

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 919 343**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2018 PCT/US2018/034181**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2018 WO18217923**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2018 E 18805768 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2022 EP 3630342**

54 Título: **Métodos y sistemas para el análisis de muestras**

30 Prioridad:

25.05.2017 US 201762511237 P

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

26.07.2022

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (100.0%)
Dept. 0377, AP6A-1, 100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064, US**

72 Inventor/es:

KROCKENBERGER, MARTIN

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 919 343 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

Métodos y sistemas para el análisis de muestras

5 Referencia cruzada con las solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos núm. 62/511,237, presentada el 25 de mayo de 2017.

10 Introducción

La presente descripción se refiere a sistemas y métodos de hematología. Más específicamente, la presente descripción se refiere a la detección de plaquetas en una muestra biológica, tal como una muestra de sangre. La presente descripción también se refiere a la detección de agregados de plaquetas en una muestra biológica, tal como una muestra de sangre.

Las plaquetas, también denominadas trombocitos, son pequeños fragmentos de células incoloras en forma de disco sin núcleo, que se encuentran en grandes cantidades en la sangre e implicadas en la coagulación. Las plaquetas no activadas son estructuras discoides biconvexas con forma de lente, de 2-3 μm de diámetro y son las células más pequeñas de la sangre.

La baja concentración de plaquetas es trombocitopenia y se debe a una disminución de la producción o a una mayor destrucción. La concentración elevada de plaquetas es trombocitosis y es congénita, reactiva (a las citocinas) o se debe a una producción no regulada: una de las neoplasias mieloproliferativas u otras neoplasias mieloides. Un trastorno de la función plaquetaria se denomina trombocitopatía.

La detección de plaquetas a menudo está limitada por el ruido en el analizador. El ruido puede causarlo la fuente de luz (como la fluctuación en la potencia del láser), la electrónica de amplificación u otras fuentes. Los métodos descritos en la presente descripción separan las plaquetas del ruido.

Los agregados de plaquetas pueden estar presentes en las muestras de sangre y, a menudo, pueden formarse en la muestra colectada y pueden interferir con los recuentos de células. Los métodos descritos en la presente descripción identifican la presencia de agregados de plaquetas en una muestra. Los citómetros de flujo de la técnica anterior se conocen por la patente de Estados Unidos 6,133,995 y las solicitudes de patentes US 2016/169786 A1, WO2014/159692 A1.

Resumen

Los aspectos de la presente descripción incluyen un método para diferenciar los eventos de plaquetas del ruido en un citómetro de flujo. El método puede incluir hacer fluir una muestra que comprende plaquetas a través de una celda de flujo del citómetro de flujo; interrogar ópticamente la muestra que fluye a través de la celda de flujo; detectar señales ópticas de la muestra interrogada; separar las señales detectadas en señales correspondientes a eventos de glóbulos rojos (RBC) y eventos más pequeños que los eventos de RBC; separar las señales correspondientes a eventos más pequeños que los eventos de RBC en eventos de plaquetas aparentes y ruido aparente; convertir las señales correspondientes a eventos de plaquetas aparentes y ruido aparente en escala logarítmica; ajustar las señales convertidas mediante el uso del modelo de mezcla gaussiana para generar una distribución ajustada para los eventos de plaquetas aparentes y el ruido aparente; e identificar los eventos de plaquetas aparentes como eventos de plaquetas cuando la ubicación y el ancho de la distribución ajustada están dentro del intervalo para los eventos de plaquetas.

En otros aspectos, el método incluye antes de la identificación, comparar la ubicación y el ancho de la distribución ajustada para los eventos de plaquetas aparentes con la ubicación y el ancho de la distribución ajustada para el ruido aparente, en donde cuando las distribuciones están fuera de intervalo aceptado, ajustar un modelo de mezcla gaussiana con una mayor restricción para el ruido.

En algunos aspectos, el ajuste de las señales convertidas mediante el uso del modelo de mezcla gaussiana puede implicar el uso de un algoritmo de maximización de expectativas. Por ejemplo, el logaritmo de eventos de plaquetas aparentes y ruido aparente puede trazarse como un histograma y modelar mediante el uso del modelado de mezcla gaussiana.

En algunos aspectos, un sistema de análisis de datos implementado por ordenador puede realizar un algoritmo de maximización de expectativas (EM) para crear un modelo de mezcla gaussiana (GMM) para los datos de logaritmo para eventos PLT aparentes y ruido aparente. En algunos aspectos, el algoritmo EM puede realizarse de forma iterativa para mejorar una solución para el GMM.

En algunos aspectos, un sistema de análisis de datos implementado por ordenador puede realizar un algoritmo de

maximización de expectativas (EM) para crear un modelo de mezcla gaussiana (GMM) para los datos de logaritmo para eventos PLT aparentes y ruido aparente, así como también eventos de WBC y RBC aparentes. En tales casos, el GMM puede usarse para ajustar eventos más pequeños que los de WBC y RBC.

5 En otros aspectos, el método incluye que la detección de señales de la muestra interrogada se realice a una frecuencia de 100 logaritmos/segundo, 1000 logaritmos/segundo, 10 000 logaritmos/segundo o 100 000 logaritmos/segundo.

En otros aspectos, el método incluye que las señales comprendan una o más de la dispersión de ángulo intermedio (IAS), la dispersión lateral polarizada (PSS) o la pérdida de luz axial (ALL).

10 En otros aspectos, el método incluye que las señales comprendan la dispersión de ángulo intermedio (IAS) y la dispersión lateral polarizada (PSS).

15 En algunos aspectos, la muestra es una muestra de sangre total. En algunos aspectos, la muestra es una muestra de sangre total sin lisar que contiene RBC intactos. En algunos aspectos, la muestra es una muestra de sangre total que se tiñe con un colorante fluorescente permeable a las células que se une a los ácidos nucleicos y contiene RBC. En otros aspectos, la muestra es una muestra de sangre total que se tiñe con un colorante fluorescente permeable a las células que se une a los ácidos nucleicos y se lisa para eliminar los RBC intactos. En otros aspectos, la muestra se incubaba con un reactivo de lisis de RBC y no se tiñe con un colorante fluorescente permeable a las células que se une a los ácidos nucleicos.

En otros aspectos, el método incluye que interrogar ópticamente las partículas comprenda excitar las células mediante el uso de un láser.

25 En otros aspectos, se proporciona un sistema para realizar el método para diferenciar los eventos de plaquetas del ruido en un citómetro de flujo como se describe en la presente descripción. En ciertos aspectos, el sistema puede comprender un citómetro de flujo.

30 Los aspectos de la presente descripción incluyen un medio legible por ordenador no transitorio que almacena instrucciones que, cuando se ejecutan por un dispositivo informático, hacen que el dispositivo informático realice las etapas para diferenciar los eventos de plaquetas del ruido en un citómetro de flujo, como se proporciona en la presente descripción.

35 Los aspectos de la presente descripción incluyen un método para identificar una muestra que comprende agregados de plaquetas. El método puede incluir la incubación de una muestra con un reactivo que comprende un colorante fluorescente y un agente de lisis de glóbulos rojos durante un período de tiempo suficiente para lisar los glóbulos rojos y teñir con fluorescencia las células que contienen el núcleo; hacer fluir la muestra a través de una celda de flujo del citómetro de flujo; interrogar ópticamente la muestra que fluye a través de la celda de flujo; detectar señales ópticas de la muestra interrogada; identificar eventos asociados con una señal fluorescente por debajo de un umbral, en donde los eventos identificados tienen una señal fluorescente por debajo de la señal fluorescente de los glóbulos blancos (WBC); y determinar el tamaño de los eventos identificados, en donde la presencia de eventos que tienen un tamaño mayor que las plaquetas indica que la muestra comprende agregados de plaquetas.

45 En otros aspectos, el método incluye seleccionar los eventos identificados que son de un tamaño mayor que el de las plaquetas; ajustar una línea a los eventos seleccionados; extender la línea a señales asociadas con los WBC; y reclasificar los WBC cerca de la línea como grupos de plaquetas. La reclasificación elimina el evento de acumulación de plaquetas de los eventos de glóbulos blancos para proporcionar un recuento de glóbulos blancos correcto.

50 En otros aspectos, el método incluye que las señales comprendan una o más de la dispersión de ángulo intermedio (IAS), la dispersión lateral polarizada (PSS), la pérdida de luz axial (ALL) o la fluorescencia (FL).

En otros aspectos, el método incluye que las señales comprendan FL y PSS.

55 En algunos aspectos, la muestra es una muestra de sangre total. En otros aspectos, la muestra se tiñe con un colorante fluorescente que se une al ácido nucleico. En otros aspectos, la muestra se incubaba con un reactivo de lisis de RBC.

En otros aspectos, el método incluye que interrogar ópticamente las partículas comprenda excitar las células mediante el uso de un láser.

60 En otros aspectos, se proporciona un citómetro de flujo para realizar el método para identificar una muestra que comprende agregados de plaquetas de acuerdo con la reivindicación 14.

65 Los aspectos de la presente descripción incluyen un medio legible por ordenador no transitorio que almacena instrucciones que, cuando se ejecutan mediante un dispositivo informático, hacen que el dispositivo informático en combinación con un citómetro de flujo realice las etapas para identificar una muestra que comprende agregados de plaquetas, de acuerdo con la reivindicación 8.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa un método ilustrativo para diferenciar plaquetas de señales de ruido detectadas por un analizador hematológico.

La Figura 2 representa un método ilustrativo para detectar la presencia de agregados de plaquetas (PLT) en una muestra analizada en un analizador hematológico.

La Figura 3 proporciona un gráfico de dispersión lateral polarizada logarítmica (log PSS) y dispersión de ángulo intermedio logarítmico 3 (log IAS3) derivado de señales PSS e IAS detectadas desde un analizador hematológico para una primera muestra.

La Figura 4 proporciona un histograma para los datos relacionados con el ruido y las plaquetas representados en la Figura 3.

La Figura 5 proporciona un gráfico de dispersión lateral polarizada logarítmica (log PSS) y dispersión de ángulo intermedio logarítmico 3 (log IAS3) derivada de señales PSS e IAS detectadas desde un analizador hematológico para una segunda muestra.

La Figura 6 proporciona un histograma para los datos relacionados con el ruido y las plaquetas representados en la Figura 5.

La Figura 7A representa un gráfico para PSS (eje X) y FL (eje Y) registrado desde un citómetro de flujo. Los eventos que tienen señales de FL por debajo de las de los WBC se indican con +.

La Figura 7B representa la clasificación de agregados de PLT adicionales mediante la extensión de una línea ajustada a los agregados de PLT identificados en señales para WBC.

La Figura 8A representa un gráfico para PSS (eje X) y FL (eje Y) registrado desde un citómetro de flujo. Los eventos que tienen señales de FL por debajo de las de los WBC se indican con +.

La Figura 8B representa la clasificación de agregados de PLT adicionales mediante la extensión de una línea 3D ajustada a los agregados de PLT identificados en señales para WBC.

