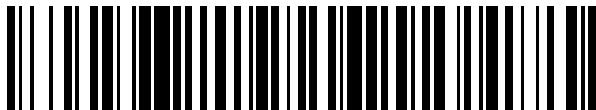


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 927 316**

(51) Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)
G01N 15/10 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2012 PCT/US2012/035158**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2012 WO12151102**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2012 E 12779974 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2022 EP 2705134**

(54) Título: **Sistema y método de análisis de glóbulos blancos**

(30) Prioridad:

04.05.2011 US 201161482541 P

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

04.11.2022

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**WU, JIONG y
VACCA, GIACOMO**

(74) Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 927 316 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

Sistema y método de análisis de glóbulos blancos

5 Antecedentes de la invención

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 blancos (WBC) y subpoblaciones de WBC en una muestra de sangre.

10 El desarrollo de un ensayo de hematología exacto y eficiente para el análisis de WBC, incluido el conteo y la clasificación, ha sido un desafío. Una de las razones de la dificultad para desarrollar un ensayo exacto y eficiente es la concentración relativamente baja de WBC (aproximadamente del 0,1 % al 0,2 %) entre el total de células sanguíneas de una muestra. Los intentos de diseñar métodos avanzados para analizar glóbulos blancos y formular reactivos sólidos para glóbulos blancos siguen siendo una de las principales prioridades en el área de los analizadores de hematología automatizados.

15 Típicamente, se requiere la lisis de los glóbulos rojos (RBC) para eliminar la interferencia de los RBC y concentrar los WBC, antes de contar y clasificar los WBC y las subpoblaciones de WBC. Más específicamente, el análisis WBC exacto y eficiente requiere: (1) lisis completa de los glóbulos rojos en menos de 30 segundos; (2) la ruptura de grandes fragmentos de glóbulos rojos en pedazos más pequeños después de la lisis; y (3) la preservación de WBC para un recuento exacto y una clasificación adecuada. Si la muestra de sangre está "sublisada", los glóbulos rojos no lisados, incluso en concentraciones muy pequeñas, interfieren con el recuento de glóbulos blancos y el análisis diferencial. De manera similar, los fragmentos más grandes de glóbulos rojos lisados pueden interferir con el recuento de glóbulos blancos y el análisis diferencial. En la práctica, es difícil separar los glóbulos rojos sin lisis y/o fragmentos más grandes de glóbulos rojos lisados de los linfocitos (los glóbulos blancos más pequeños). Si la muestra de sangre se "lisa en exceso", la clasificación de los glóbulos blancos puede verse afectada negativamente debido al daño excesivo de las membranas celulares de los glóbulos blancos.

20 30 En algunos casos, la dificultad del análisis de leucocitos puede verse agravada por la presencia de dos tipos especiales de muestras; específicamente, muestras que contienen glóbulos rojos resistentes a la lisis (rstRBC) y muestras que contienen linfocitos frágiles. En el caso de muestras que contienen rstRBC, el recuento de WBC y el porcentaje de linfocitos se informan falsamente como "altos", debido a la contribución de partículas distintas de los linfocitos verdaderos, lo que representa un riesgo de diagnósticos y tratamientos inadecuados para los pacientes. En el caso de muestras que contienen linfocitos frágiles, es posible que los linfocitos dañados no muestren sus características en un análisis diferencial de glóbulos blancos. Además, los núcleos expuestos de glóbulos blancos pueden contarse como glóbulos rojos nucleados (nRBC), lo que da como resultado un recuento falso positivo de nRBC en ciertos ensayos.

35 Breve resumen

40 45 En la presente descripción se proporcionan sistemas y métodos para analizar muestras de sangre y, más específicamente, para realizar un análisis diferencial de glóbulos blancos (WBC). En general, los sistemas y métodos descritos analizan los WBC por medio de tinción de fluorescencia y una estrategia de activación de fluorescencia. Como tal, la interferencia de RBC sin lisis (por ejemplo, rstRBC) y los fragmentos de RBC se eliminan sustancialmente o de manera completa, de esta manera garantiza un recuento y una diferenciación exactos de los WBC y las subpoblaciones de WBC. Los sistemas y métodos también permiten el desarrollo de reactivos WBC relativamente más suaves, adecuados para análisis de muestras que contienen linfocitos frágiles (u otros WBC frágiles), incluidas muestras envejecidas.

50 55 En una modalidad, por ejemplo, los sistemas y métodos descritos en la presente descripción incluyen: (a) teñir una muestra de sangre con un exclusivo colorante fluorescente, permeable a la membrana celular, que corresponde en espectro de emisión a una fuente de excitación de un instrumento de hematología; (b) mediante el uso de un activador de fluorescencia para examinar la muestra de sangre en busca de glóbulos blancos; y (c) mediante el uso de una combinación de mediciones de (1) pérdida de luz axial, (2) dispersión de ángulo intermedio, (3) dispersión de luz polarizada de 90°, (4) dispersión lateral despolarizada de 90° y (5) emisión de fluorescencia para realizar un análisis diferencial.

Breve descripción de las figuras

60 65 Los dibujos adjuntos, que se incorporan en la presente descripción, forman parte de la memoria descriptiva. Junto con esta descripción escrita, los dibujos sirven además para explicar los principios y permitir a una persona experta en la(s) técnica(s) relevante(s) fabricar y usar los sistemas y métodos presentados. En los dibujos acompañantes, los cuales ilustran una o más modalidades ilustrativas, los números de referencia similares indican elementos idénticos o funcionalmente similares.

- Las figuras 1A-1E muestran histogramas de una muestra de sangre completa, que muestran glóbulos blancos y residuos de glóbulos rojos después de la lisis.
- 5 La figura 1A es un histograma que muestra la medición de una señal de pérdida de luz axial.
- La figura 1B es un histograma que muestra la medición de la dispersión de ángulo intermedio.
- La figura 1C es un histograma que muestra la medición de la dispersión de luz polarizada a 90°.
- La figura 1D es un histograma que muestra la medición de la dispersión lateral despolarizada a 90°.
- La figura 1E es un histograma que muestra la medición de la fluorescencia.
- 10 La figura 2 es un citograma que muestra el uso de un activador de fluorescencia para eliminar cualquier fragmento de RBC de la consideración.
- La figura 3 es otro citograma que muestra el uso de un activador de fluorescencia para eliminar cualquier fragmento de RBC de la consideración.
- La figura 4 es un diagrama esquemático que ilustra un instrumento de hematología.
- 15 Las figuras 5A-5J muestran citogramas de un análisis diferencial de WBC de cinco partes.
- La figura 5A es un citograma que representa la pérdida de luz axial frente a la dispersión de ángulo intermedio.
- La figura 5B es un citograma que representa la dispersión de luz polarizada a 90° frente a la pérdida de luz axial.
- La figura 5C es un citograma que representa una dispersión de luz polarizada de 90° frente a una dispersión de ángulo intermedio.
- La figura 5D es un citograma que representa la dispersión lateral despolarizada de 90° frente a la pérdida de luz axial.
- 20 La figura 5E es un citograma que representa una dispersión lateral despolarizada de 90° frente a una dispersión de ángulo intermedio.
- La figura 5F es un citograma que representa una dispersión lateral despolarizada de 90° frente a una dispersión de luz polarizada de 90°.
- La figura 5G es un citograma que representa la fluorescencia frente a la pérdida de luz axial.
- 25 La figura 5H es un citograma que representa fluorescencia frente a dispersión de ángulo intermedio.
- La figura 5I es un citograma que representa fluorescencia frente a dispersión de luz polarizada a 90°.
- La figura 5J es un citograma que representa la fluorescencia frente a la dispersión de luz despolarizada a 90°.
- 30 La figura 6A es un citograma que ilustra el análisis de una muestra de sangre completa que contiene glóbulos rojos resistentes a la lisis, mediante el uso de un método tradicional.
- La figura 6B es un citograma que muestra la pérdida de luz axial frente a la dispersión de ángulo intermedio realizado por un analizador hematológico activado por fluorescencia, de acuerdo con una modalidad presentada.
- La figura 7A es un citograma que ilustra el análisis de una muestra envejecida de sangre completa, mediante el uso de un método tradicional.
- 35 La figura 7B es un citograma que muestra la pérdida de luz axial frente a la dispersión de ángulo intermedio realizado por un analizador hematológico activado por fluorescencia, de acuerdo con una modalidad presentada.

Descripción detallada

- 40 En la presente descripción se proporcionan sistemas y métodos para analizar muestras de sangre y, más específicamente, para realizar un análisis diferencial de glóbulos blancos (WBC) para identificar, clasificar y contar WBC y subpoblaciones de WBC. En general, los sistemas y métodos descritos analizan los WBC por medio de tinción de fluorescencia y una estrategia de activación de fluorescencia. Como tal, se elimina sustancialmente la interferencia de los glóbulos rojos (RBC) no lisados, tales como los glóbulos rojos resistentes a la lisis (rstRBC) y los fragmentos de RBC. Los sistemas y métodos descritos garantizan de esta manera recuento y una diferenciación exactos de WBC y subpoblaciones de WBC. Los sistemas y métodos también permiten el desarrollo de reactivos WBC relativamente más suaves, adecuados para análisis de muestras que contienen linfocitos frágiles (u otros WBC frágiles), incluidas muestras envejecidas.
- 50 En una modalidad, por ejemplo, los sistemas y métodos descritos en la presente descripción incluyen: (a) teñir una muestra de sangre con un exclusivo colorante fluorescente, permeable a la membrana celular, que corresponde en espectro de emisión a una fuente de excitación de un instrumento de hematología; (b) mediante el uso de un activador de fluorescencia para examinar la muestra de sangre en busca de WBC; y (c) mediante el uso de una combinación de mediciones de (1) pérdida de luz axial, (2) dispersión de ángulo intermedio, (3) dispersión de luz polarizada de 90°, (4) dispersión de luz despolarizada de 90° y (5) emisión de fluorescencia para realizar un análisis diferencial de WBC.
- 55 Tal como se usa en la presente descripción, la expresión "información de fluorescencia" significa datos recopilados de un canal de fluorescencia de un analizador hematológico. Como se usa en la presente descripción, la expresión "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.
- 60 (1) Uso de colorante fluorescente(s).
- Los WBC contienen una concentración relativamente alta de ADN en sus núcleos. Los RBC maduros, sin embargo, 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 cambio de Stokes adecuado cuando el colorante se excita por una fuente de luz apropiada. La absorción máxima del colorante en la banda visible coincide sustancialmente con la longitud de onda de la fuente de luz (dentro de los 50 nm de la longitud de onda de la fuente de luz, con mayor preferencia, dentro de los 25 nm de la longitud de onda de la fuente de luz), para ser correctamente excitar el colorante y lograr resultados óptimos.

El colorante fluorescente seleccionado es preferentemente: 1) capaz de unirse a ácidos nucleicos, 2) capaz de penetrar las membranas celulares de los WBC, 3) excitado a una longitud de onda seleccionada cuando se somete a una fuente de luz, 4) emite fluorescencia al ser excitado por la fuente de luz, y 5) es bioestable y soluble en un líquido.

