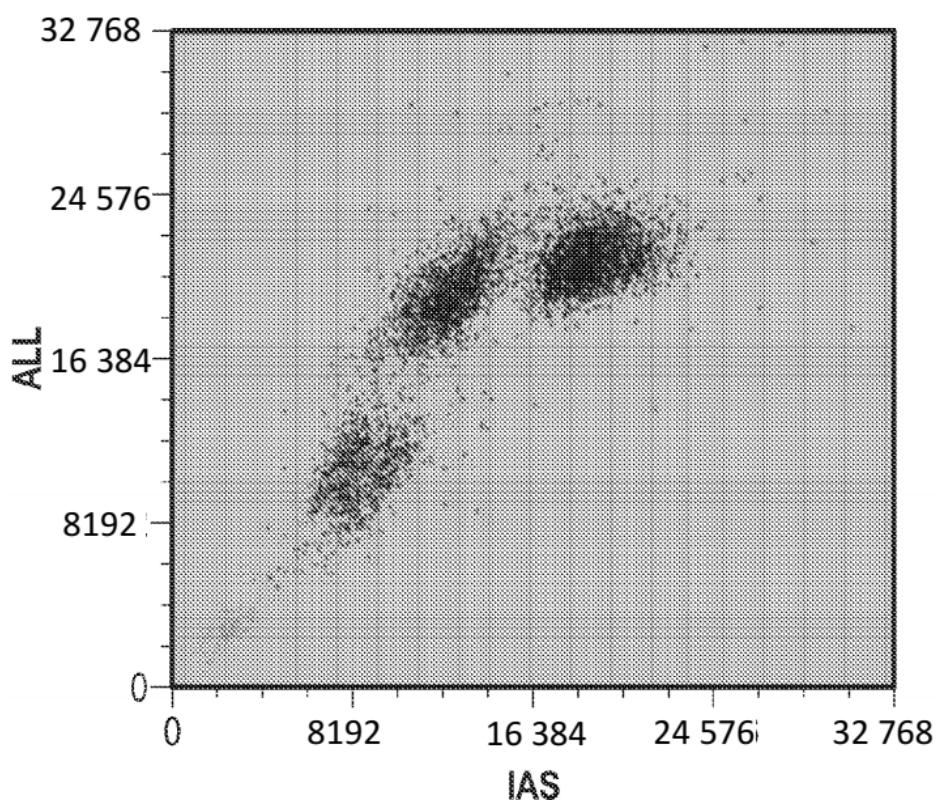


Figura 4A

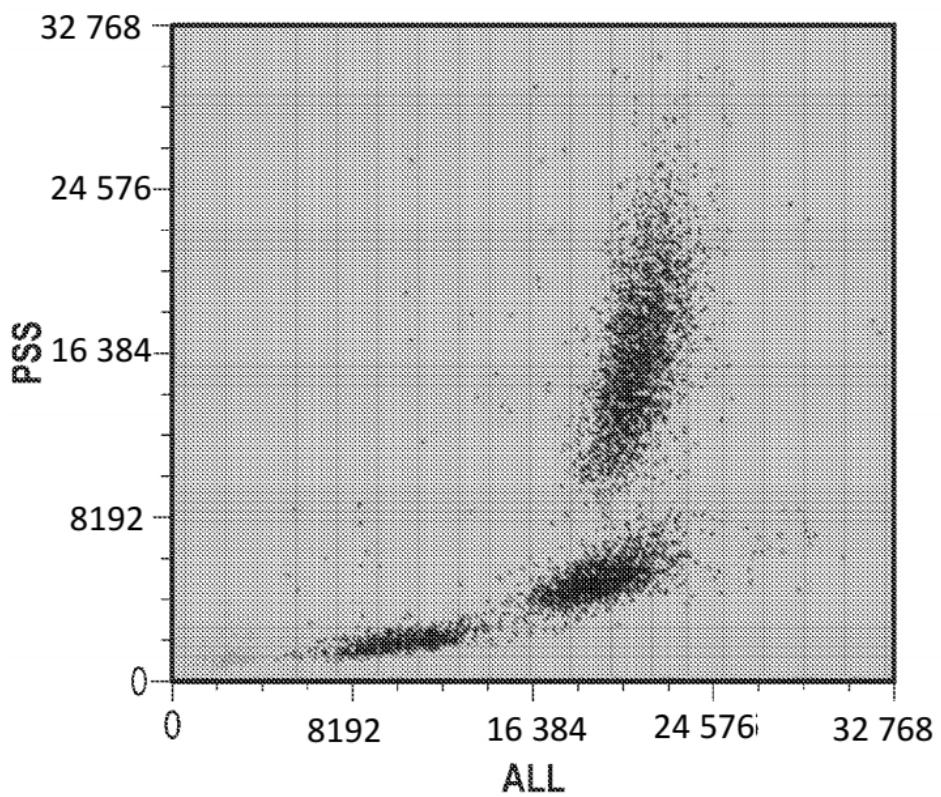