Definiciones

El término "evaluar" incluye cualquier forma de medición e incluye determinar si un elemento está presente o no. Los términos "determinar", "medir", "valorar", "evaluar" y "ensayar" se usan indistintamente e incluyen determinaciones cuantitativas y cualitativas. Puede evaluarse de forma relativa o absoluta.

El término "fluido corporal" como se usa en la presente descripción generalmente se refiere a fluidos derivados de una "muestra biológica" que abarca una variedad de tipos de muestras que se obtienen de un individuo o una población de individuos y puede usarse en un ensayo de diagnóstico, de monitoreo o de cribado. La definición abarca la sangre y otras muestras líquidas de origen biológico. La definición también incluye muestras que se manipulan de cualquier forma después de su obtención, tal como por mezcla o agrupación de muestras individuales, tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento de ciertos componentes, tales como las células nucleadas, células no nucleadas, patógenos, etc.

El término "muestra biológica" abarca una muestra clínica y también incluye células en cultivo, sobrenadantes de células, lisados de células, suero, plasma, fluido biológico y muestras de tejido. El término "muestra biológica" incluye orina, saliva, fluido cerebroespinal, fluido intersticial, fluido ocular, fluido sinovial, sangre total, fracciones de sangre tales como plasma y suero, y similares.

Como se usa en la presente descripción, el término "evento" significa una partícula que genera una señal que es suficiente para activar al menos un detector, tal como, por ejemplo, el detector IAS, de manera que al menos un detector envía una señal al analizador para coleccionar mediciones de esa partícula en todos los detectores habilitados en el analizador, por ejemplo, ALL, IAS, PSS y DSS. Las partículas incluyen, pero no se limitan a, glóbulos blancos (WBC), glóbulos rojos (RBC), fragmentos de glóbulos rojos, plaquetas (PLT), lípidos y agregados de plaquetas (PLT).

Como se usa en la presente descripción, los términos y frases "diluyente", "envoltura" y "diluyente/envoltura", y similares, significan un diluyente de envoltura del tipo adecuado para usar con los analizadores de hematología de la serie CELL-DYN®Zafiro™, DIN CELULAR®Rubi™, DIN CELULAR®serie 3000 y CELL-DYN® 4000, cuyos diluyentes de envoltura están disponibles comercialmente en Abbott Laboratories, Santa Clara, California.

Como se usa en la presente descripción, el término "ADN" significa ácido desoxirribonucleico, que es un constituyente cromosómico polimérico de los núcleos de células vivas. Como se usa en la presente descripción, el término "ARN" significa ácido ribonucleico.

Descripción detallada de la invención

La presente descripción incluye métodos de. También se proporcionan sistemas configurados para realizar los métodos descritos e instrucciones de almacenamiento en un medio legible por un ordenador para realizar las etapas de los métodos descritos.

Antes de que la presente invención se describa con mayor detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a

las modalidades particulares descritas, ya que pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente descripción es solo para el propósito de describir las modalidades particulares, y no pretende limitarse, dado que el alcance de la presente invención se limitará solo mediante las reivindicaciones adjuntas.

5 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor del intervalo, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto lo dicte claramente de cualquier otra manera, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor del intervalo o que se declare en ese intervalo establecido, se abarca dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños y también se abarcan dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de estos límites incluidos también se incluyen en la invención.

15 Ciertos intervalos se presentan en la presente descripción con valores numéricos precedidos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente" se usa en la presente descripción para proporcionar soporte literal para el número exacto que precede, así como también un número que está cerca de o aproximadamente al número que el término precede. Para determinar si un número está cerca de o aproximadamente a un número específicamente recitado, el número que está cerca o aproximadamente no recitado puede ser un número que, en el contexto en donde se presenta, proporciona el equivalente sustancial del número específicamente recitado.

20 A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Si bien los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción pueden usarse, además, en la práctica o prueba de la presente invención, los materiales y métodos ilustrativos representativos se describen ahora.

25 La mención de cualquier publicación es por su descripción anterior a la fecha de presentación y no deben considerarse una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder tal publicación en virtud de la invención anterior. Adicionalmente, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales, por lo que es posible que deban confirmarse independientemente.

35 Se hace notar que, como se usa en la presente descripción y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto lo dicte claramente de cualquier otra manera. Se hace notar además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración se pretende para servir como base de antecedente para el uso de tal terminología exclusiva como "únicamente", "solamente" y similares en relación con la recitación de los elementos de acuerdo con la reivindicación, o el uso de una limitación "negativa".

40 Como será evidente para aquellos expertos en la técnica con la lectura de esta descripción, cada una de las modalidades individuales que se describen e ilustran en la presente descripción tienen componentes y características distintas que fácilmente pueden separarse de, o combinarse con las características de cualquiera de otras muchas modalidades sin apartarse del alcance o espíritu de la presente invención. Cualquier método mencionado puede realizarse para los eventos citados o en cualquier otro orden lo cual es lógicamente posible.

45 Métodos

Métodos para diferenciar los eventos de plaquetas del ruido.

50 La presente descripción incluye métodos para diferenciar los eventos de plaquetas del ruido en un citómetro de flujo. Los presentes métodos son útiles para descubrir poblaciones de plaquetas (PLT) que pueden estar enmascaradas por el ruido y, por lo tanto, proporcionan un recuento de PLT más preciso que los métodos de la técnica anterior.

55 Los aspectos de los métodos para diferenciar los eventos de PLT del ruido incluyen hacer fluir una muestra que comprende plaquetas a través de una celda de flujo del citómetro de flujo, interrogar ópticamente la muestra que fluye a través de la celda de flujo, detectar señales ópticas de la muestra interrogada, separar las señales detectadas en señales correspondientes a eventos de glóbulos rojos (RBC) y eventos más pequeños que los eventos de RBC, separar las señales correspondientes a eventos más pequeños que los eventos de RBC en eventos de plaquetas aparentes y ruido aparente, convertir las señales correspondientes a eventos de plaquetas aparentes y ruido aparente en escala logarítmica, ajustar las señales convertidas mediante el uso del modelo de mezcla gaussiana para generar una distribución ajustada para los eventos de plaquetas aparentes y el ruido aparente; e identificar los eventos de plaquetas aparentes como eventos de plaquetas cuando la ubicación y el ancho de la distribución ajustada están dentro del intervalo para los eventos de plaquetas.

65 El presente método implica el uso de un umbral más bajo que los métodos de la técnica anterior, cuyo umbral más bajo permite la inclusión de datos de PLT que también pueden incluir ruido. Los métodos instantáneos luego analizan los datos de PLT del ruido para detectar estas PLT que se enmascararon por el ruido. En algunos aspectos, las señales

detectadas son señales por encima de un umbral de tamaño de 1 centilitro. Por el contrario, los métodos de la técnica anterior tienen un umbral más alto que, aunque disminuye el ruido, también disminuye erróneamente el recuento de PLT.

5 Los presentes métodos para diferenciar los eventos de PLT del ruido pueden incluir un primer umbral que separa las señales correspondientes a los RBC de las señales correspondientes a eventos más pequeños que los RBC, cuyos eventos más pequeños incluyen plaquetas, así como también fragmentos de células, restos y ruido.

10 Las señales correspondientes a eventos más pequeños que los RBC están sujetas a un umbral adicional, un segundo umbral que es más bajo que el primer umbral. El segundo umbral se establece de manera que también se incluyan algunas señales que pueden corresponder a ruido. Este umbral más bajo permite la inclusión de señales más débiles de PLT más pequeñas que pudieron descartarse si se usó un umbral más alto. En algunas modalidades, el segundo umbral puede establecerse para descartar datos que corresponden a eventos o ruido que tienen un tamaño de menos de 1 centilitro. En algunos casos, el primer umbral puede establecerse de manera que los datos correspondientes a eventos que tienen un diámetro mayor de $6\ \mu\text{m}$ o más se separen de los eventos más pequeños. Los datos de eventos que tienen un diámetro mayor de menos de $6\ \mu\text{m}$ pueden estar sujetos a un segundo umbral que separa los datos de eventos que tienen un diámetro mayor de menos de $1\ \mu\text{m}$ de los eventos que tienen un diámetro mayor de $1\ \mu\text{m}$ a menos de $6\ \mu\text{m}$. Estos datos correspondientes a eventos que tienen un diámetro mayor de $1\ \mu\text{m}$ a menos de $6\ \mu\text{m}$ pueden luego analizarse para identificar las PLT en estos eventos y diferenciarlas del ruido.

20 La etapa de identificar y diferenciar las PLT del ruido puede implicar convertir señales correspondientes a eventos de plaquetas aparentes y ruido aparente en escala logarítmica.

25 El método instantáneo puede realizarse en señales colectadas a una velocidad de al menos 100 eventos/s, tal como al menos 1000-250 000 eventos/s, 10 000-250 000 eventos/s, 100 000-250 000 eventos/s, 100 000 -250 000 eventos/s, por ejemplo, 100 000 eventos/s o 250 000 eventos/s.

30 En ciertos aspectos, los datos sin procesar colectados pueden convertirse en una escala logarítmica (log). La conversión puede implicar una etapa de convertir datos analógicos en datos digitales. La conversión de datos analógicos a datos digitales puede realizarse antes de aplicar el primer umbral, antes de aplicar el segundo umbral o después de aplicar el segundo umbral. En algunos casos, la conversión de datos analógicos a datos digitales para producir datos de logaritmo puede realizarse después de que se aplique el primer umbral y los eventos más pequeños que los eventos de RBC se separen de los eventos de RBC, y antes de aplicar el segundo umbral que separa las señales que son señales de ruido obvias (por ejemplo, señales correspondientes a partículas que tienen un tamaño de menos de 1 centilitro).

40 El método puede incluir además la aplicación del modelo de mezcla gaussiana a los datos convertidos para separar los eventos aparentes de PLT del ruido. En ciertos casos, el método puede incluir el ajuste de las señales convertidas mediante el uso de un modelo de mezcla gaussiana para generar una distribución ajustada para los eventos aparentes de plaquetas y el ruido aparente. En ciertas modalidades, cuando la ubicación y el ancho de la distribución ajustada de los eventos aparentes de PLT están dentro del intervalo de los eventos aparentes de PLT, los eventos aparentes de PLT se identifican como plaquetas.

45 En ciertos casos, el método puede incluir antes de la identificación, comparar la ubicación y el ancho de la distribución ajustada para los eventos de plaquetas aparentes con la ubicación y el ancho de la distribución ajustada para el ruido aparente, en donde cuando las distribuciones están fuera del intervalo aceptado, la fecha convertida puede ajustarse de manera diferente. Por ejemplo, los datos convertidos pueden ajustarse mediante el uso de un modelo de mezcla gaussiana con una mayor restricción para el ruido, seguido de la identificación de eventos de PLT y ruido.

50 En ciertos casos, las señales detectadas por el citómetro de flujo y analizadas por los presentes métodos pueden incluir una o más de la dispersión de ángulo intermedio (IAS), la dispersión lateral polarizada (PSS) o la pérdida de luz axial (ALL). En otro caso, las señales detectadas por el citómetro de flujo y analizadas por los presentes métodos pueden incluir la dispersión de ángulo intermedio (IAS) y la dispersión lateral polarizada (PSS).