El colorante puede seleccionarse del grupo que consiste de: naranja de acridina, SYBR 11, colorantes 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 sus equivalentes. El colorante se usa para "activar" los WBC y "descartar" los RBC no lisados y los fragmentos de RBC en función de un activador de fluorescencia configurado en el analizador hematológico. El colorante está típicamente presente en una concentración de aproximadamente 0,1 ng/mL a aproximadamente 0,1 mg/mL. Si bien hay varios colorantes disponibles, el colorante seleccionado generalmente se combina con la fuente de excitación del analizador hematológico de manera que se usa un único colorante exclusivo para teñir y excitar la emisión de fluorescencia en todas las subpoblaciones de WBC que se pretende identificar, cuantificar y/o analizar. Como tal, puede usarse un solo colorante (es decir, exclusivo) para identificar, cuantificar y analizar todas las subpoblaciones de WBC a la vez.

En una modalidad, se proporciona un colorante fluorescente en un reactivo de WBC, 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 la tinción y activación hasta 1000×10^3 WBC por microlitro. El al menos un surfactante, tal 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 típicamente presente en una concentración de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 5 %. El al menos un agente antimicrobiano, tal como los de las familias "TRIADINE" o "PROCLIN", se usa para evitar la contaminación del reactivo por microbios. La concentración del al menos un agente antimicrobiano es suficiente para conservar el reactivo durante la vida útil requerida. El al menos un tampón, tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS) o ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES), se usa para ajustar el pH de la mezcla de reacción para controlar la lisis de los RBC y preservar los WBC. El al menos un tampón está típicamente presente en una concentración de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 3 %. El pH típicamente oscila de aproximadamente 3 a aproximadamente 12. La al menos una sal, tal como NaCl o Na₂SO₄, se usa para ajustar la osmolalidad para aumentar el efecto de lisis y/o 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 más baja o hipotonía para acelerar la lisis de los RBC. La osmolalidad oscila típicamente de aproximadamente 20 a aproximadamente 250 mOsm.

Puede hacerse que la lisis de los RBC se produzca a una temperatura superior a la temperatura ambiente (por ejemplo, entre aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C, tal como unos 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 de WBC en una relación de aproximadamente una parte por volumen de muestra a aproximadamente 35 partes por volumen de reactivo de WBC. Los datos para el análisis se recogen con una pluralidad de canales ópticos y al menos un canal de fluorescencia.

Las figuras 1A-E muestran la separación de glóbulos blancos verdaderos de glóbulos rojos no lisados y fragmentos de glóbulos rojos, en histogramas de información óptica recopilada y un histograma de información de fluorescencia. El histograma de la figura 1A muestra una medición de la pérdida de luz axial (ALL). El histograma de la figura 1B muestra una medición de dispersión de ángulo intermedio (IAS). El histograma de la figura 1C muestra una medición de dispersión de luz polarizada (PSS) de 90°. El histograma de la figura 1D muestra una medición de dispersión lateral despolarizada (DSS) de 90°. El histograma de la figura 1E muestra una medición de fluorescencia (FL1). En los histogramas, el eje horizontal indica el valor del canal de detección (o los nombres de los canales, es decir, TODOS, IAS, PSS, DSS o FL1). El eje vertical indica recuentos de componentes de la muestra de sangre. En los histogramas, las líneas 100 indican residuos de RBC y las líneas 200 indican WBC. Como se usa en la presente descripción, "residuos de glóbulos rojos" es sinónimo de "fragmentos de glóbulos rojos". Como se muestra comparando la figura 1E a las figuras 1A-1D, la información de fluorescencia muestra una separación mucho mejor entre los dos grupos de partículas (es decir, glóbulos blancos y residuos de glóbulos rojos) que cualquiera de los canales ópticos, de esta manera facilita el siguiente análisis.

(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 de 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 de 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 glóbulos rojos nucleados (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 sin lisar o los fragmentos de RBC no emiten fluorescencia, aunque pueden emitir una autofluorescencia muy débil. Como se muestra con referencia a la figura IE, las células que emiten señales de fluorescencia mucho más fuertes son las células que tienen núcleos, específicamente, WBC (y nRBC cuando están presentes).

Como tal, los sistemas y métodos que se presentan en la presente descripción usan un activador de fluorescencia para recolectar y analizar WBC. Por ejemplo, un activador de fluorescencia, generalmente establecido entre las señales de los glóbulos rojos y las señales de los WBC, puede usarse para recopilar señales de los WBC por separado para un análisis más detallado. Dos ejemplos de uso de un activador FL1 se muestran en la figura 2 y la figura 3. La Figura 2 es un citograma que muestra el uso de un activador de fluorescencia para eliminar cualquier fragmento de RBC (partículas libres de núcleos) y recolectar eventos que contienen núcleos (por ejemplo, WBC y/o nRBC). El colorante fluorescente era naranja de acridina y la concentración del colorante fluorescente era de 3 µg/mL. La tensión del tubo fotomultiplicador fluorescente se fijó en 350 voltios. La Figura 3 es un citograma que muestra el uso de un activador de fluorescencia para eliminar cualquier fragmento de RBC (partículas libres de núcleos) y recolectar eventos que contienen núcleos (por ejemplo, WBC y/o nRBC). El colorante fluorescente era naranja de acridina y la concentración del colorante fluorescente era de 0,03 µg/ml. La tensión del tubo fotomultiplicador fluorescente se fijó en 500 voltios. En un ensayo de leucocitos que usa tinción con naranja de acridina (incluso con concentraciones drásticamente diferentes de los colorantes, es decir, 3 µg/mL en la figura 2 y 0,03 µg/mL en la figura 3) y un activador FL1 correctamente configurado, solo los eventos por encima del activador FL1 son eventos que contienen núcleos (por ejemplo, WBC y/o nRBC, si están presentes) y, en consecuencia, se capturan para su posterior análisis.

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

En una modalidad, se realiza un análisis diferencial de WBC por medio de la tecnología de Separación por Dispersión Polarizada de Ángulos Múltiples (MAPSS), con mejora opcional 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 usan dos o más fotodiodos para medir TODAS las señales, que miden una dispersión de aproximadamente 0°, y señales IAS, que miden una dispersión de ángulo bajo (por ejemplo, de aproximadamente 3° a aproximadamente 15°). Se usan dos o más tubos fotomultiplicadores para detectar señales PSS de 90° y señales DSS de 90°. 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, tal 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 4 es un diagrama esquemático que ilustra la iluminación y la óptica de detección de un aparato adecuado para el análisis de hematología (incluida la citometría de flujo). Con referencia ahora a la figura 4, un aparato comprende una fuente de luz 12, un espejo frontal 14 y un espejo trasero 16 para doblar 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, una fina ajustador de haz 26, una celda de flujo 28, una lente de dispersión frontal 30, un detector de ojo de buey 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, pueden usarse otras fuentes de luz, tal como, por ejemplo, lámparas (por ejemplo, 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 usan actualmente con los analizadores de hematología automatizados "CELL-DYN".

Puede encontrar detalles adicionales relacionados con 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, incorporada en la presente descripción como referencia, particularmente en la columna 41, línea 32 a la columna 43, línea 11. El sistema de trayectoria óptica de avance mostrado en la Figura 4 incluye una lente esférica plano-convexa 30 y un fotodiodo detector 32 de dos elementos ubicado en el plano focal posterior de la lente. En esta configuración, cada punto dentro del detector de fotodiodo de dos elementos 32 se asigna a un ángulo de recogida específico de luz de las células que se mueven a través de la célula de flujo 28. El detector 32 puede ser un detector de 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 a 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 de luz polarizada (PSS), y el tercer tubo fotomultiplicador 38 (PMT3) mide la emisión de fluorescencia de 440 nm a 680 nm, dependiendo del colorante fluorescente seleccionado y la fuente de luz empleada. El tubo fotomultiplicador recoge señales fluorescentes en un amplio intervalo de longitudes de onda para aumentar la resistencia de la señal. Las emisiones de dispersión lateral y fluorescentes se dirigen a estos tubos fotomultiplicadores mediante divisores de haz dicroicos 40 y 42, que transmiten y reflejan de manera eficiente en las longitudes de onda requeridas para permitir una detección eficiente. La patente de Estados Unidos núm. 5,631,165 describe varios detalles adicionales relacionados con los tubos fotomultiplicadores en la columna 43, línea 53 hasta la columna 44, línea 4.
- La sensibilidad aumenta en los tubos fotomultiplicadores 34, 36 y 38, cuando se mide la fluorescencia, mediante el uso de un sistema de recolección por inmersión. El sistema de recolección 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, permitiendo la recolección 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 mostrados en la Figura 4, es decir, una rendija 46, una lente de campo 48 y una segunda rendija 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.
- 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).
- Las figuras 5A-J muestran un ejemplo de un análisis diferencial de WBC de cinco partes mejorado. Neutrófilos (NE), linfocitos (LY), monocitos (MO), eosinófilos (EO) y basófilos (BA) se separaron mediante el uso de tecnología MAPSS y un canal FL1. El citograma de la figura 5A muestra ALL frente a IAS. El citograma de la figura 5B muestra 90° PSS frente a ALL. El citograma de la figura 5C muestra 90° PSS frente a IAS. El citograma de la figura 5D muestra DSS de 90° frente a ALL. El citograma de la figura 5E muestra DSS de 90° frente a IAS. El citograma de la figura 5F muestra 90° DSS frente a 90° PSS. El citograma de la figura 5G muestra FL1 frente a ALL. El citograma de la figura 5H muestra FL1 frente a IAS. El citograma de la figura 5I muestra FL1 frente a 90° PSS. El citograma de la figura 5J muestra FL1 frente a 90° DSS.
- Además de la información recopilada de los cuatro canales MAPSS tradicionales (ALL, IAS, PSS, DSS), el canal FL1 distingue aún más las subpoblaciones de células (Figura 5G a 5J, inclusive). Para el caso en el que se usa naranja de acridina como colorante para la detección de WBC, los basófilos muestran señales de FL1 relativamente bajas y los monocitos muestran señales de FL1 relativamente altas, con relación a otras subpoblaciones de WBC, es decir, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos. En los citogramas, los puntos 510 representan neutrófilos, los puntos 520 representan eosinófilos, los puntos 530 representan linfocitos, los puntos 540 representan basófilos y los puntos 550 representan monocitos. La información cuantitativa combinada de todas las dimensiones ópticas y la dimensión de fluorescencia proporciona un análisis diferencial mejorado y más confiable para muestras de sangre que contienen WBC.
- La figura 6A es un citograma que ilustra el análisis de una muestra de sangre completa que contiene ristRBC, mediante el uso de un método tradicional. La Figura 6A muestra un citograma de ALL frente a IAS, mediante el uso de un analizador hematológico "CELL-DYN™ Sapphire" disponible comercialmente. La Figura 6B es un citograma que muestra ALL frente a IAS, mediante el uso de un analizador hematológico mejorado con activador FL1. La muestra de sangre completa fue la misma que la analizada en la figura 6A. La concentración del colorante fluorescente, naranja de acridina, fue de 3 µg/mL. Los resultados muestran que el método descrito en la presente descripción es exacto y eficiente para los dos casos más desafiantes mencionados anteriormente. En el método tradicional, los glóbulos rojos no lisados, es decir, los eventos que aparecen en la parte inferior izquierda del citograma, se reconocieron como linfocitos, de esta manera resultó en un mayor recuento de glóbulos blancos y un mayor porcentaje de linfocitos. La Figura 6B muestra los resultados de un análisis de WBC de la muestra que contiene ristRBC por el método descrito en la presente descripción. En el método descrito en la presente descripción, el análisis de los glóbulos blancos fue exacto porque no se reconocieron glóbulos rojos ni residuos de glóbulos rojos.
- La figura 7A es un citograma que ilustra el análisis de una muestra envejecida (28 horas) de sangre completa, que contiene glóbulos blancos más frágiles, mediante el uso de un método tradicional. La Figura 7A es un citograma que

muestra ALL frente a IAS, mediante el uso de un analizador hematológico "CELL-DYN" Sapphire™. La Figura 7B es un citograma que muestra ALL frente a IAS, mediante el uso de un analizador hematológico mejorado con activador FL 1. La muestra de sangre completa fue la misma que la analizada en la figura 7A. La concentración del colorante fluorescente, naranja de acridina, fue de 3 µg/mL.