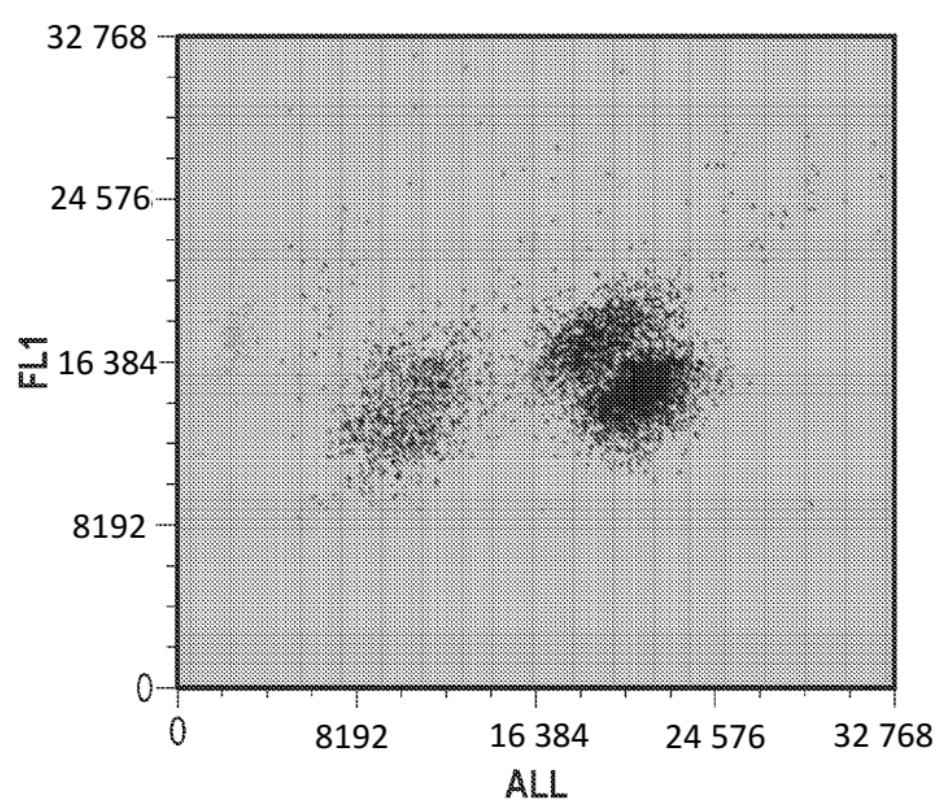
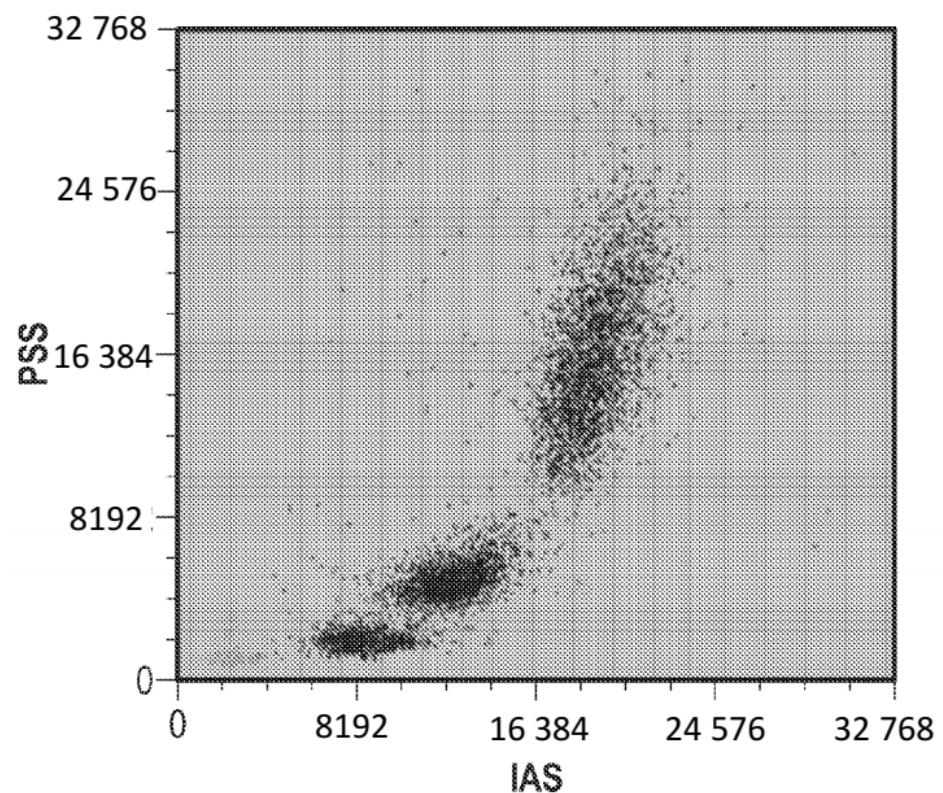