55 En ciertos casos, el método puede realizarse junto con métodos que realizan un análisis de sangre completo mediante la detección y enumeración de WBC, RBC y plaquetas en una muestra de sangre total. La muestra de sangre total puede no estar lisada ni teñida (por ejemplo, no teñida con un colorante fluorescente permeable a las células que se une a los ácidos nucleicos).

60 La Figura 1 ilustra un proceso ilustrativo implicado en la identificación de PLT en una muestra de sangre. Como primera etapa, los datos sin procesar se colectan y se separan en datos para eventos grandes y pequeños. Los eventos grandes eventualmente se clasificarán como RBC (o WBC) y los eventos pequeños representan tanto PLT como ruido. Se aplica un umbral para eliminar datos que obviamente son ruido (por ejemplo, datos correspondientes a un tamaño de partícula inferior a 1 centilitro). El resto de los datos se transforma en logaritmo. En algunos casos, el canal IAS3 se usa para transformar los picos de eventos en logaritmos y se ajusta mediante el uso del GMM (modelo de mezcla gaussiana) para eventos pequeños (es decir, eventos más pequeños que WBC y RBC). A continuación, se analizan

la ubicación y los anchos de las distribuciones de ruido y PLT instaladas para determinar si se encuentran en un intervalo aceptable. Si el modelo se ajusta, los pequeños eventos se separan en PLT y ruido. Si el modelo no se ajusta, se aplica un GMM limitado para eventos más grandes (por ejemplo, más pequeños que WBC y RBC y más grandes que 3 centilitros, 2 centilitros o 1 centilitro) y se clasifican en PLT y ruido. Como se indica en la presente descripción, este proceso puede realizarse junto con la determinación del recuento completo de células sanguíneas para una muestra de sangre total y, por lo tanto, puede no implicar la lisis de RBC. En ciertos casos, el método puede no implicar teñir los núcleos de las células de la muestra de sangre con un tinte fluorescente.

Métodos de detección de agregados de plaquetas.

En ocasiones, pueden formarse agregados de plaquetas en una muestra de prueba antes de que la muestra se envíe a un instrumento de recuento de plaquetas (por ejemplo, un analizador hematológico) para su análisis. Como resultado, el recuento de plaquetas (PLT) que se obtiene puede ser artificialmente bajo. Además, los agregados de PLT pueden contarse como WBC. Los aspectos de la presente descripción incluyen un método para identificar una muestra que comprende agregados de plaquetas. El método puede incluir además proporcionar una concentración de WBC corregida después de restar las señales de los agregados de PLT. En ciertos aspectos, cuando el número de agregados de PLT es mayor que un umbral para un número aceptable de agregados de PLT, la muestra puede marcarse y descartarse el recuento de células obtenido para la muestra. El sistema puede además transmitir una prueba fallida a un usuario.

En ciertas modalidades, un método para identificar una muestra que comprende agregados de plaquetas puede incluir incubar una muestra con un reactivo que comprende un colorante fluorescente permeable a las células y un agente de lisis de glóbulos rojos durante un período de tiempo suficiente para lisar los glóbulos rojos y para teñir con fluorescencia células que contienen núcleo; hacer fluir la muestra a través de una celda de flujo del citómetro de flujo; interrogar ópticamente la muestra que fluye a través de la celda de flujo; detectar señales ópticas de la muestra interrogada; identificar eventos asociados con una señal fluorescente por debajo de un umbral, donde los eventos identificados tienen una señal fluorescente por debajo de la señal fluorescente de los glóbulos blancos (WBC); y determinar el tamaño de los eventos identificados, en donde la presencia de eventos que tienen un tamaño mayor que las plaquetas indica que la muestra comprende agregados de plaquetas.

En ciertos casos, el umbral de tamaño puede establecerse de manera que las partículas que tienen un diámetro máximo superior a 8 μm y que tienen una señal de FL menor que el umbral para WBC pueden identificarse como agregados de PLT.

En ciertos aspectos, el método puede implicar, además, seleccionar los eventos identificados que son de un tamaño mayor que el de las plaquetas; ajustar una línea a los eventos seleccionados; extender la línea a señales asociadas con WBC; y reclasificar los WBC cerca de la línea como grupos de plaquetas. La reclasificación de los WBC en agregados de PLT a su vez corrige el recuento de WBC.

En ciertos aspectos, el número de agrupaciones de PLT puede ser superior a un umbral. En tales casos, la muestra puede marcarse como que contiene más agregados de PLT de los que pueden tolerarse y el método puede implicar descartar los recuentos de células determinados para esta muestra.

En ciertos aspectos, el método para identificar agregados de PLT puede incluir el uso de una línea en 3 dimensiones (3D) para clasificar grupos. Por ejemplo, en lugar de ajustar una línea a los eventos seleccionados, puede ajustarse una línea 3D a los eventos que tienen una señal FL por debajo del umbral de señales FL para WBC. El ajuste de línea 3D puede usarse cuando más del 5 % del recuento de PLT son agregados de PLT. En otras palabras, cuando el número de agregados de PLT identificados mediante el uso del ajuste de línea es superior al 5 % del número de PLT en la muestra de sangre, los eventos que tienen un umbral inferior al de la identificación de leucocitos se ajustan mediante el uso de una línea 3D y se repite el método al extender la línea 3D en señales asociadas con WBC; y reclasificar los WBC cerca de la línea como grupos de plaquetas. La reclasificación de los WBC en agregados de PLT a su vez corrige el recuento de WBC.

En ciertos casos, las señales analizadas para identificar agregados de PLT pueden ser una o más de la fluorescencia (FL), la dispersión de ángulo intermedio (IAS), la dispersión lateral polarizada (PSS) o la pérdida de luz axial (ALL). En algunos aspectos, las señales analizadas para identificar agregados de PLT pueden ser la fluorescencia (FL) y la dispersión lateral polarizada (PSS).

En algunos aspectos, la muestra puede teñirse con un colorante fluorescente que es permeable a las células y se une al ácido nucleico. Mediante el uso de un colorante fluorescente de este tipo se asegura el marcaje de los WBC, pero no de los RBC y las plaquetas normales. En algunos casos, la muestra también puede lisarse para eliminar los glóbulos rojos.

La Figura 2 ilustra un proceso ilustrativo implicado en la identificación y clasificación de agregados de PLT en una muestra de sangre. Como primera etapa, los datos se analizan para seleccionar partículas que tengan baja fluorescencia (es decir, por debajo del umbral establecido para las células sanguíneas nucleadas, como los WBC).

Estas partículas se indican como partículas no FL. Los agregados de PLT tienen baja fluorescencia, pero tienen un tamaño similar a los WBC. Se ajusta una línea a los agregados de PLT y la línea se extiende a partículas fluorescentes (FL) para determinar el número de partículas cerca de la línea. Si hay pocas partículas cerca de la línea, se reclasifican como agregados de PLT (en lugar de WBC). La presencia de un gran número de partículas cerca de la línea indicó que un ajuste de línea 3D sería más preciso y se ajusta una línea 3D a las partículas que tienen baja fluorescencia como se definió anteriormente. La línea 3D ajustada se extiende a partículas FL para determinar el número de partículas cerca de la línea y estas se reclasifican como agregados de PLT (en lugar de WBC).

Como se usa en la presente descripción, el término "activador" significa el valor mínimo de una señal que debe superar una medición de la señal para que se considere válida. Se analizan los eventos que proporcionan un valor de señal por encima del valor de activación. Los eventos que proporcionan un valor de señal por debajo del valor de activación no se incluyen en el análisis de datos. Se usa una escala de 0 a 5000 o una escala de 0 a 6000 para cada canal de detección. Cada valor de la escala representa una gradación de la fuerza de una señal, siendo el valor 0 la fuerza más baja y el valor 5000 (o 6000) la fuerza más alta. En los métodos para diferenciar las PLT del ruido como se describió en la presente descripción, el activador puede establecerse de manera que una señal más baja active los detectores que, al tiempo que permite detectar más ruido, garantizaría la detección de señales de las PLT.

En algunos aspectos, los datos sin procesar que pueden colectarse para el análisis de sangre y en los métodos descritos en la presente descripción pueden incluir eventos que tienen al menos cinco dimensiones de información; específicamente, ALL, IAS, PSS, DSS y FL1, junto con marcadores de tiempo y otra información relevante. En algunos aspectos, solo pueden usarse dos o tres de estos tipos de datos sin procesar en los métodos descritos en la presente descripción. Por ejemplo, en los métodos para diferenciar las PLT del ruido, pueden usarse datos brutos correspondientes a PSS y ALL. En otros aspectos, como en un método para identificar agregados de PLT, pueden usarse FL y PSS y FL y ALL.

Los sujetos de los que puede adquirirse un espécimen incluyen, pero no se limitan a, sujetos humanos, sujetos mamíferos (por ejemplo, primates (monos, gorilas, simios, babuinos, orangutanes, etc.), ungulados (por ejemplo, equinos, bovinos, camélidos, cerdos, etc.), caninos, felinos, roedores (ratones, ratas, etc.), etc. Los especímenes pueden incluir muestras de fluidos biológicos y muestras biológicas (tal como una muestra hematológica, por ejemplo, una muestra de sangre) que pueden procesarse antes de la evaluación, por ejemplo, diluidas, lisadas, etc., por ejemplo, las descritas en las patentes de Estados Unidos núms. 9,011,773 y 9,028,778.

Los WBC contienen una concentración relativamente alta de ADN en sus núcleos. Cuando se diseña apropiadamente, puede usarse un colorante fluorescente para diferenciar entre diferentes subpoblaciones de WBC y para diferenciar WBC de células no nucleadas. Por ejemplo, los linfocitos y los basófilos tienen firmas de fluorescencia diferentes, a pesar de tener firmas de dispersión de luz similares. Además, los RBC maduros no contienen ADN. Por lo tanto, puede seleccionarse un colorante fluorescente para diferenciar entre poblaciones de células sanguíneas. 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. 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 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), con el objetivo de excitar adecuadamente el colorante y lograr resultados óptimos.

El colorante fluorescente seleccionado es tal que es: 1) capaz de unirse a ácidos nucleicos, 2) capaz de penetrar las membranas celulares de los WBC, 3) excitable a una longitud de onda seleccionada cuando se somete a una fuente de luz, 4) capaz de emitir fluorescencia al excitarse por la fuente de luz, y 5) 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 marcar WBC y nRBC, "descartar" los RBC no lisados y los fragmentos de RBC y plaquetas en función de un activador de fluorescencia configurado en el analizador hematológico, y diferenciar entre subpoblaciones de WBC. 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 empareja con la fuente de excitación del analizador hematológico, de manera que se usa un solo colorante para teñir y excitar la emisión de fluorescencia en 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 las subpoblaciones de WBC, a la vez.

En una modalidad, se proporciona un colorante fluorescente en un reactivo, 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 activar hasta 1000 x 10³ células 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, 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 más baja, o hipotonicidad, para acelerar la lisis de los RBC. La osmolaridad 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 en una relación de aproximadamente una parte por volumen de muestra por aproximadamente 35 partes por volumen de reactivo.