- 5 Los métodos descritos en la presente descripción mejoran el análisis de WBC para analizadores hematológicos. Los métodos descritos en la presente descripción proporcionan un recuento de WBC más exacto y una clasificación más exacta de las subpoblaciones de WBC, porque la interferencia de los RBC sin lizar y los fragmentos de RBC se elimina sustancialmente. El uso de fluorescencia proporciona más información para mejorar el análisis diferencial de los WBC.
- 10 10 Los métodos descritos en la presente descripción muestran ventajas sobre los métodos tradicionales cuando se analizan muestras que tienen RstRBC y muestras que tienen WBC frágiles.

Modalidades adicionales

- 15 15 En una modalidad, se proporciona un analizador hematológico para realizar un análisis diferencial de leucocitos en una muestra de sangre que se ha teñido con un colorante fluorescente. El analizador comprende una fuente de excitación colocada para excitar partículas dentro de la muestra de sangre. El analizador comprende además una pluralidad de detectores que incluye: (1) un detector de pérdida de luz axial colocado para medir la pérdida de luz axial de la muestra de sangre excitada, (2) un detector de dispersión de ángulo intermedio colocado para medir la dispersión de ángulo intermedio de la muestra de sangre excitada, (3) un detector de dispersión de luz polarizada colocado para medir la dispersión de luz polarizada de 90° de la muestra de sangre excitada, (4) un detector de dispersión lateral despolarizada colocado para medir la dispersión lateral despolarizada de 90° de la muestra de sangre excitada y (5) un detector de fluorescencia colocado para medir la fluorescencia emitida por la muestra de sangre excitada. El analizador comprende además un procesador configurado para recibir la medición de (1) pérdida de luz axial, (2) dispersión de ángulo intermedio, (3) dispersión de luz polarizada de 90°, (4) dispersión lateral despolarizada de 90° y (5) fluorescencia de la pluralidad de detectores. El procesador también está configurado para realizar un análisis diferencial de WBC de la muestra de sangre, basado en las cinco mediciones, para partículas que emiten fluorescencia por encima de un umbral de fluorescencia. El procesador puede configurarse además para preseleccionar las mediciones recibidas para eliminar cualquier partícula que no alcance el umbral de fluorescencia. El detector de pérdida de luz axial puede medir la pérdida de luz axial con una dispersión de 0°. El detector de dispersión de ángulo intermedio puede medir la dispersión de ángulo de luz de aproximadamente 3° a aproximadamente 15°. La pluralidad de detectores puede incluir uno o más tubos fotomultiplicadores. La fuente de excitación puede ser un láser configurado para emitir luz a una longitud de onda correspondiente al colorante fluorescente. Alternativamente, el colorante fluorescente puede seleccionarse para que se corresponda con la fuente de excitación. El colorante fluorescente puede ser permeable a la membrana celular y unirse al ácido nucleico.

35 35 El analizador hematológico puede comprender además un subsistema de incubación para diluir la muestra de sangre con un reactivo de WBC. El reactivo de WBC puede incluir el colorante fluorescente y uno o más agentes de lisis. Alternativamente, el reactivo de WBC puede incluir (a) al menos un surfactante, (b) al menos un tampón o al menos una sal, (c) al menos un agente antimicrobiano y (d) el colorante fluorescente. El subsistema de incubación puede configurarse para incubar la muestra de sangre con el reactivo de WBC durante un período de tiempo de menos de aproximadamente 25 segundos, menos de aproximadamente 17 segundos o menos de aproximadamente 9 segundos. El subsistema de incubación se configura para incubar la muestra de sangre con el reactivo de WBC a una temperatura que varía de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C, por ejemplo, tal como aproximadamente 40 °C.

- 45 45 En otra modalidad, se proporciona un método para configurar un analizador hematológico para realizar un análisis diferencial de leucocitos en una muestra de sangre que se ha teñido con un colorante fluorescente. El método incluye colocar una fuente de excitación para excitar partículas dentro de la muestra de sangre. El método incluye además colocar una pluralidad de detectores para medir (1) pérdida de luz axial, (2) dispersión de ángulo intermedio, (3) dispersión de luz polarizada de 90°, (4) dispersión lateral despolarizada de 90° y (5) fluorescencia de la muestra de sangre excitada. El método comprende además configurar un procesador configurado para recibir las mediciones de (1) pérdida de luz axial, (2) dispersión de ángulo intermedio, (3) dispersión de luz polarizada de 90°, (4) dispersión lateral despolarizada de 90° y (5) fluorescencia de la pluralidad de detectores. El método también incluye configurar el procesador para realizar un análisis diferencial de WBC de la muestra de sangre, basado en las cinco mediciones, para partículas que emiten fluorescencia por encima de un umbral de fluorescencia. El método puede incluir configurar el procesador para preseleccionar las mediciones recibidas para eliminar cualquier partícula que no alcance el umbral de fluorescencia. El detector de pérdida de luz axial puede medir la pérdida de luz axial con una dispersión de 0°. El detector de dispersión de ángulo intermedio puede medir la dispersión de ángulo de luz de aproximadamente 3° a aproximadamente 15°. La pluralidad de detectores puede incluir uno o más tubos fotomultiplicadores. El método también puede incluir configurar la fuente de excitación para emitir luz a una longitud de onda correspondiente al colorante fluorescente. Alternativamente, el colorante fluorescente puede seleccionarse para que se corresponda con la fuente de excitación. El colorante fluorescente puede ser permeable a la membrana celular y unirse al ácido nucleico.

65 65 El método puede comprender además configurar un subsistema de incubación del analizador hematológico para incubar la muestra de sangre con un reactivo de WBC. El reactivo de WBC puede incluir el colorante fluorescente y un agente de lisis. Alternativamente, el reactivo de WBC puede incluir (a) al menos un surfactante, (b) al menos un

tampón o al menos una sal, (c) al menos un agente antimicrobiano y (d) el colorante fluorescente. El subsistema de incubación se configura para incubar la muestra de sangre con el reactivo de WBC durante un período de tiempo menos de aproximadamente 25 segundos, menos de aproximadamente 17 segundos o menos de aproximadamente 9 segundos. El subsistema de incubación se configura para incubar la muestra de sangre con el reactivo de WBC a una temperatura que varía de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C, por ejemplo, tal como aproximadamente 40 °C.

En otra modalidad, se proporciona un analizador hematológico para realizar un análisis diferencial de WBC, que comprende: (1) medios para excitar partículas dentro de una muestra de sangre, que incluye posicionar una fuente de luz láser para excitar la muestra de sangre a medida que atraviesa una celda de flujo del analizador hematológico, o equivalentes del mismo; (2) medios para medir una pluralidad de señales de dispersión de luz de las partículas excitadas dentro de la muestra de sangre, que incluye una pluralidad de detectores (como se ha comentado anteriormente), o equivalentes de los mismos; (3) medios para medir una señal de fluorescencia de las partículas excitadas dentro de la muestra de sangre, que incluyen detectores de fluorescencia (como se ha comentado anteriormente), o equivalentes de los mismos; (4) medios para cribar las partículas excitadas para eliminar cualquier partícula que no alcance un umbral de fluorescencia, que incluye un procesador configurado con un activador de fluorescencia (como se discutió anteriormente), o equivalentes del mismo; y (5) medios para realizar un análisis diferencial de WBC, basado en la pluralidad de señales de dispersión de luz y la señal de fluorescencia, para las partículas que pasan por los medios para la detección, que incluye un procesador configurado para realizar un diferencial de WBC (como se discutió anteriormente), o equivalentes de los mismos. El analizador hematológico comprende además medios para incubar la muestra de sangre con un reactivo de WBC durante un período de incubación de menos de aproximadamente 25 segundos, que incluye un subsistema de incubación (como se discutió anteriormente), o equivalentes del mismo. El analizador hematológico comprende además medios para incubar la muestra de sangre con un reactivo de WBC a una temperatura que varía de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C, que incluye un subsistema de incubación (como se explicó anteriormente), o equivalentes del mismo.

En otra modalidad, se proporciona un método para realizar un análisis de WBC con un analizador hematológico automatizado. El método comprende: (a) diluir una muestra de sangre completa con un reactivo de WBC, en donde el reactivo de WBC incluye un agente de lisis de RBC y un colorante fluorescente que penetra en las membranas de WBC y se une a los ácidos nucleicos de WBC; (b) incubar la muestra de sangre diluida de la etapa (a) durante un período de incubación de menos de aproximadamente 25 segundos, a una temperatura que varía de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C; (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 a medida que la muestra incubada atraviesa la celda de flujo; (e) recolectar una pluralidad de señales de dispersión de luz y una señal de emisión de fluorescencia de la muestra excitada; y (f) realizar un diferencial de WBC basado en todas las señales recopiladas en la etapa (e), retirar al mismo tiempo cualquier partícula dentro de la muestra de sangre diluida que no alcance un umbral de fluorescencia basado en la señal de emisión de fluorescencia. El reactivo de WBC puede incluir (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. La fuente de excitación puede tener una longitud de onda de aproximadamente 350 nm a aproximadamente 700 nm. La emisión de fluorescencia se puede recoger a una longitud de onda de aproximadamente 360 nm a aproximadamente 750 nm, mediante un filtro de paso de banda o un filtro de paso largo.

En otra modalidad más, se proporciona un método para contar y clasificar glóbulos blancos por medio de un analizador hematológico automatizado, que comprende el método las etapas de: (a) diluir una muestra de sangre completa con al menos un reactivo de WBC; (b) incubar la muestra diluida de la etapa (a) durante un período de tiempo suficiente dentro de un intervalo de temperatura seleccionado para lisar los glóbulos rojos, preservar los glóbulos blancos, permitir que al menos un colorante fluorescente penetre las membranas celulares de los glóbulos blancos y se una a los ácidos nucleicos dentro los núcleos de los glóbulos blancos; (c) suministrar la muestra incubada de la etapa (b) a una celda de flujo en una corriente; (d) excitar la muestra incubada de la etapa (c) por medio de una fuente de luz a medida que la muestra incubada atraviesa la celda de flujo; (e) recolectar una pluralidad de señales de dispersión óptica y al menos una señal de emisión de fluorescencia simultáneamente; y (f) diferenciar y cuantificar WBC por medio de las señales recogidas en la etapa (e). Las características de la modalidad incluyen, pero no se limitan a: (1) el uso de al menos un colorante un colorante fluorescente para unir y teñir los ácidos nucleicos en los glóbulos blancos y otras células que contienen núcleos en una muestra de sangre determinada durante el procedimiento de lisis de los glóbulos rojos, y para inducir emisiones fluorescentes tras la excitación por fotones de una fuente determinada de luz, tal como un rayo láser en una longitud de onda apropiada; (2) uso de un activador de fluorescencia para separar y recolectar eventos que emiten una fuerte fluorescencia (por ejemplo, eventos que involucran glóbulos blancos y otras células que contienen núcleos); (3) uso de una pluralidad de canales ópticos y al menos un canal de fluorescencia para recopilar datos y analizar los datos así recopilados para identificar cada población celular y revelar información adicional.