Figura 4B



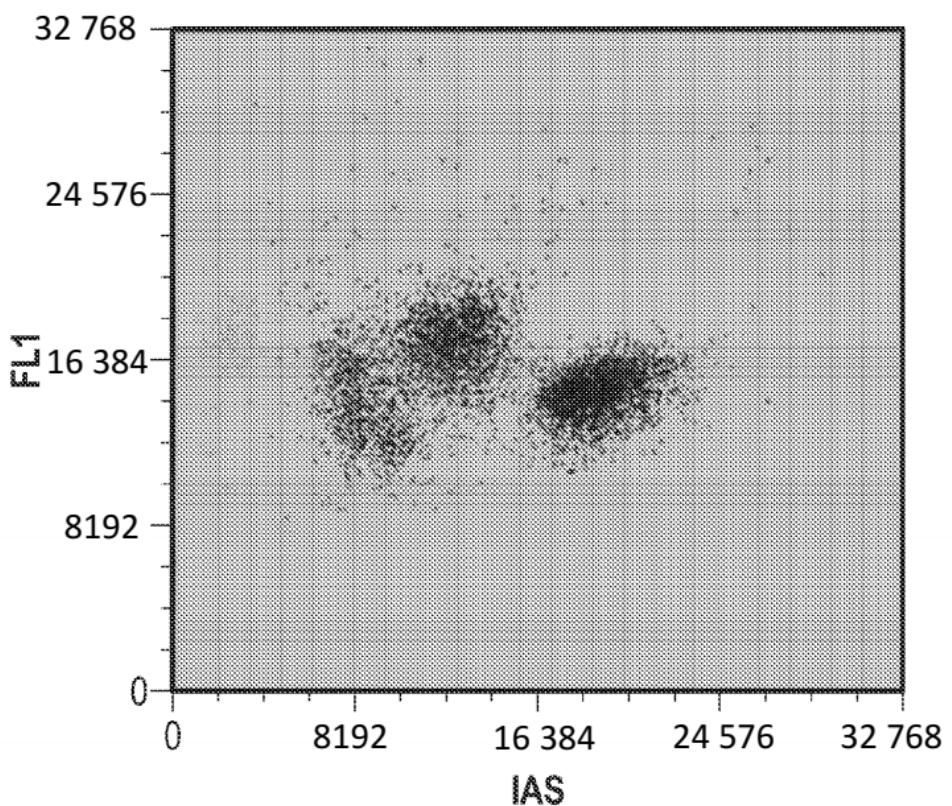


Figura 4E