Los datos de dispersión y fluorescencia para el análisis generalmente se colectan con una pluralidad de canales ópticos y al menos un canal de fluorescencia, como se describió anteriormente.

En ciertos aspectos, puede usarse un activador de fluorescencia (FL). El activador FL se describe en detalle en la patente de Estados Unidos núm. 9,091,625.

Como tal, los aspectos de los sistemas y métodos presentados en la presente descripción usan un activador de fluorescencia para colectar y analizar WBC y subpoblaciones de WBC. En una modalidad, previo a la detección de agregados de plaquetas (PLT), se establece un activador de fluorescencia entre las señales de los RBC y las señales de los WBC (y los nRBC, cuando están presentes). La información óptica y de fluorescencia colectada puede usarse para distinguir (o diferenciar) WBC y subpoblaciones de WBC de los agregados de PLT. Por ejemplo, pueden usarse citogramas bidimensionales para identificar y distinguir partículas. Como se indica en la presente descripción, en algunos aspectos, el activador FL puede establecerse más bajo para los datos que se van a analizar para la superposición entre las plaquetas y el ruido. En otros casos, en un método para analizar la superposición entre las plaquetas y el ruido, no se usa la señal de fluorescencia y, por lo tanto, no puede usarse el activador de FL.

Como se usa en la presente descripción, la expresión "información de fluorescencia" significa datos colectados 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.

El método descrito en la presente descripción puede implicar un método automatizado para el análisis simultáneo de diferencial de glóbulos blancos, eritroblastos, glóbulos rojos y plaquetas y agregados de PLT en líquido, tal como, por ejemplo, sangre. Otros fluidos biológicos, tales como, por ejemplo, fluido cerebroespinal, fluido de ascitis, fluido pleural, fluido peritoneal, fluido pericárdico, fluido sinovial, fluido de dializado y fluido de drenaje, pueden usarse para determinar varios parámetros de estos fluidos.

Sistemas

La presente descripción incluye sistemas para diferenciar los eventos de plaquetas del ruido en un citómetro de flujo. Los sistemas de la presente descripción involucran componentes configurados para realizar los métodos para diferenciar los eventos de plaquetas del ruido en un citómetro de flujo.

La presente descripción también incluye sistemas para identificar una muestra que comprende agregados de plaquetas, corregir opcionalmente el recuento de WBC en función del número detectado de agregados de PLT y/o marcar la muestra si el número de agregados de PLT impide un análisis de células preciso.

En ciertas modalidades, el sistema puede incluir un citómetro de flujo que incluye una celda de flujo, un sistema de interrogación de partículas ópticas acoplado ópticamente a la celda de flujo y un medio legible por ordenador no transitorio como se describe más adelante en la presente descripción. Dichos sistemas pueden incluir circuitos configurados para realizar una o más de las etapas de los métodos como se describió en la presente descripción.

Los componentes de los presentes sistemas pueden ensamblarse en un solo dispositivo o pueden ensamblarse como un sistema de componentes separados entre dos o más dispositivos. En algunos casos, un dispositivo, un sistema o componentes del mismo que realice las funciones puede ser externo pero cercano (es decir, unido a la cubierta externa de o en la misma superficie de trabajo o dentro de la misma habitación o edificio, etc.) de un analizador hematológico que procesa la muestra. En otros casos, un dispositivo, un sistema o componentes del mismo que realice las funciones pueden colocarse internamente (es decir, dentro, adentro o alojados dentro) de un analizador hematológico que procesa el espécimen y/u obtiene los datos.

Por "unidad de procesamiento de datos", como se usa en la presente descripción, se entiende cualquier combinación de hardware y/o software que realizará las funciones que se requieren de ella. Por ejemplo, cualquier unidad de procesamiento de datos en la presente descripción puede ser un microprocesador digital programable tal como el disponible en forma de controlador electrónico, ordenador central, servidor u ordenador personal (de escritorio o portátil). Donde la unidad de procesamiento de datos es programable, la programación adecuada puede comunicarse desde una ubicación remota a la unidad de procesamiento de datos, o guardada previamente en un producto de programa de programa de ordenador (tal como un medio de almacenamiento legible por ordenador portátil o fijo, ya sea basado en un dispositivo magnético, óptico o de estado sólido).

Sustancialmente, cualquier circuito puede configurarse para un arreglo funcional dentro de los dispositivos y sistemas para realizar los métodos descritos en la presente descripción. La arquitectura de hardware de tales circuitos, incluye, por ejemplo, un ordenador configurado específicamente, bien conocida por un experto en la técnica, y puede comprender componentes de hardware que incluyen uno o más procesadores (CPU), una memoria de acceso aleatorio (RAM), una memoria de solo lectura (ROM), un medio de almacenamiento de datos interno o externo (por ejemplo, la unidad de disco duro). Tales circuitos también pueden comprender una o más tarjetas gráficas para procesar y enviar información gráfica a los medios de visualización. Los componentes anteriores pueden interconectarse adecuadamente a través de un bus dentro de los circuitos, por ejemplo, dentro de un ordenador de uso específico. Los circuitos pueden comprender además interfaces adecuadas para comunicarse con componentes externos de propósito general, tal como un monitor, teclado, mouse, red, etc. En algunas modalidades, el circuito puede ser capaz del procesamiento paralelo o puede ser parte de una red configurada para el cálculo paralelo o distributivo para aumentar la potencia de procesamiento para los presentes métodos y programas. En algunas modalidades, el código de programa leído desde el medio de almacenamiento puede escribirse en una memoria proporcionada en una placa expandida insertada en el circuito, o una unidad expandida conectada al circuito, y una CPU o similar proporcionada en la placa expandida o la unidad expandida puede realmente realizar una parte o todas las operaciones de acuerdo con las instrucciones de la programación, para lograr las funciones descritas.

Los sistemas de la presente descripción pueden incluir además una "memoria" que sea capaz de almacenar información de manera que sea accesible y recuperable en una fecha posterior por un ordenador. Puede elegirse cualquier estructura de almacenamiento de datos conveniente, en base a los medios usados para acceder a la información almacenada. En ciertos aspectos, la información puede almacenarse en una "memoria permanente" (es decir, una memoria que no se borra por la terminación del suministro eléctrico a una ordenador o procesador) o una "memoria no permanente". El disco duro, el CD-ROM, el disquete, la unidad flash portátil y el DVD del ordenador son todos ejemplos de memoria permanente. La memoria de acceso aleatorio (RAM) es un ejemplo de memoria no permanente. Un archivo en la memoria permanente puede editarse y reescribirse.

Además de los componentes de los dispositivos y sistemas de la presente descripción, por ejemplo, como se describió anteriormente, los sistemas de la descripción pueden incluir una serie de componentes adicionales, tales como dispositivos de salida de datos, por ejemplo, monitores y/o altavoces, dispositivos de entrada de datos, por ejemplo, puertos de interfaz, teclados, etc., componentes de manejo de fluidos, componentes de manejo de diapositivas, fuentes de alimentación, etc.

El analizador hematológico para detectar señales de una muestra que fluye a través de una celda de flujo del analizador hematológico puede incluir ópticas de iluminación y detección de un aparato adecuado para análisis de hematología (que incluye citometría de flujo).

En una modalidad, se realiza un análisis de muestra de sangre por medio de la tecnología de Separación por Dispersión Polarizada de Ángulos Múltiples (MAPSS), con mejora opcional de la información de fluorescencia. Al menos un fotodiodo, o al menos un tubo fotomultiplicador, o ambos al menos un fotodiodo y al menos un tubo fotomultiplicador se usan 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 las señales de pérdida de luz axial (ALL), que miden aproximadamente 0° de dispersión (por ejemplo 0° - 1°), y señales de dispersión de ángulo intermedio (IAS), que miden la dispersión 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 (PSS) de 90° y señales de dispersión lateral despolarizada (DSS) de 90° . Se necesitan tubos fotomultiplicadores adicionales para la fluorescencia (FL1) dentro del(de los) intervalo(s) de longitud de onda apropiado(s), 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, tal como 2 o 3 canales), PSS, DSS y fluorescencia (uno o más canales, tal como 2 canales). La información de estos canales de detección se usa para un análisis adicional de las células sanguíneas. En ciertos aspectos, la óptica de iluminación y detección de un aparato adecuado para el análisis hematológico puede incluir los componentes representados en la Figura 1 de la Patente de Estados Unidos núm. 9,091,625. Con referencia a la Figura 1 de la patente de Estados Unidos núm. 9,091,625, 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 fino 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.

La fuente de luz puede ser un láser. En modalidades alternativas, se selecciona un láser que emite luz a una longitud de onda entre aproximadamente 350 nm y aproximadamente 700 nm; por ejemplo, en una modalidad se usa un láser que emite luz a aproximadamente 488 nm. 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". Sin embargo, pueden usarse otras fuentes de luz tales como, por ejemplo, lámparas (por ejemplo, mercurio, xenón).

Pueden encontrarse 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 vía óptica frontal mostrado en la Figura 1 de la patente de Estados Unidos núm. 5,631,165 incluye una lente esférica plano-convexa 30 y un detector de fotodiodos de dos elementos 32 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 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 lateral polarizada (PSS), y el tercer tubo fotomultiplicador 38 (PMT3) mide la emisión de fluorescencia de aproximadamente 360 nm a aproximadamente 750 nm, en dependencia del colorante fluorescente seleccionado y la fuente de luz empleada. En una modalidad, el PMT3 mide la emisión de fluorescencia de aproximadamente 440 nm a aproximadamente 680 nm, o más específicamente de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 550 nm. El tubo fotomultiplicador recoge señales fluorescentes en un amplio intervalo de longitudes de onda para aumentar la fuerza de la señal. Las emisiones de dispersión lateral y fluorescentes se dirigen a estos tubos fotomultiplicadores mediante divisores de haz dicróicos 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 con relación a los tubos del fotomultiplicador 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 colección por inmersión. El sistema de colección 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, que permite la colección 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.

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).

Medio legible por ordenador

La presente descripción incluye un medio legible por ordenador, que incluye un medio legible por ordenador no transitorio, que almacena instrucciones para diferenciar los eventos de plaquetas del ruido en un citómetro de flujo. Los aspectos de la presente descripción incluyen un medio legible por ordenador que almacena instrucciones que, cuando se ejecutan mediante un dispositivo informático, hacen que el dispositivo informático realice una o más de las etapas para diferenciar los eventos de plaquetas del ruido en un citómetro de flujo.

En ciertos aspectos, el medio legible por ordenador no transitorio almacena instrucciones que, cuando se ejecutan por un dispositivo informático, hacen que el dispositivo informático detecte señales ópticas de una muestra interrogada, en donde las señales ópticas se generan al hacer fluir la muestra a través de un celda de flujo de un citómetro de flujo e interrogación óptica de la muestra que fluye; separar las señales detectadas en señales correspondientes a eventos de glóbulos rojos (RBC) y eventos más pequeños que los eventos de RBC; separar las señales correspondientes a eventos más pequeños que los eventos RBC en eventos de plaquetas aparentes y ruido aparente; convertir señales correspondientes a eventos de plaquetas aparentes y ruido aparente en escala logarítmica; ajustar las señales convertidas mediante el uso del modelo de mezcla gaussiana para generar una distribución ajustada para los eventos de plaquetas aparentes y el ruido aparente; e identificar los eventos de plaquetas aparentes como eventos de plaquetas cuando la ubicación y el ancho de la distribución ajustada están dentro del intervalo para los eventos de plaquetas.