En otra modalidad más, los sistemas y métodos descritos en la presente descripción incluyen: (a) teñir una muestra de sangre con un exclusivo colorante fluorescente, permeable a la membrana celular, que corresponde en espectro de emisión a una fuente de excitación de un instrumento de hematología; (b) mediante el uso de un activador de

fluorescencia para examinar la muestra de sangre en busca de WBC; y (c) mediante el uso de una combinación de mediciones para realizar un análisis diferencial. La combinación de mediciones puede incluir una o más mediciones seleccionadas del grupo que consiste en: pérdida de luz axial, dispersión de ángulo intermedio, dispersión de luz polarizada de 90°, dispersión lateral despolarizada de 90°, una o más mediciones de emisión de fluorescencia, dispersión de ángulo intermedio de anillos múltiples, y cualquier combinación o equivalente de los mismos.

En una modalidad, la invención está dirigida a uno o más sistemas informáticos capaces de llevar a cabo la funcionalidad descrita en la presente descripción. Por ejemplo, cualquiera de las etapas del método/análisis discutidos en la presente descripción puede implementarse en un sistema informático que tenga uno o más procesadores, una infraestructura de comunicación de datos (por ejemplo, un bus de comunicaciones, una barra cruzada o una red), una interfaz de visualización y/o una unidad de almacenamiento o memoria. La unidad de almacenamiento o memoria puede incluir un medio de almacenamiento legible por ordenador con instrucciones (por ejemplo, lógica de control o software) que, cuando se ejecutan, hacen que los procesadores realicen una o más de las funciones descritas en la presente descripción. Los términos "medio de almacenamiento legible por ordenador", "medio de programa de ordenador" y "medio que se puede usar por ordenador" se usan para generalmente para referirse a medios tales como una unidad de almacenamiento extraíble, unidades de almacenamiento extraíbles, datos transmitidos a través de una interfaz de comunicaciones y/o un disco duro instalado en una unidad de disco duro. Dichos productos de programas de ordenador proporcionan software informático, instrucciones y/o datos a un sistema informático, que también sirven para transformar el sistema informático de un ordenador de propósito general a un ordenador de propósito especial programada para realizar las funciones particulares descritas en la presente descripción. Cuando corresponda, el procesador, los componentes asociados y los sistemas y subsistemas equivalentes sirven como ejemplos de "medios para" realizar operaciones y funciones seleccionadas. Tales "medios para" realizar operaciones y funciones seleccionadas también sirven para transformar un ordenador de propósito general en un ordenador de propósito especial programada para realizar dichas operaciones y funciones seleccionadas.

25

REIVINDICACIONES

1. Un método para realizar un análisis de glóbulos blancos (WBC) con un analizador hematológico automatizado, el método comprende:
 - (a) diluir una muestra de sangre completa con un reactivo de WBC que tiene una osmolalidad de 20 a 250 mOsm, en donde el reactivo de WBC incluye un agente de lisis de glóbulos rojos (RBC) y naranja de acridina como un colorante fluorescente que penetra en las membranas de WBC y se une a los ácidos nucleicos de WBC;
 - (b) incubar la muestra de sangre diluida de la etapa (a) durante un período de incubación de menos de 25 segundos y a una temperatura que varía de 30 °C a 50 °C;
 - (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 a medida que la muestra incubada atraviesa la celda de flujo;
 - (e) recolectar una pluralidad de señales de dispersión de luz y una señal de emisión de fluorescencia de la muestra excitada;
 - (f) antes de realizar un análisis de WBC, excluir las partículas sin núcleo y retener las partículas que contienen núcleo mediante el uso de solo 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, que incluyen fragmentos de RBC, y es menor que las señales de emisión de fluorescencia de los WBC; y
 - (g) realizar un diferencial de WBC en las partículas que contienen núcleos retenidas en la etapa (f).
2. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el reactivo de WBC 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.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la emisión de fluorescencia se recopila a una longitud de onda que varía de 360 nm a 750 nm, mediante un filtro de paso de banda o un filtro de paso largo.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los eventos que contienen núcleos comprenden señales de WBC y glóbulos rojos nucleados (nRBC).
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde realizar el diferencial de WBC comprende distinguir los eventos que contienen núcleos entre sí en función de la magnitud de la señal de emisión fluorescencia asociada con cada evento.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde realizar el diferencial de WBC comprende distinguir los eventos que contienen núcleos entre sí en función de la pluralidad de señales de dispersión de luz asociadas con cada evento.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la pluralidad de señales de dispersión de luz incluye una o más de: señales de pérdida de luz axial (ALL), señales de dispersión de ángulo intermedio (IAS), señales de dispersión de luz polarizada (PSS) y señales de dispersión lateral despolarizada (DSS).
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el período de tiempo de incubación es inferior a 17 segundos.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el período de tiempo de incubación es inferior a 9 segundos.
11. 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.
12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el reactivo de WBC contiene un único colorante fluorescente que se usa para identificar, cuantificar y analizar una pluralidad de subpoblaciones de WBC a la vez.
13. Un analizador hematológico 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.