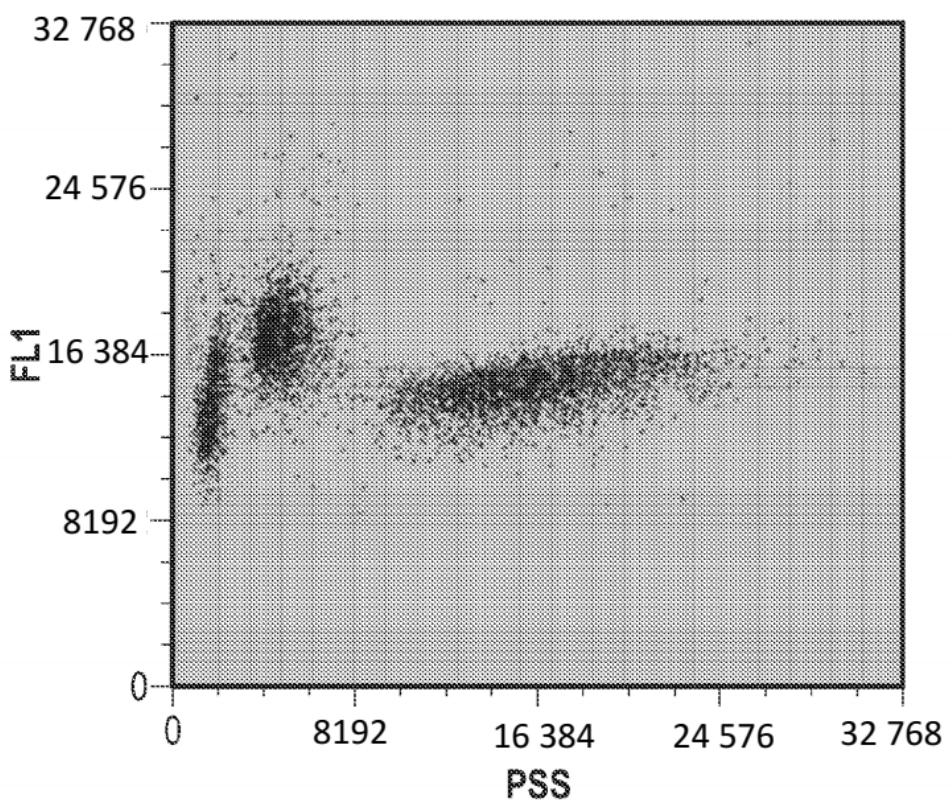
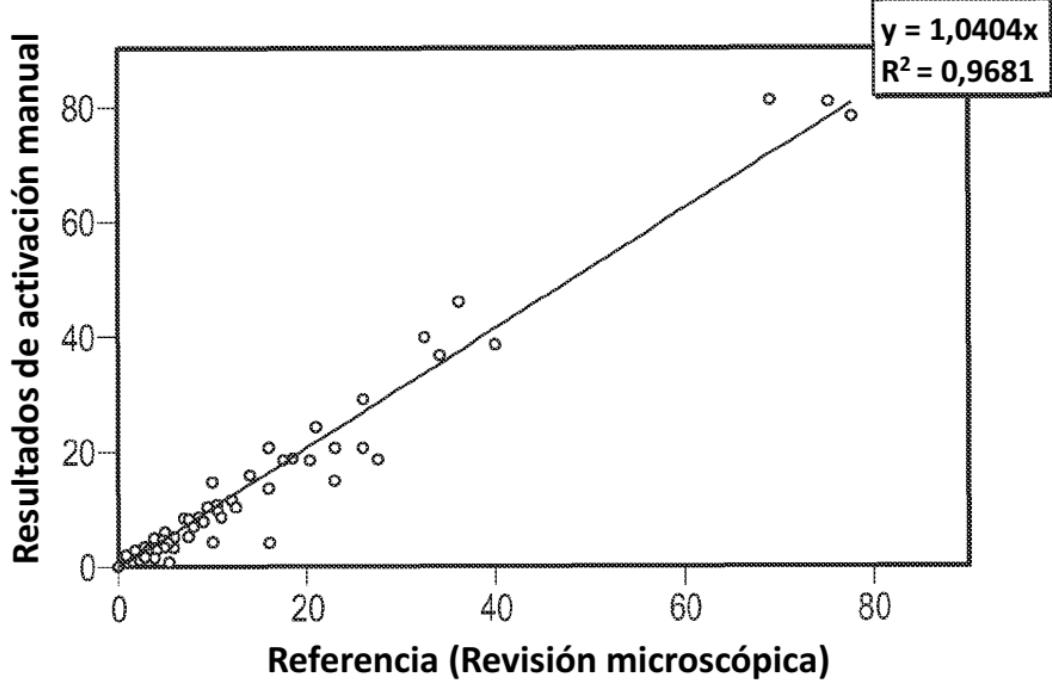