En algunos casos, las instrucciones comprenden instrucciones que hacen que el dispositivo informático antes de la identificación compare la ubicación y el ancho de la distribución ajustada para los eventos de plaquetas aparentes con la ubicación y el ancho de la distribución ajustada para el ruido aparente, en donde cuando las distribuciones están fuera del intervalo aceptado, se ajusta un modelo de mezcla gaussiana con una mayor restricción para el ruido.

- 5 En ciertos aspectos, las instrucciones comprenden instrucciones para convertir los datos sin procesar recopilados en una escala logarítmica (log). La conversión puede implicar una etapa de convertir datos analógicos en datos digitales. La conversión de datos analógicos a datos digitales puede realizarse antes de aplicar el primer umbral, antes de aplicar el segundo umbral o después de aplicar el segundo umbral. En algunos casos, la conversión de datos analógicos a datos digitales para producir datos de logaritmo puede realizarse después de que se aplique el primer umbral y los eventos más pequeños que los eventos de RBC se separen de los eventos de RBC, y antes de aplicar el segundo umbral que separa las señales que son señales de ruido obvias (por ejemplo, señales correspondientes a partículas que tienen un tamaño de menos de 1 centilitro).
- 10 En ciertos aspectos, las instrucciones incluyen instrucciones para aplicar el modelo de mezcla gaussiana a los datos convertidos para separar los eventos aparentes de PLT del ruido. En ciertos casos, las instrucciones incluyen instrucciones para incluir el ajuste de las señales convertidas mediante el uso del modelo de mezcla gaussiana para generar una distribución ajustada para los eventos de plaquetas aparentes y el ruido aparente. En ciertas modalidades, cuando la ubicación y el ancho de la distribución ajustada de los eventos aparentes de PLT están dentro del intervalo de los eventos aparentes de PLT, los eventos aparentes de PLT se identifican como plaquetas.
- 15 En ciertos casos, las instrucciones incluyen instrucciones para, antes de la identificación, comparar la ubicación y el ancho de la distribución ajustada para los eventos de plaquetas aparentes con la ubicación y el ancho de la distribución ajustada para el ruido aparente, en donde cuando las distribuciones están fuera del intervalo aceptado, la fecha convertida puede ajustarse de manera diferente. Por ejemplo, los datos convertidos pueden ajustarse mediante el uso de un modelo de mezcla gaussiana con una mayor restricción para el ruido, seguido de la identificación de eventos de PLT y ruido.
- 20 En ciertos casos, las señales detectadas por el citómetro de flujo y analizadas por los presentes métodos pueden incluir una o más de la dispersión de ángulo intermedio (IAS), la dispersión lateral polarizada (PSS) o la pérdida de luz axial (ALL). En otro caso, las señales detectadas por el citómetro de flujo y analizadas por los presentes métodos pueden incluir la dispersión de ángulo intermedio (IAS) y la dispersión lateral polarizada (PSS).
- 25 En algunos casos, un medio legible por ordenador de la presente descripción almacena instrucciones que hacen que un dispositivo informático realice las etapas para identificar una muestra que comprende agregados de plaquetas, al corregir opcionalmente el recuento de WBC en función del número detectado de agregados de PLT y/o marcar la muestra si el número de agregados de PLT impide un análisis celular preciso.
- 30 En algunos aspectos, el medio legible por ordenador no transitorio almacena instrucciones que, cuando se ejecutan por un dispositivo informático, hacen que el dispositivo informático detecte señales ópticas de una muestra interrogada, en donde las señales ópticas se generan al hacer fluir la muestra a través de un celda de flujo de un citómetro de flujo e interrogación óptica de la muestra que fluye, en donde la muestra se incuba con un reactivo, que comprende un colorante fluorescente permeable a las células y un agente de lisis de glóbulos rojos, durante un período de tiempo suficiente para lisar los glóbulos rojos y para teñir con fluorescencia las células que contienen núcleo; identificar eventos asociados con una señal fluorescente por debajo de un umbral, en donde los eventos identificados tienen una señal fluorescente por debajo de la señal fluorescente de los glóbulos blancos (WBC); y determinar el tamaño de los eventos identificados, en donde la presencia de eventos que tienen un tamaño mayor que las plaquetas indica que la muestra comprende agregados de plaquetas.
- 35 En ciertas modalidades, las instrucciones comprenden instrucciones que hacen que el dispositivo informático seleccione los eventos identificados que son de un tamaño mayor que el de las plaquetas; ajustar una línea a los eventos seleccionados; extender la línea a las señales asociadas con los WBC; y reclasificar los WBC cerca de la línea como agregados de plaquetas.
- 40 En ciertas modalidades, las instrucciones de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción pueden codificarse en un medio legible por ordenador en forma de "programación", donde el término "medio legible por ordenador" como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier medio de almacenamiento o transmisión que participa en proporcionar instrucciones y/o datos a un ordenador para su ejecución y/o procesamiento. Los ejemplos de medios de almacenamiento incluyen un disquete, disco duro, disco óptico, disco magneto-óptico, CD-ROM, CD-R, cinta magnética, tarjeta de memoria no volátil, ROM, DVD-ROM, disco Blue-ray, disco de estado sólido y almacenamiento conectado a la red (NAS), ya sea que dichos dispositivos sean internos o externos al ordenador. Un archivo que contiene información puede "almacenarse" en un medio legible por ordenador, donde "almacenar" significa grabar la información de manera que sea accesible y recuperable en una fecha posterior por un ordenador.
- 45 El método implementado por ordenador descrito en la presente descripción puede ejecutarse mediante el uso de la programación que puede escribirse en uno o más de cualquier número de lenguajes de programación informáticos. Tales lenguajes incluyen, por ejemplo, Java (Sun Microsystems, Inc., Santa Clara, California), Visual Basic (Microsoft Corp., Redmond, Washington) y C++ (AT&T Corp., Bedminster, Nueva Jersey), así como también muchos otros.
- 50 Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no por medio de limitación.
- 55
- 60
- 65

Ejemplos

Ejemplo 1: Método para diferenciar las plaquetas del ruido mediante el uso de un analizador hematológico

5 Las plaquetas son las células más pequeñas de la sangre y su detección a menudo está limitada por el ruido en el analizador. El ruido puede ser causado por la fuente de luz (1 % de fluctuación en la potencia del láser), la electrónica de amplificación u otras fuentes. Aquí se recopiló información de la dispersión de la luz para una pequeña cantidad de eventos de ruido y todas las plaquetas que están por encima del ruido. Sobre estos datos se usó un algoritmo EM (Expectativa-Maximización) para encontrar la distribución más probable del ruido y las plaquetas. Este algoritmo mejora la precisión de la enumeración de plaquetas porque el algoritmo puede estimar cuántas plaquetas están enmascaradas por el ruido.

10 Se usa un analizador hematológico con una celda de flujo, detectores de dispersión frontal y lateral y un algoritmo de software para estimar el número de plaquetas en un espécimen de sangre en presencia de ruido.

15 El analizador hematológico se configura con un umbral bajo en el canal de activación. El umbral se establece tan bajo que se ve un gran pico de ruido en el extremo inferior de la distribución de plaquetas. Los datos primero se transforman logarítmicamente y luego se analizan mediante un algoritmo EM que ajusta una distribución gaussiana al ruido así como también a las plaquetas. La salida del algoritmo es la fracción de plaquetas del total de eventos capturados en la recogida de datos. Los recuentos de eventos de plaquetas se convierten luego en la concentración de plaquetas en la sangre mediante el uso del volumen de sangre, la dilución, el régimen de flujo y el tiempo de recogida de datos.

20 Los datos activados en PSS, el logaritmo visualizado transformado en IAS3 y PSS se representan en la Figura 3. Como se ve en la Figura 3, el primer ruido obvio se elimina por las dos líneas paralelas. Solo los eventos que caen entre las dos líneas paralelas se consideran más adelante.

25 Los eventos que caen entre las dos líneas paralelas se trazan como un histograma (ver la Figura 4) y se usa un algoritmo EM para obtener las distribuciones más probables del ruido (curva en el lado izquierdo del gráfico) y las plaquetas (curva en el lado derecho del gráfico).

30 La Figura 4 muestra la presencia de plaquetas dentro del pico de ruido. La curva del lado izquierdo del gráfico se relaciona con el ruido y la curva del lado derecho del gráfico corresponde a las plaquetas. El algoritmo EM encuentra la distribución de plaquetas y ruido más probable que se ajusta a los datos observados. El resultado final para este caso es que el 25,5 % de los eventos filtrados son ruido y el 74,5 % de los eventos filtrados son plaquetas. Con estos números, podemos derivar fácilmente el recuento total de eventos de plaquetas y la concentración de plaquetas en la sangre.

35 Las Figuras 5 y 6 ilustran otro ejemplo para diferenciar las plaquetas del ruido en una muestra que tiene una concentración de plaquetas más baja que la de las Figuras 3 y 4. La Figura 5 representa el uso de dos líneas paralelas para eliminar el ruido más obvio. Los eventos que caen entre las dos líneas paralelas se trazan como un histograma y se usa un algoritmo EM para obtener las distribuciones más probables de ruido (curva en el lado izquierdo del gráfico) y plaquetas (curva en el lado derecho del gráfico) (ver la Figura 6).

40 Como se ve en la Figura 6, la curva del lado izquierdo del gráfico es la distribución de ruido y la curva del lado derecho del gráfico es la distribución de plaquetas. Casi la mitad de los recuentos de plaquetas están ocultos por debajo del pico de ruido. Pero el algoritmo EM proporciona una buena estimación de los eventos plaquetarios en esta medición. El resultado final para este caso es que el 72 % de los eventos filtrados son ruido y el 28 % de los eventos filtrados son plaquetas.

45 El uso de un umbral más bajo permite por lo tanto el recuento de plaquetas por debajo del umbral después de identificar y filtrar el ruido.

Ejemplo 2: Método para clasificar agregados de PLT mediante el uso de un analizador hematológico.

55 La Figura 7A representa un gráfico para PSS (eje X) y FL (eje Y) registrado desde un citómetro de flujo. Los eventos que tienen señales de FL por debajo de las de WBC se seleccionan como agregados de PLT y se indican con +. La Figura 7B representa la clasificación de agregados de PLT adicionales al extender una línea ajustada a los agregados de PLT identificados en la Figura 7A en señales para WBC. Los WBC reclasificados como agregados de PLT se representan con +.

60 La Figura 8A representa un gráfico para PSS (eje X) y FL (eje Y) registrado desde un citómetro de flujo. Los eventos que tienen señales de FL por debajo de las de WBC se seleccionan como agregados de PLT y se indican con +. La Figura 8B representa la clasificación de agregados de PLT adicionales mediante la extensión de una línea 3D ajustada a los agregados de PLT identificados en señales para los WBC. Los WBC que se reclasifican como agregados de PLT se indican con +.