ES 2 927 316 T3

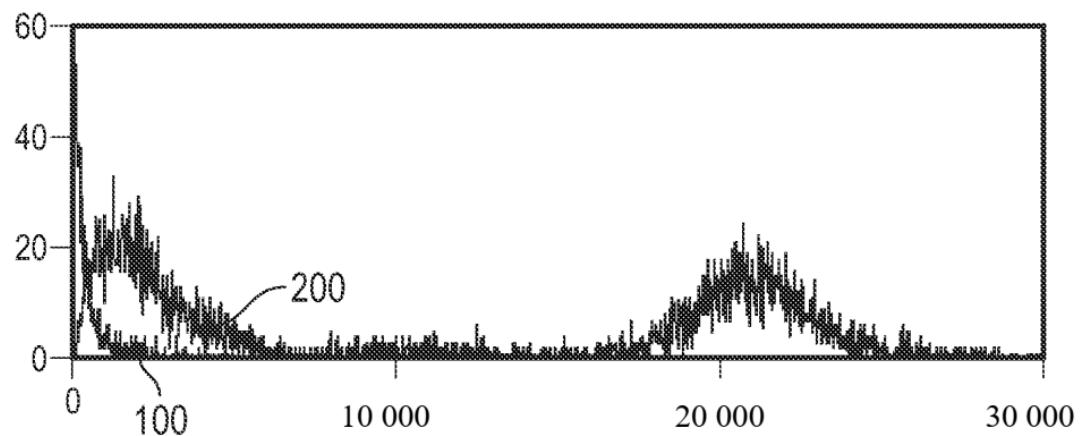


Figura 1A

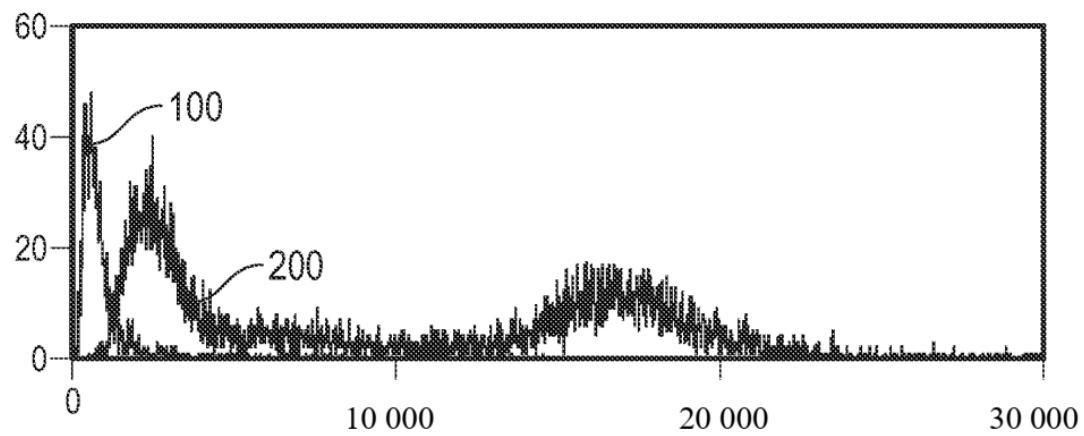


Figura 1B

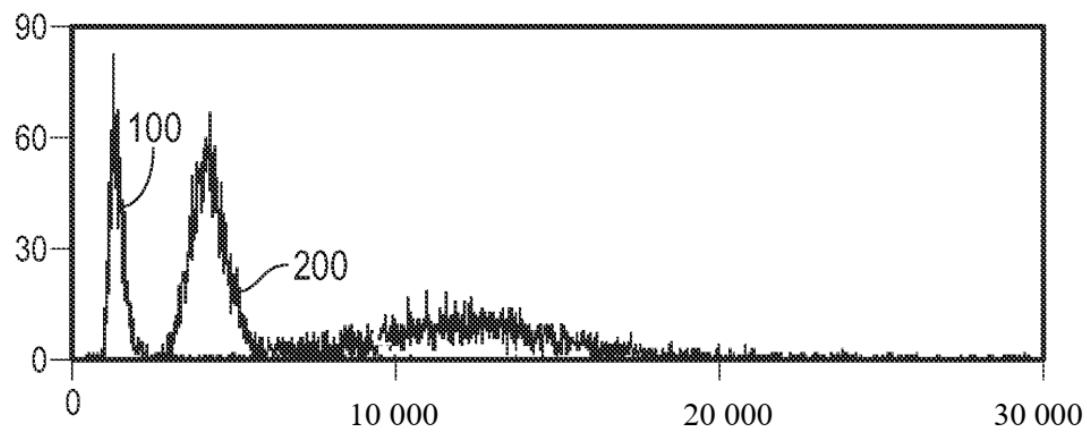


Figura 1C

ES 2 927 316 T3

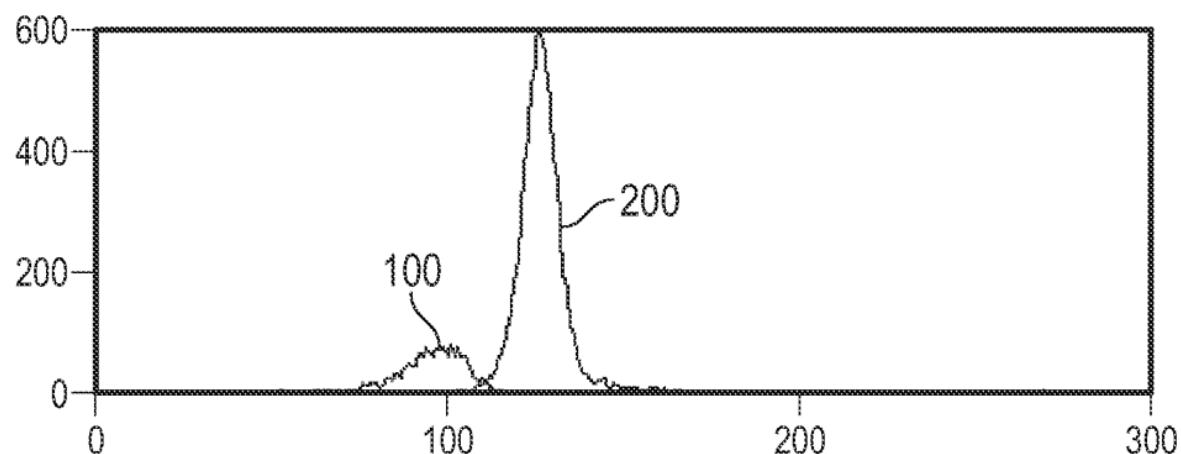


Figura 1D

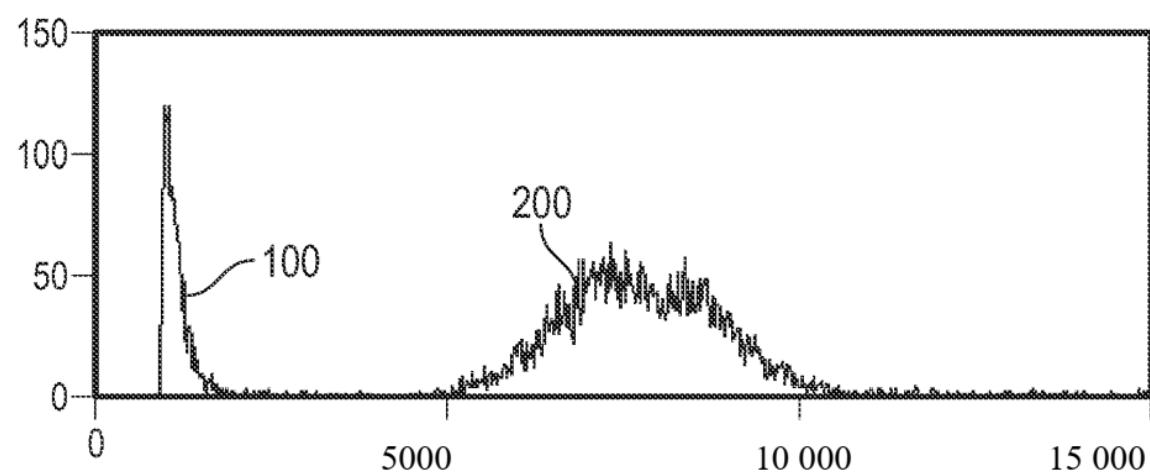


Figura 1E

ES 2 927 316 T3