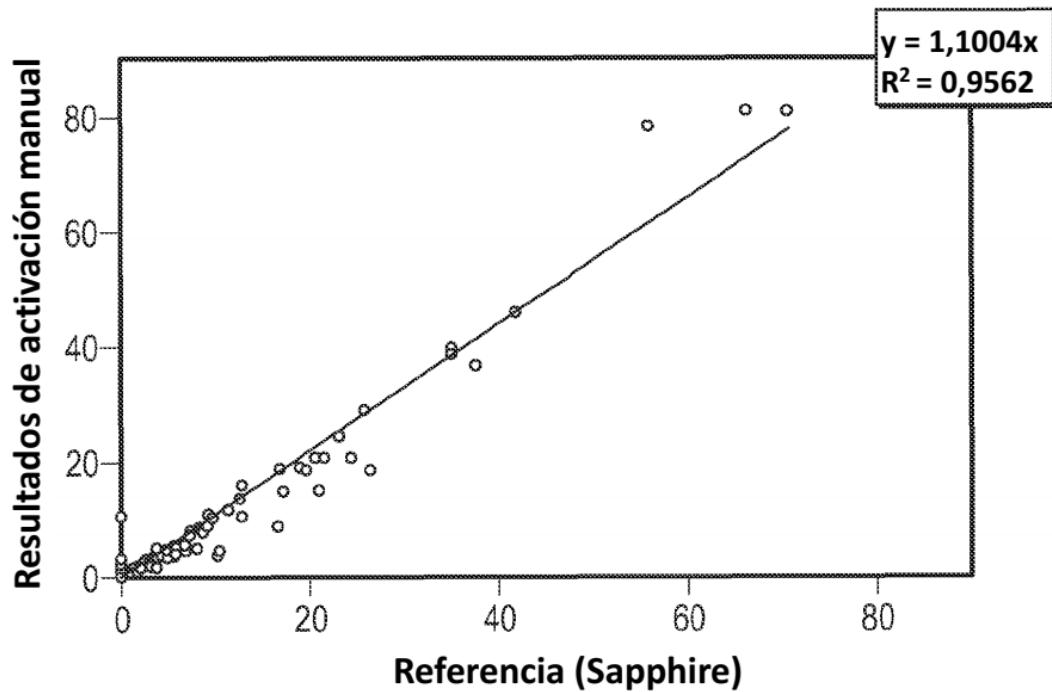
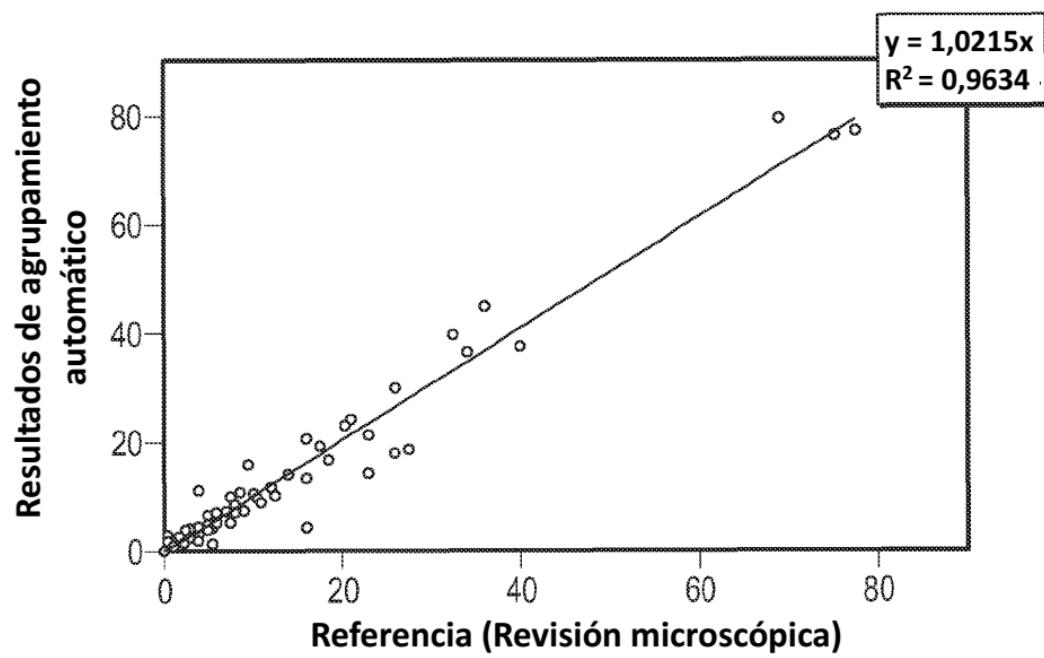