65

Aunque la invención anterior se ha descrito en algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de entendimiento, es fácilmente evidente para los expertos en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que pueden hacerse ciertos cambios y modificaciones a la misma sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

5 En consecuencia, lo anterior meramente ilustra los principios de la invención. Se apreciará que los expertos en la técnica serán capaces de concebir varios arreglos que, aunque no se describen o muestran explícitamente en la presente descripción, expresa los principios de la invención. Además, todos los ejemplos y el lenguaje condicional
10 citado en la presente descripción pretenden principalmente auxiliar al lector en la comprensión de los principios de la invención y los conceptos aportados por los inventores para promover la técnica, y se construyen sin limitarse a aquellos ejemplos y condiciones mencionadas específicamente. Además, todas las declaraciones en la presente descripción que citan principios, aspectos, y modalidades de la invención, así como también los ejemplos específicos de estos, pretenden abarcar los equivalentes estructurales y funcionales de estos. El alcance de la presente invención,
15 por lo tanto, no pretende limitarse a las modalidades ilustrativas que se muestran y describen en la presente descripción. En su lugar, el alcance se expresa por las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para diferenciar los eventos de plaquetas del ruido en un citómetro de flujo, que comprende:
 - 5 hacer fluir una muestra que comprende plaquetas a través de una celda de flujo del citómetro de flujo; interrogar ópticamente la muestra que fluye a través de la celda de flujo; detectar señales ópticas de la muestra interrogada; separar las señales detectadas en señales correspondientes a eventos de glóbulos rojos (RBC) y eventos más pequeños que los eventos de RBC;
 - 10 separar las señales correspondientes a eventos más pequeños que los eventos RBC en eventos de plaquetas aparentes y ruido aparente; convertir las señales correspondientes a eventos de plaquetas aparentes y ruido aparente en escala logarítmica; ajustar las señales convertidas mediante el uso del modelo de mezcla gaussiana para generar una
 - 15 distribución ajustada para los eventos de plaquetas aparentes y el ruido aparente; e identificar los eventos de plaquetas aparentes como eventos de plaquetas cuando la ubicación y el ancho de la distribución ajustada están dentro del intervalo para los eventos de plaquetas.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el método comprende previo a la identificación, comparar la ubicación y el ancho de la distribución ajustada para los eventos de plaquetas aparentes con la ubicación y el ancho de la distribución ajustada para el ruido aparente, en donde cuando las distribuciones son fuera del intervalo aceptado, se ajusta un modelo de mezcla gaussiana con una mayor restricción para el ruido.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde las señales comprenden una o más de dispersión de ángulo intermedio (IAS), dispersión lateral polarizada (PSS) o pérdida de luz axial (ALL).
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las señales comprenden la dispersión de ángulo intermedio (IAS) y la dispersión lateral polarizada (PSS).
- 30 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra es una muestra de sangre total.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la muestra de sangre total es una muestra de sangre total sin lisar.
- 35 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde interrogar ópticamente a las partículas comprende excitar las células mediante el uso de un láser.
8. Un medio legible por ordenador no transitorio que almacena instrucciones que, cuando se ejecutan por un dispositivo informático, hacen al dispositivo informático en combinación con un citómetro de flujo:
 - 40 detectar señales ópticas de una muestra interrogada, en donde las señales ópticas se generan al hacer fluir la muestra a través de una celda de flujo del citómetro de flujo y al interrogar ópticamente la muestra que fluye;
 - 45 separar las señales detectadas en señales correspondientes a eventos de glóbulos rojos (RBC) y eventos más pequeños que los eventos de RBC; separar las señales correspondientes a eventos más pequeños que los eventos RBC en eventos de plaquetas aparentes y ruido aparente; convertir señales correspondientes a eventos de plaquetas aparentes y ruido aparente en escala logarítmica;
 - 50 ajustar las señales convertidas mediante el uso del modelo de mezcla gaussiana para generar una distribución ajustada para los eventos de plaquetas aparentes y el ruido aparente; e identificar los eventos de plaquetas aparentes como eventos de plaquetas cuando la ubicación y el ancho de la distribución ajustada estén dentro del intervalo de eventos de plaquetas.
- 55 9. El medio legible por ordenador no transitorio de conformidad con la reivindicación 8, en donde las instrucciones comprenden instrucciones que hacen al dispositivo informático: previo a la identificación, comparar la ubicación y el ancho de la distribución ajustada para los eventos de plaquetas aparentes con la ubicación y el ancho de la distribución ajustada para el ruido aparente, en donde cuando las distribuciones están fuera del intervalo aceptado, ajustar un modelo de mezcla gaussiana con una
- 60 mayor restricción por ruido.
10. El medio legible por ordenador no transitorio de cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en donde las señales comprenden una o más de la dispersión de ángulo intermedio (IAS), la dispersión lateral polarizada (PSS) o la pérdida de luz axial (ALL).
- 65 11. El medio legible por ordenador no transitorio de cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde las señales

comprenden la dispersión del ángulo intermedio (IAS) y la dispersión lateral polarizada (PSS).

5 12. El medio legible por ordenador no transitorio de cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en donde la muestra es una muestra de sangre total.

13. El medio legible por ordenador no transitorio de conformidad con la reivindicación 12, en donde la muestra es una muestra de sangre no lisada.

10 14. Un citómetro de flujo, que comprende:

una celda de flujo;

un sistema de interrogación de partículas ópticas acoplado ópticamente a la celda de flujo;

un dispositivo informático; y

el medio legible por ordenador no transitorio de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13.