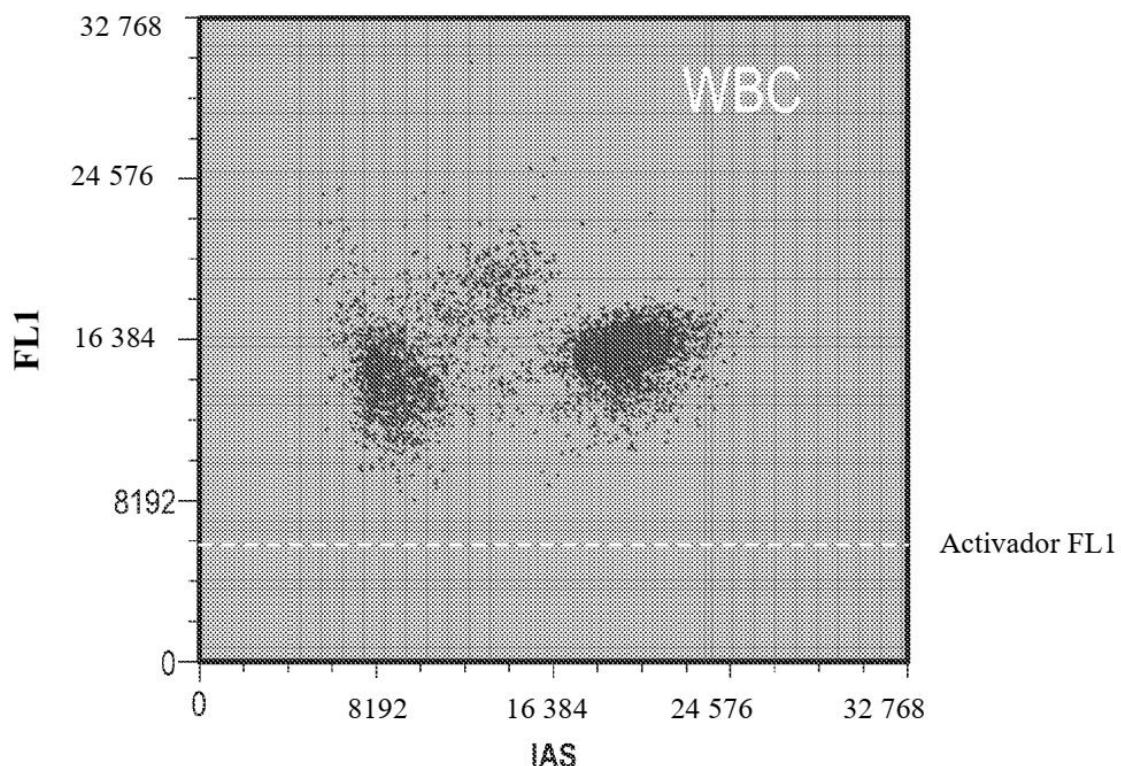


Figura 2

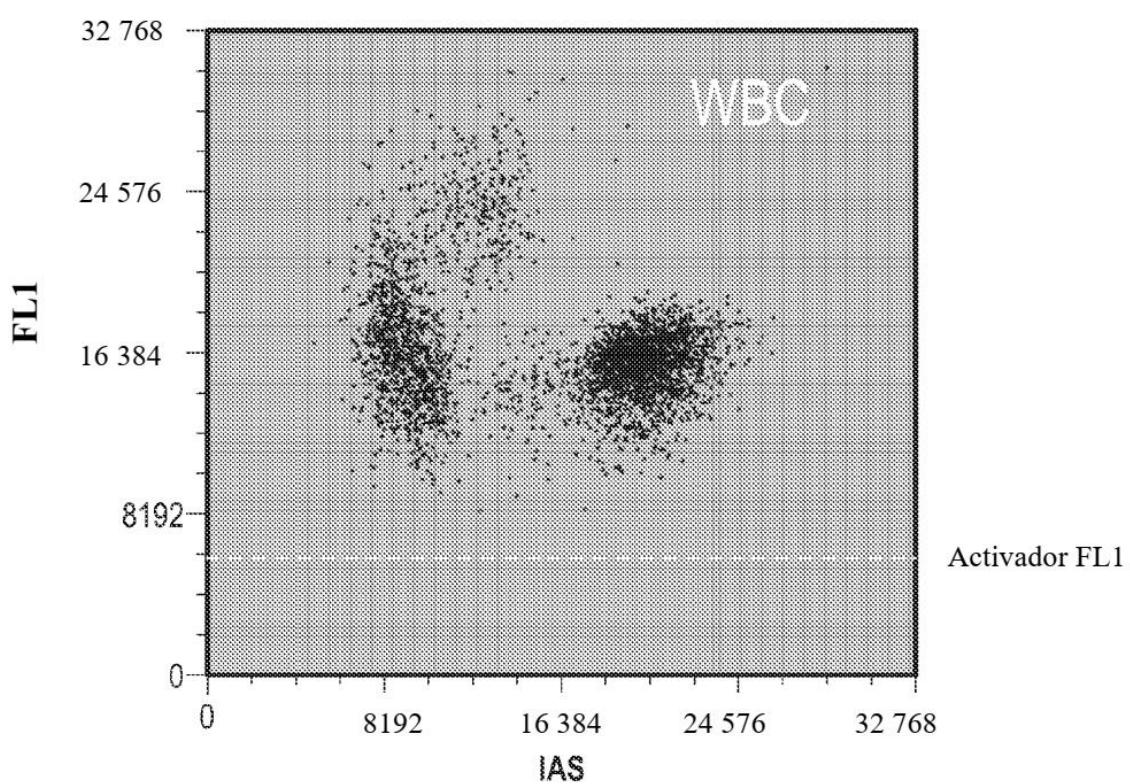


Figura 3

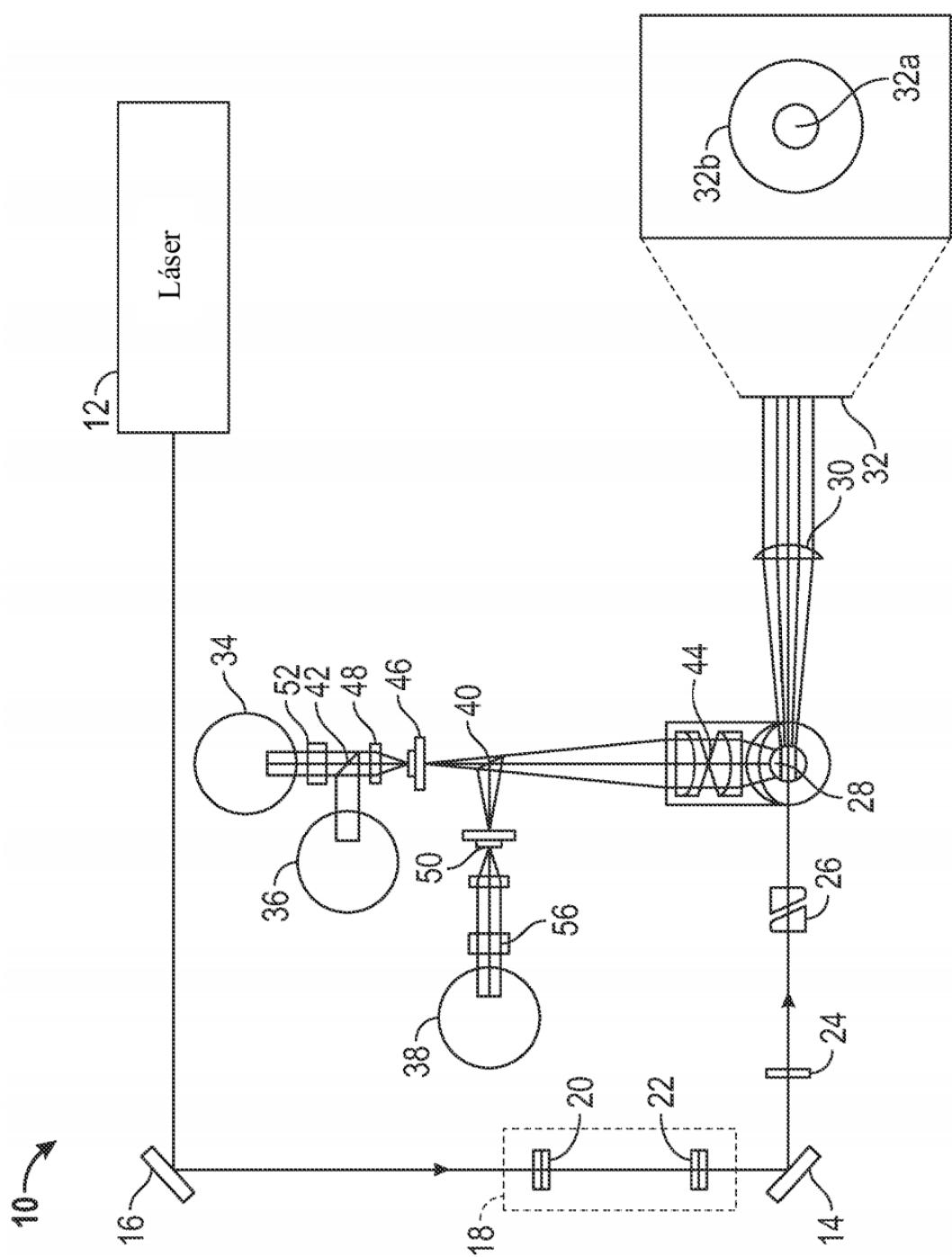


Figura 4

ES 2 927 316 T3

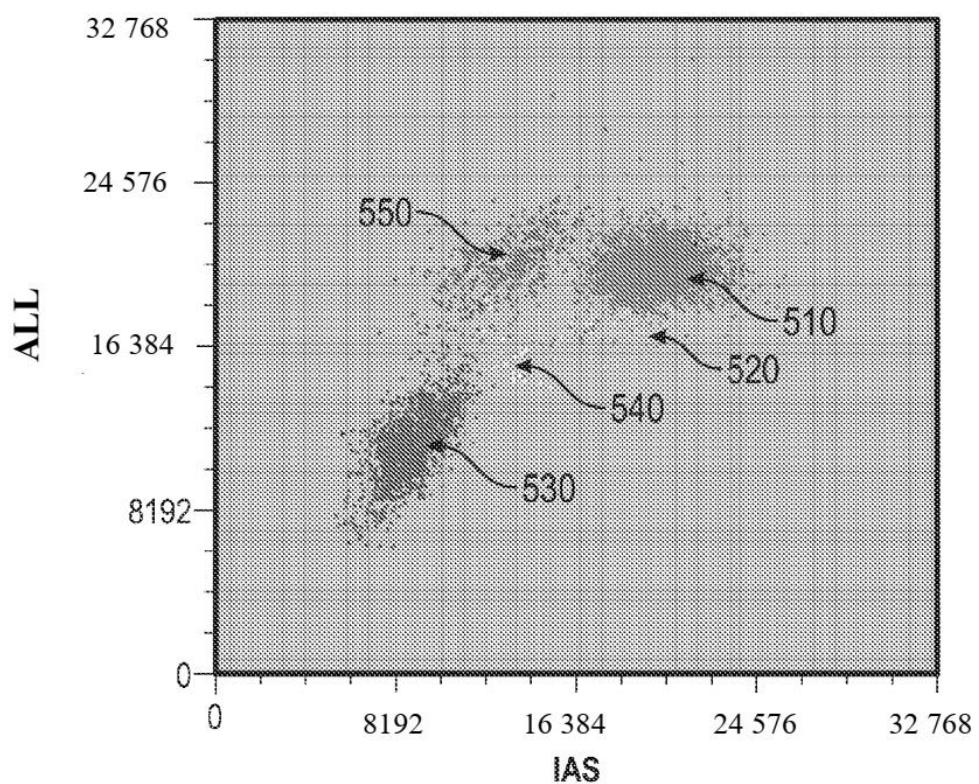


Figura 5A

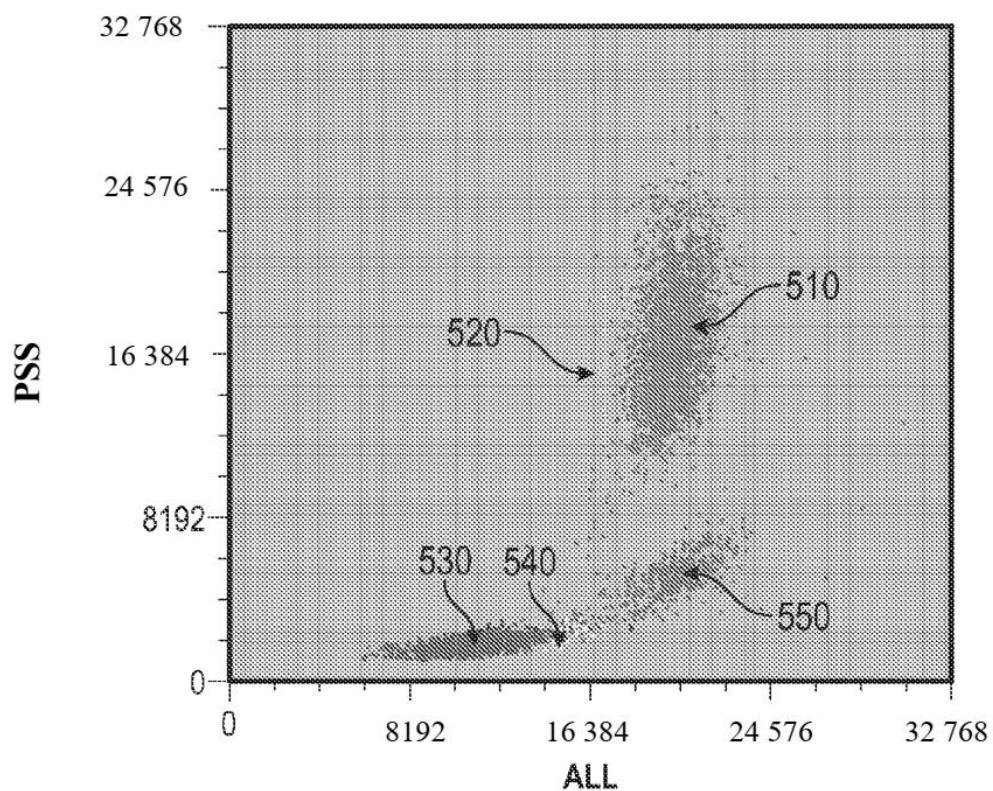


Figura 5B

ES 2 927 316 T3

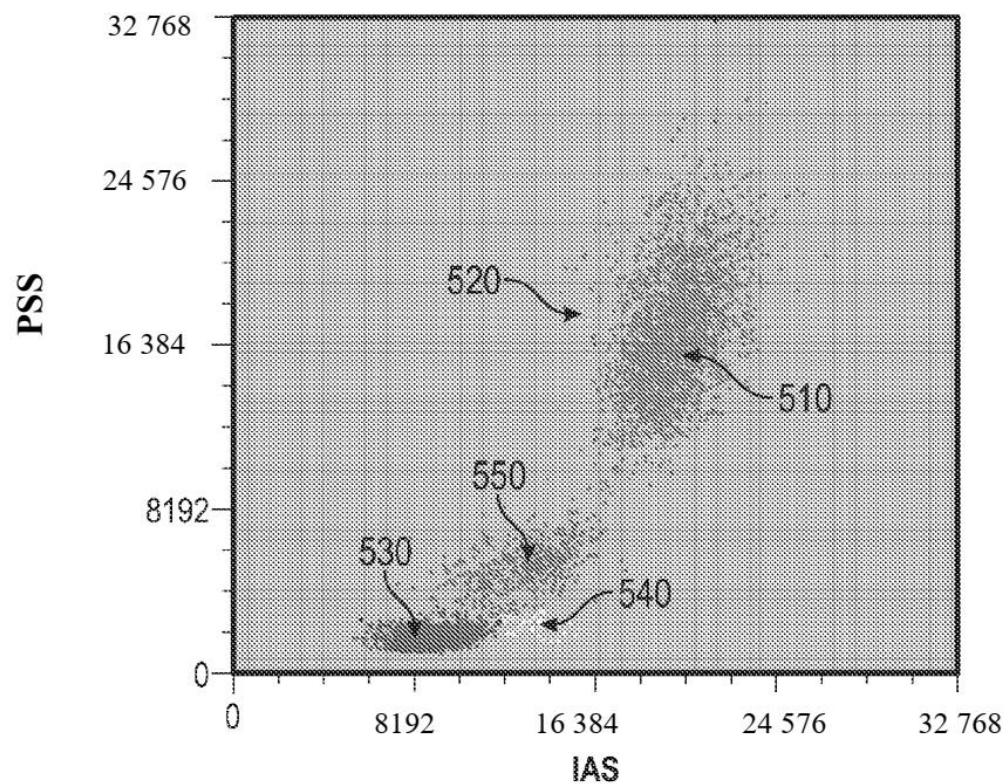


Figura 5C