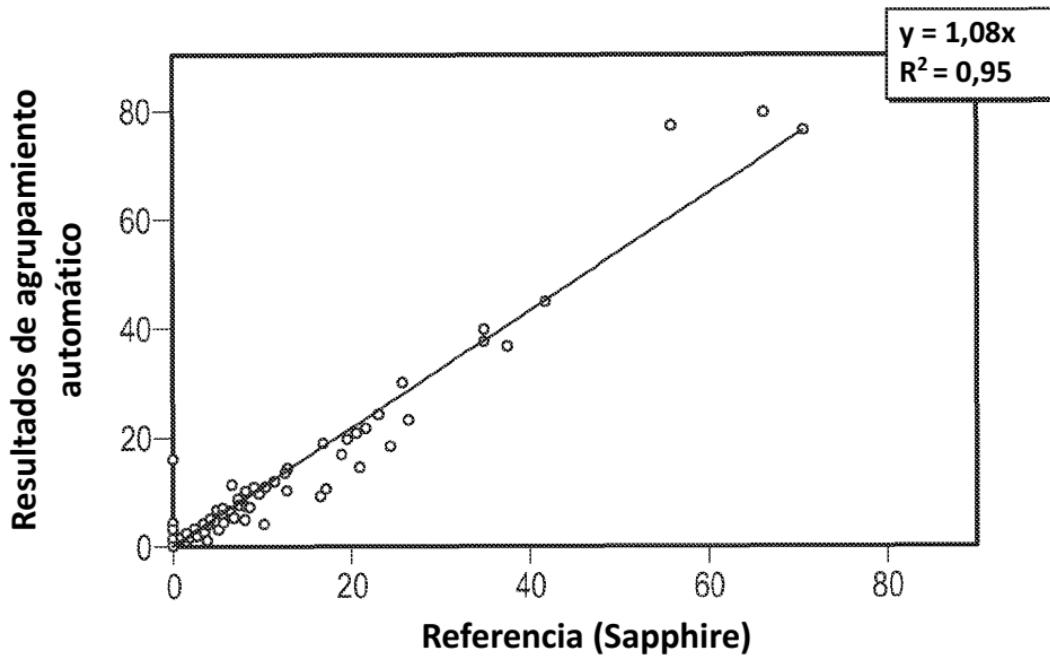


Figura 4F

**Figura 5****Figura 6**

**Figura 7****Figura 8**