15

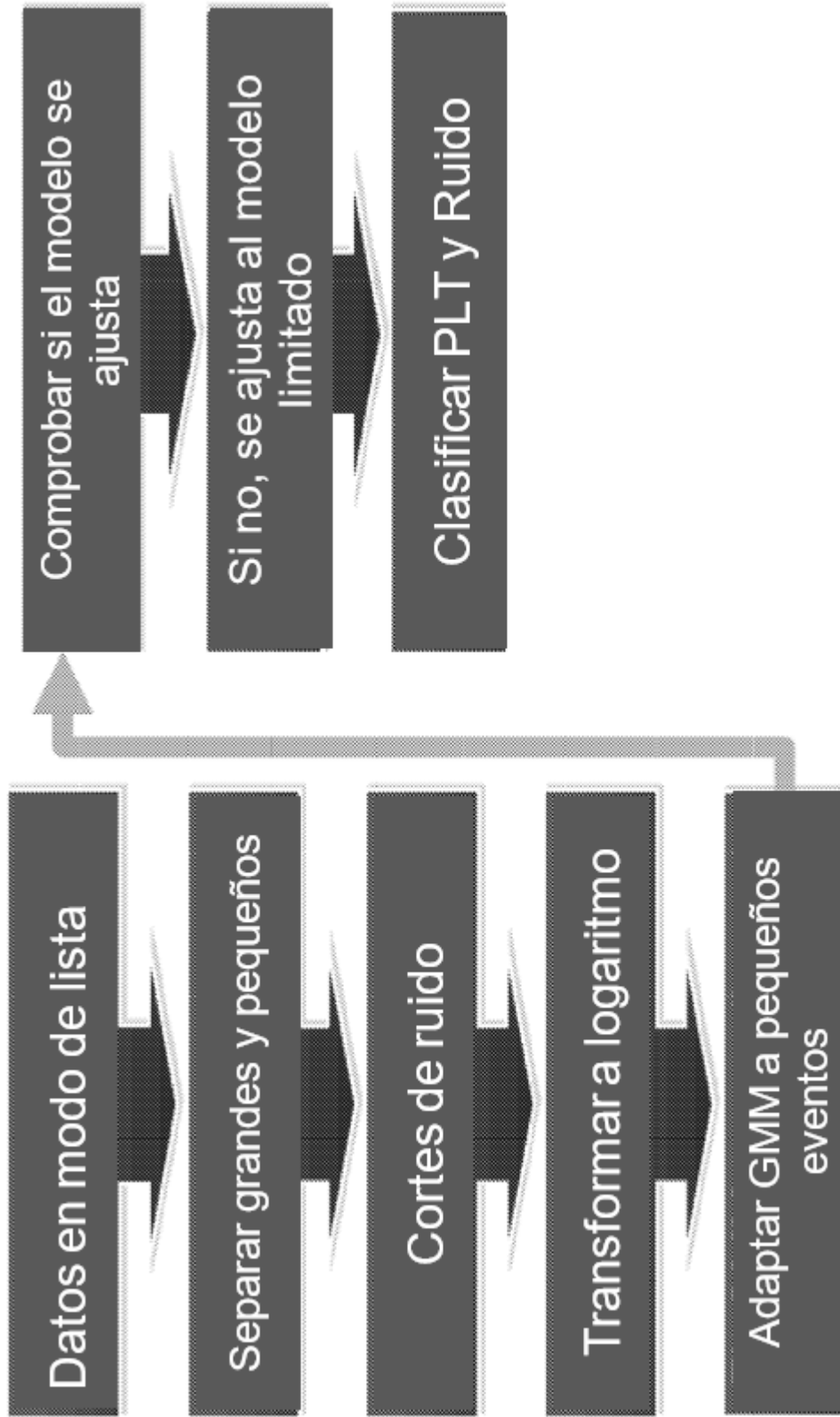


Figura 1

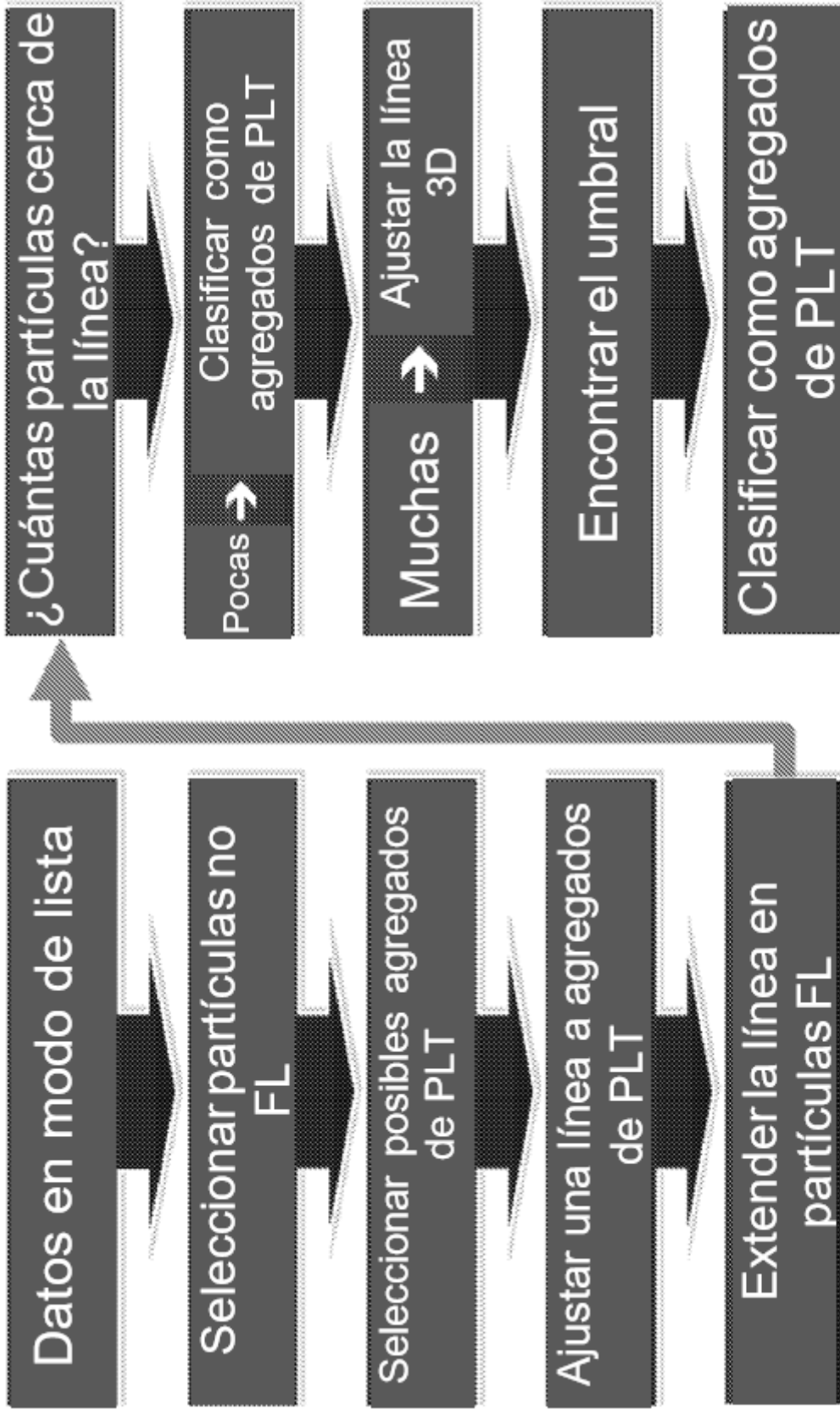


Figura 2

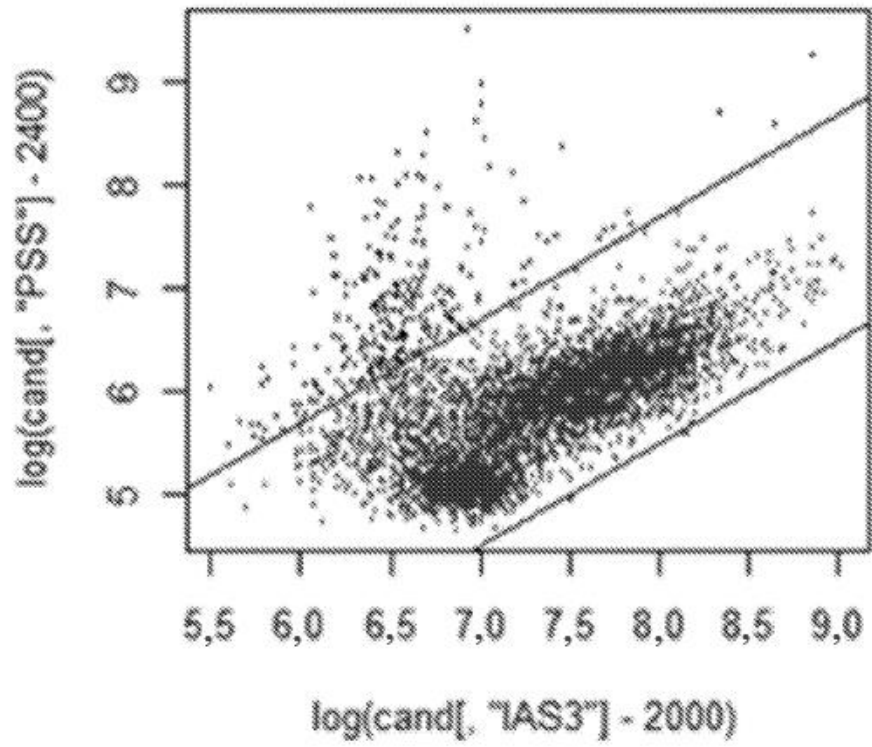


Figura 3

Curvas de densidad

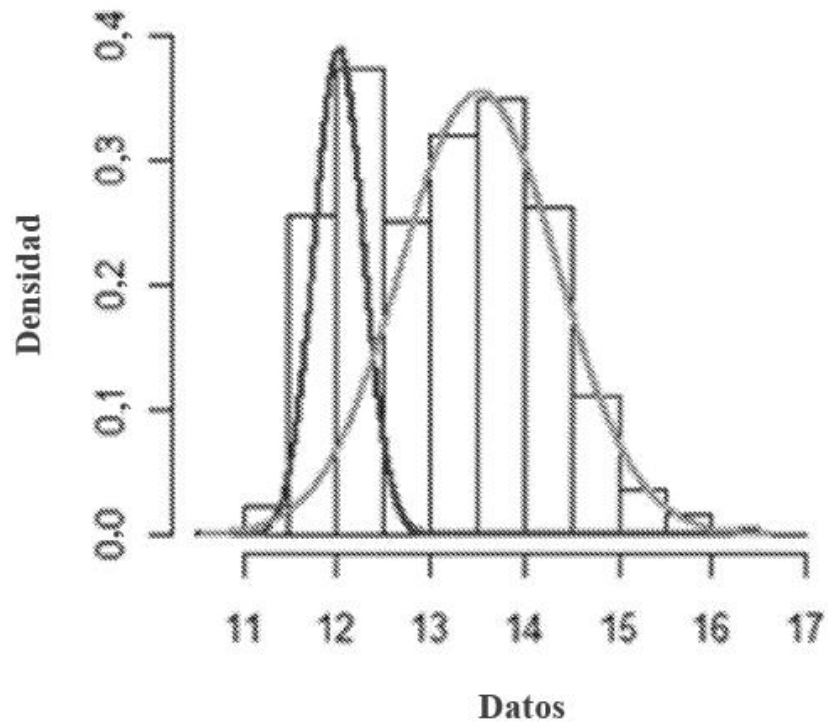


Figura 4

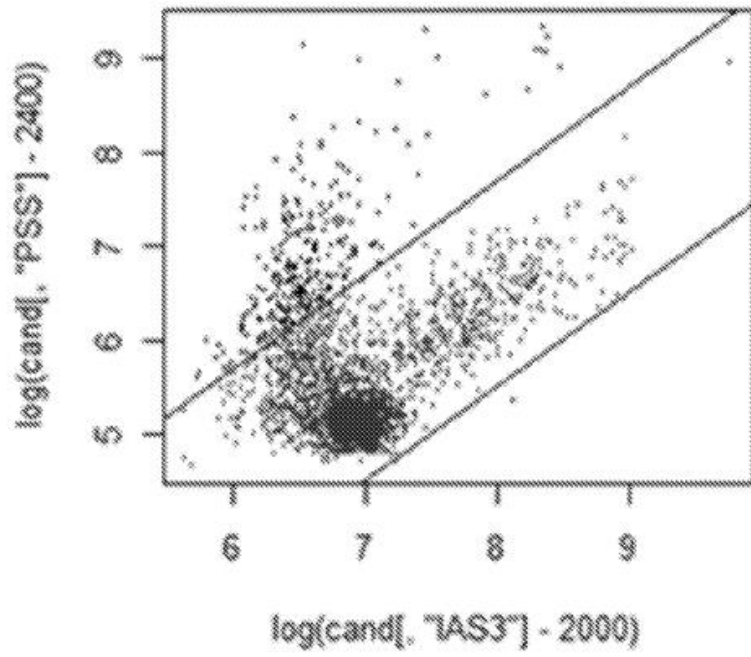


Figura 5