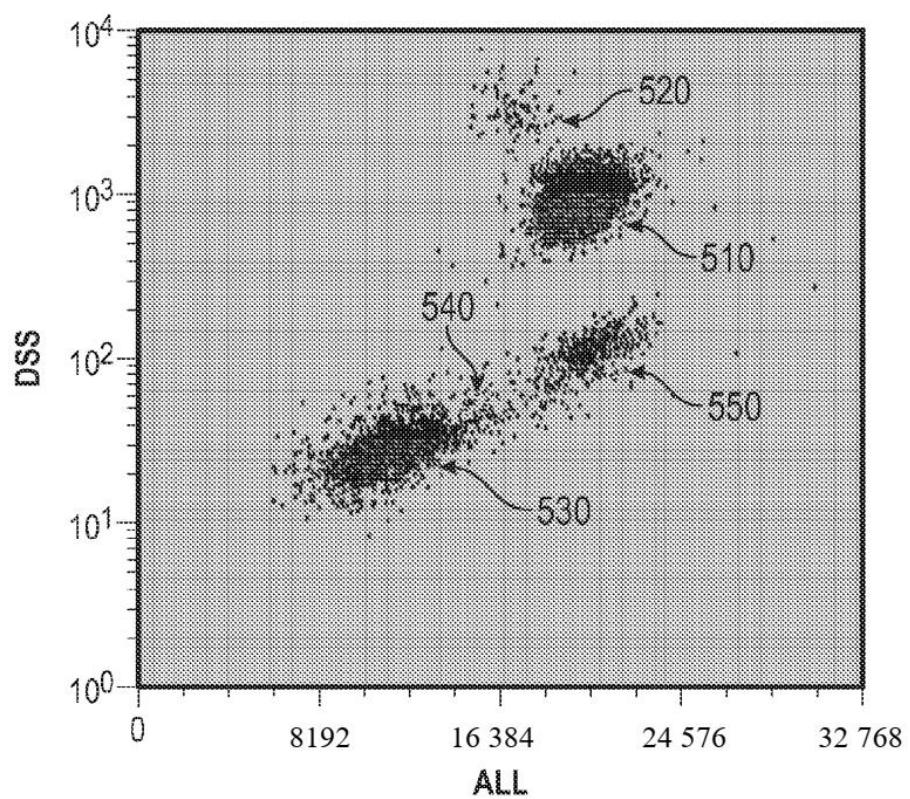


Figura 5D

ES 2 927 316 T3

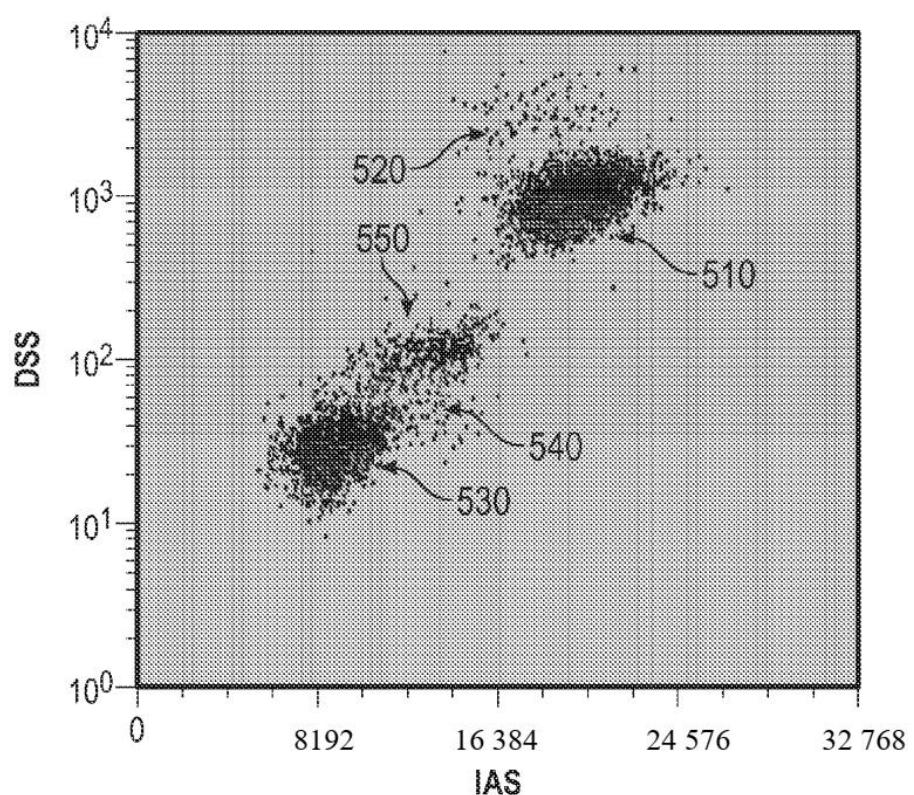


Figura 5E

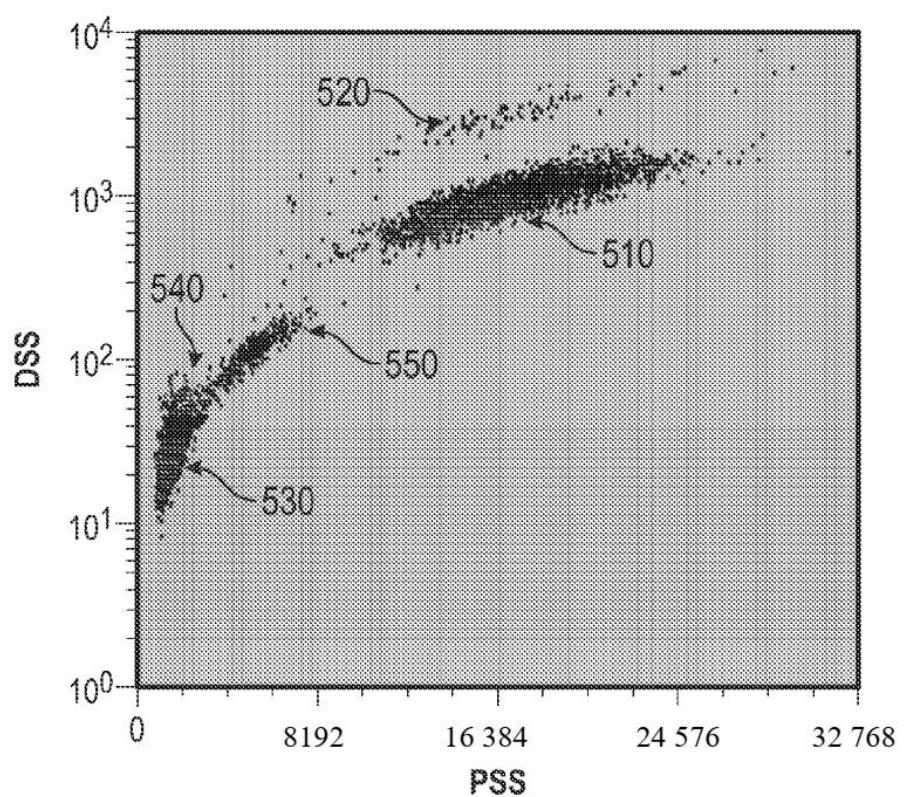


Figura 5F

ES 2 927 316 T3

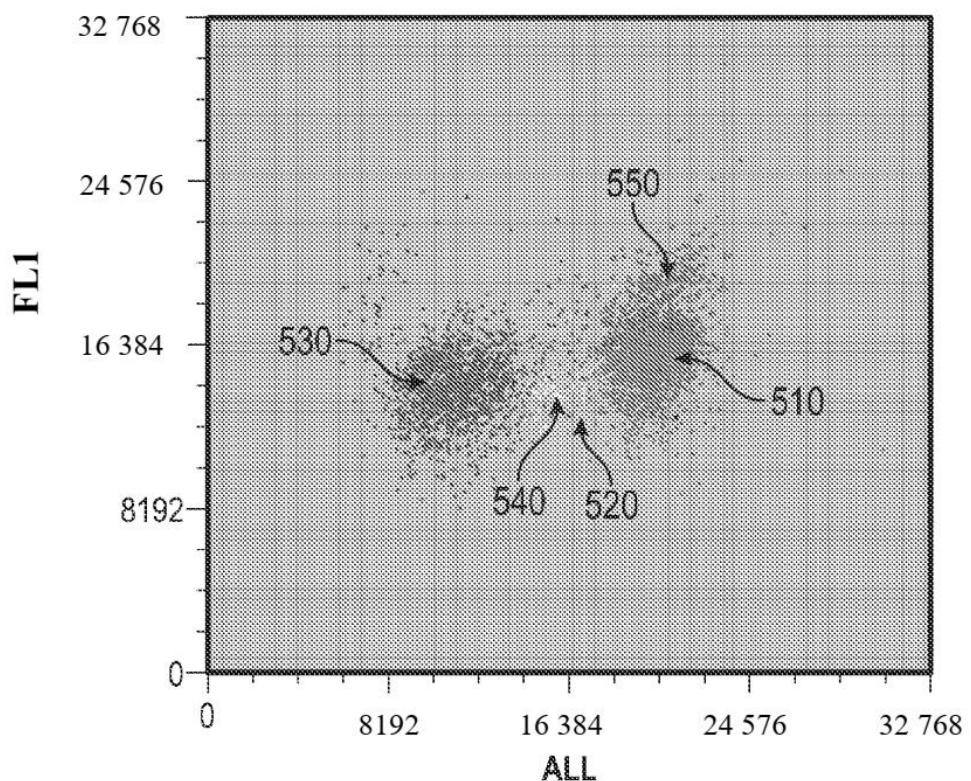


Figura 5G

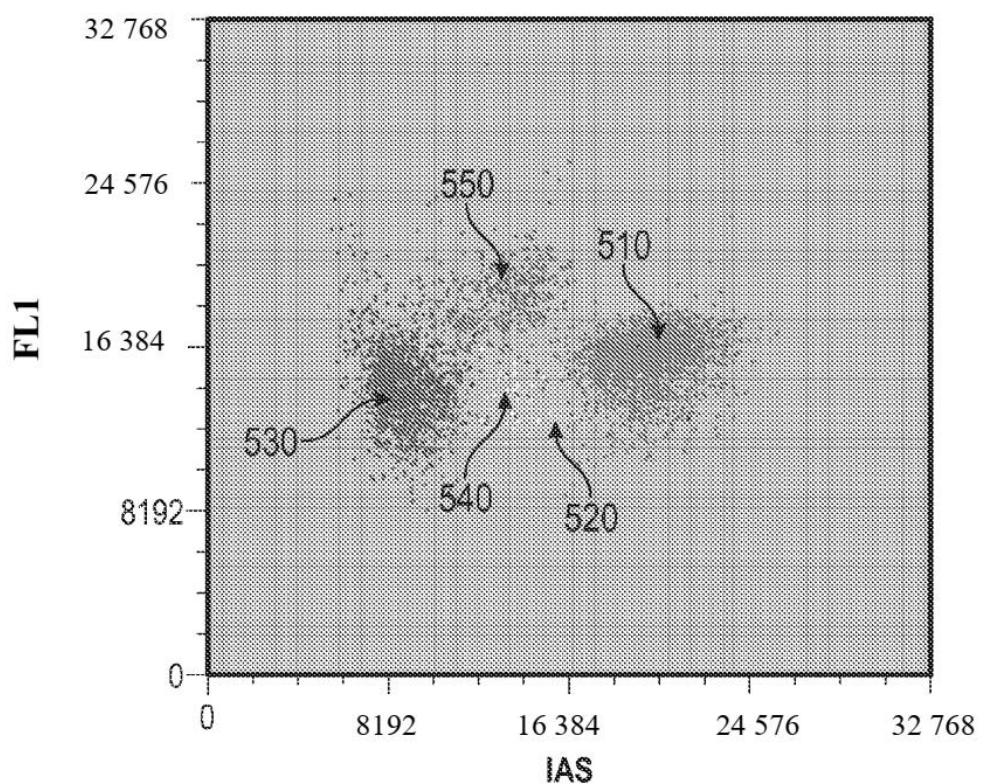


Figura 5H

ES 2 927 316 T3

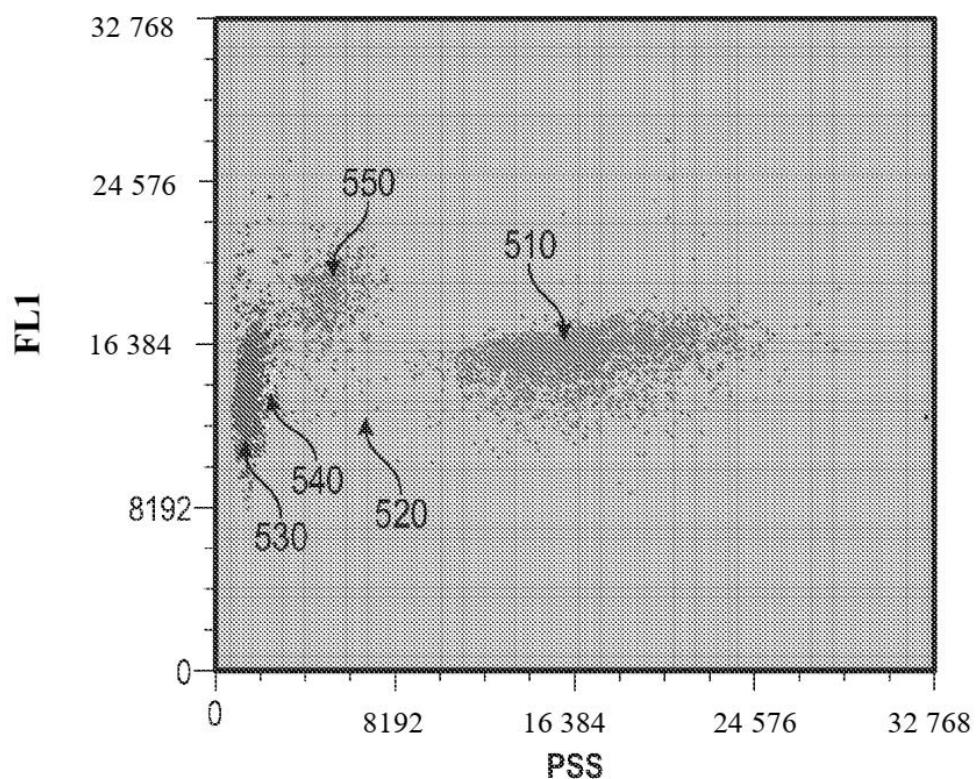


Figura 5I

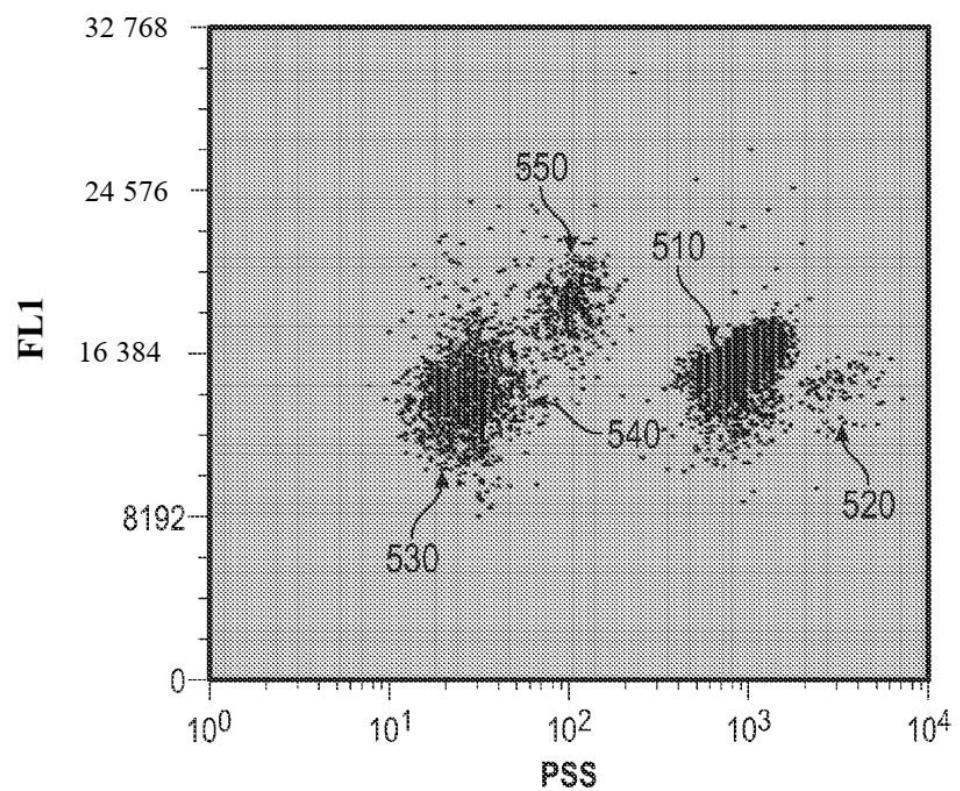
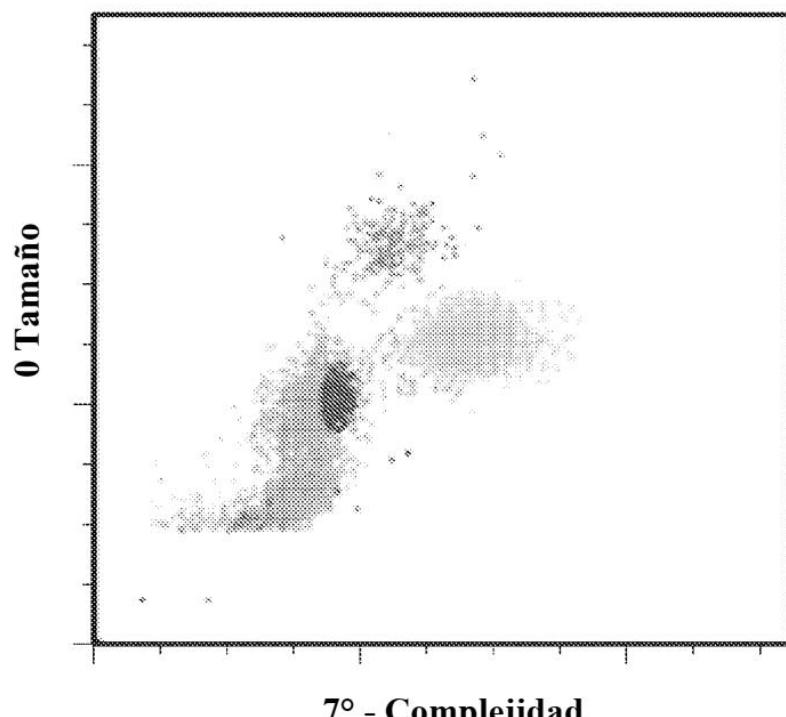


Figura 5J

Diferencial de WBC



7º - Complejidad

Figura 6A

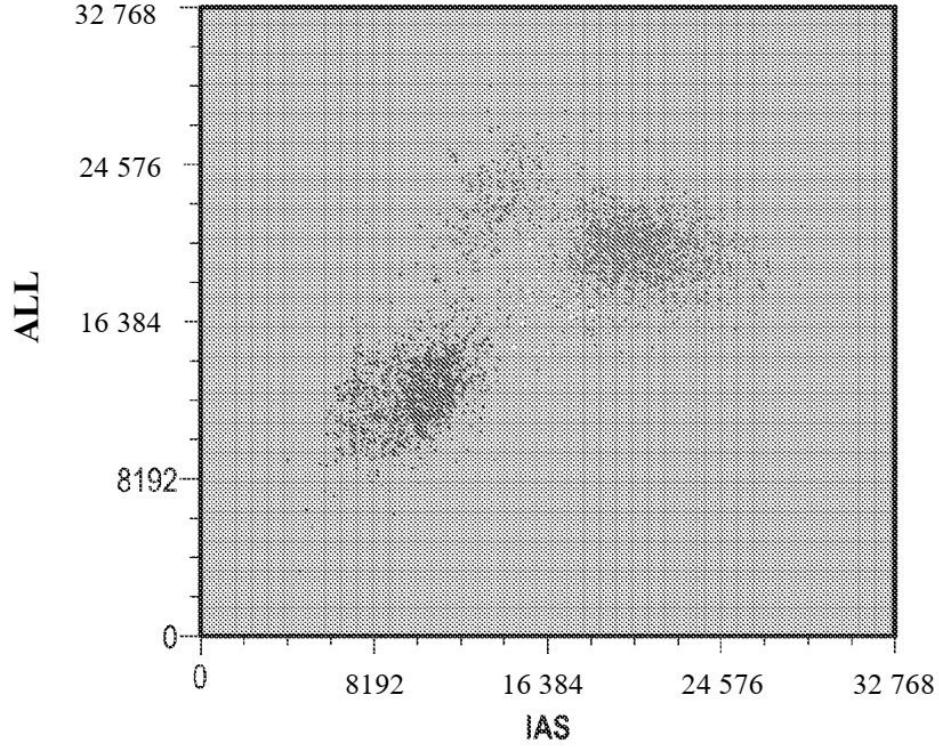


Figura 6B

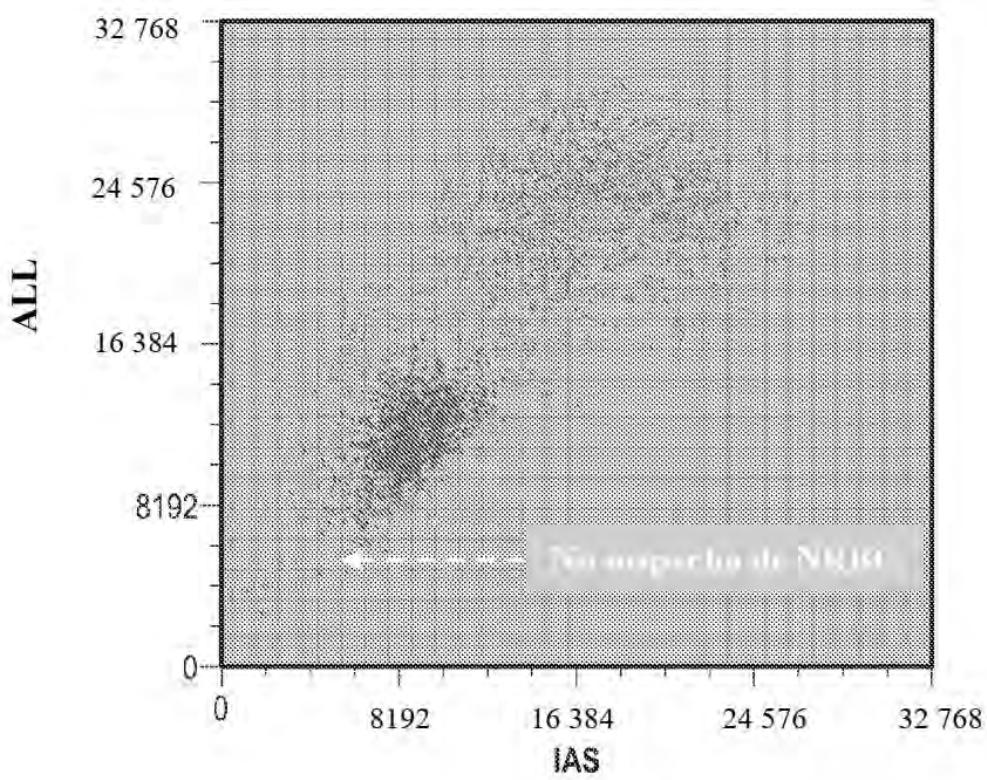
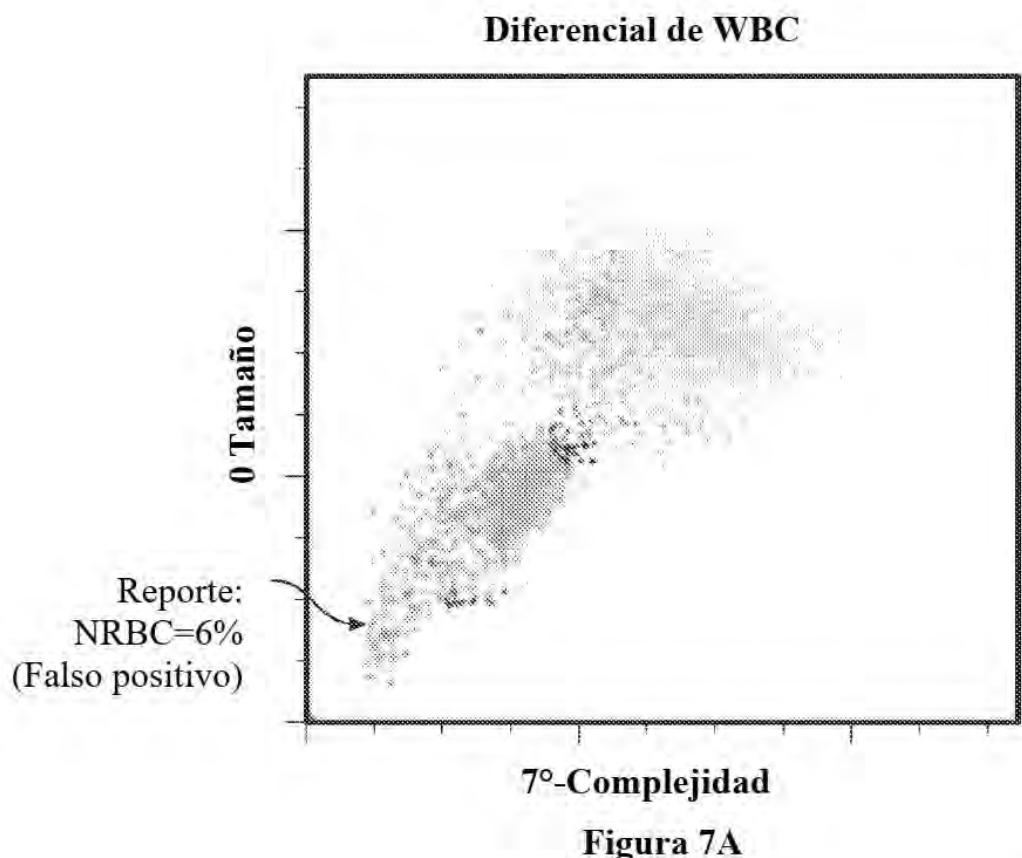


Figura 7B