Curvas de densidad

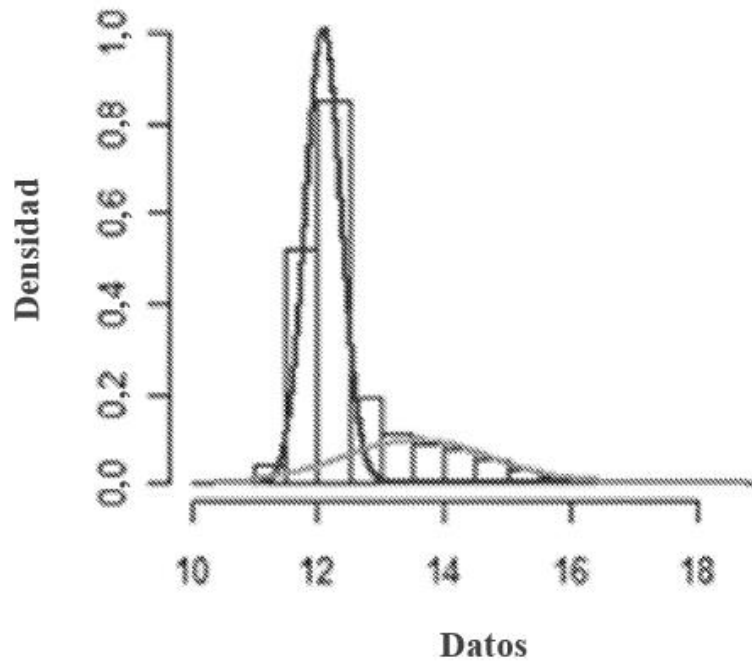


Figura 6

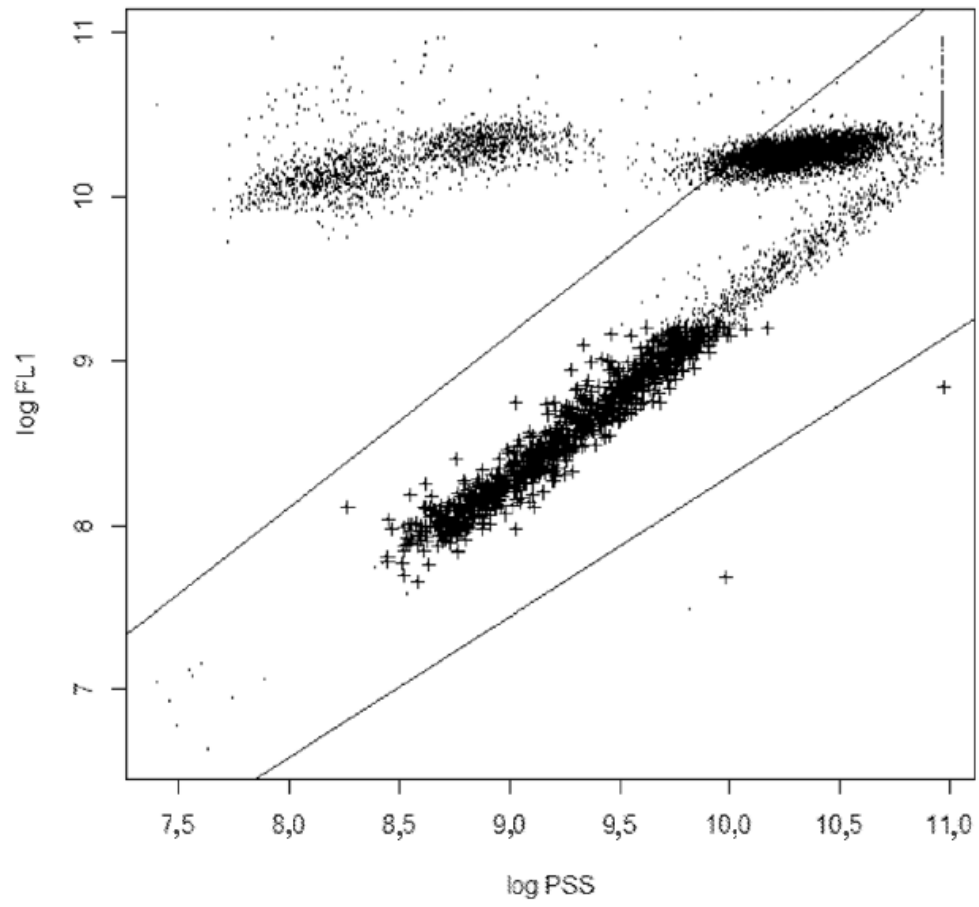


Figura 7A

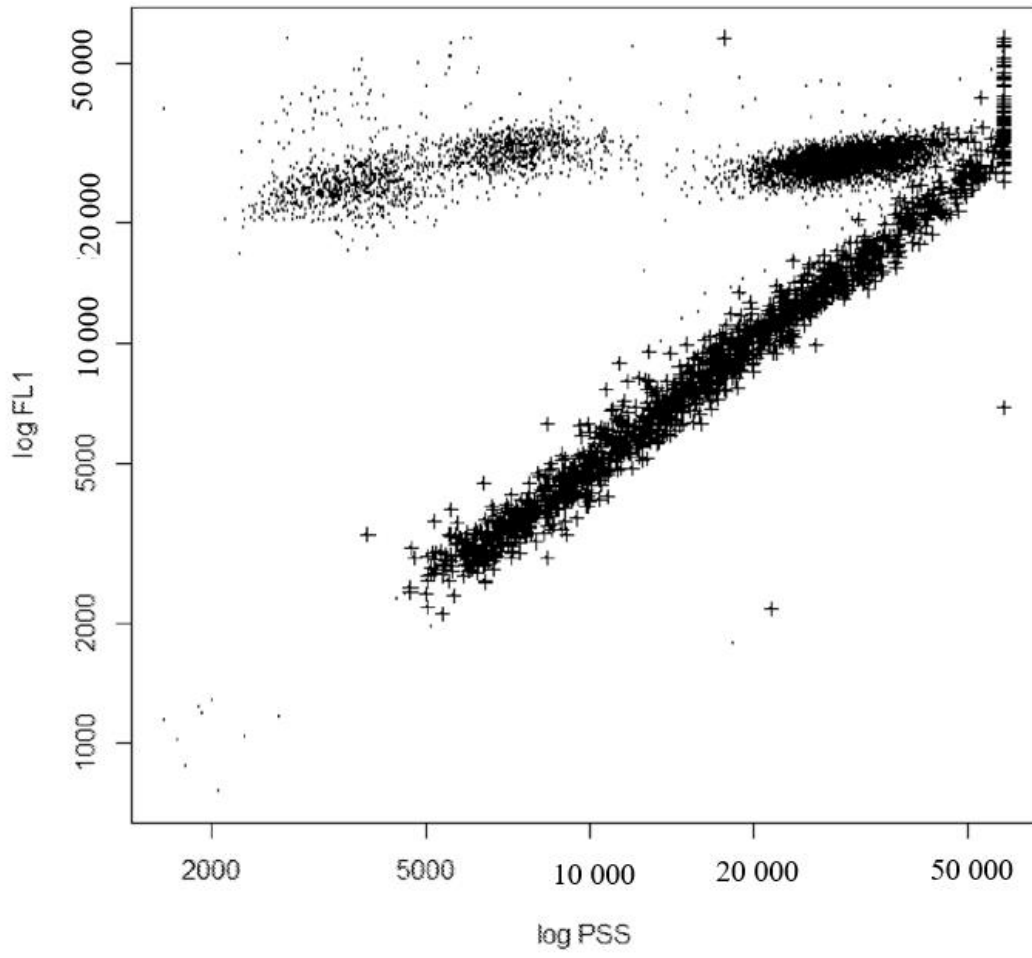


Figura 7B

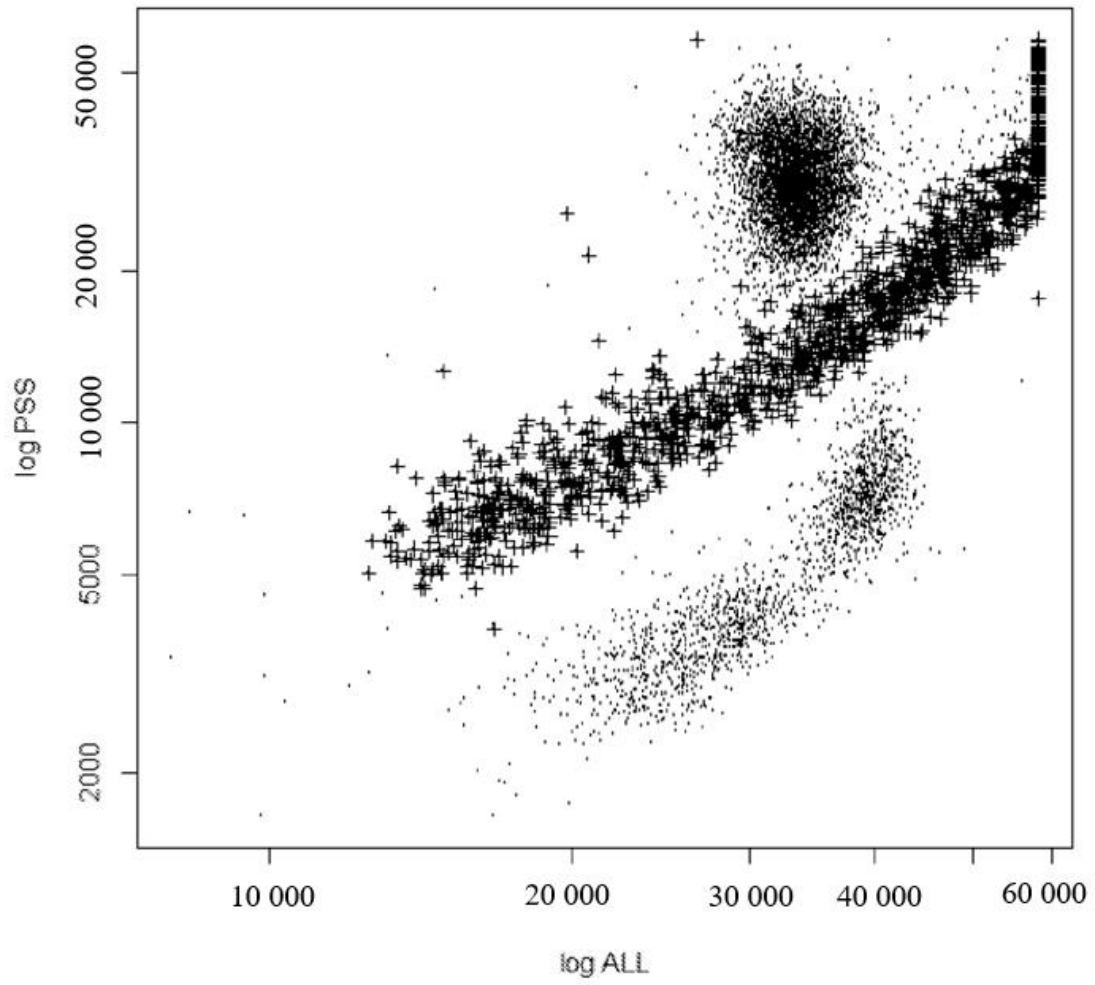


Figura 8A

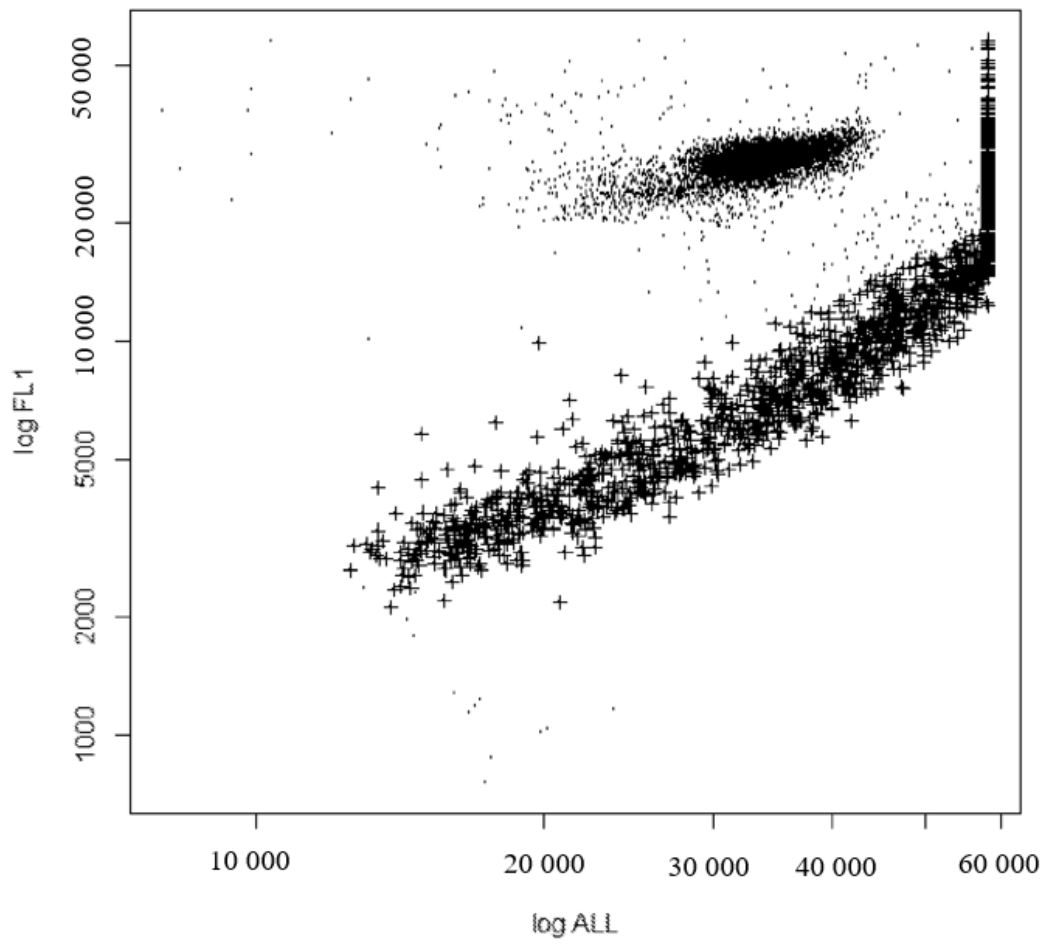


Figura 8B