

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 869 919**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

**G01N 21/47** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

**G01N 15/14** (2006.01)

**G01N 15/00** (2006.01)

**G01N 15/10** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013** **PCT/US2013/077175**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14143332**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013** **E 13877829 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2021** **EP 2972321**

54 Título: **Sistema de análisis de glóbulos blancos**

30 Prioridad:

**12.03.2013 US 201361777966 P**

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

**26.10.2021**

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (100.0%)**  
**100 Abbott Park Road**  
**Abbott Park, IL 60064-6008, US**

72 Inventor/es:

**WU, JIONG**

74 Agente/Representante:

**FERNÁNDEZ POU, Felipe**

ES 2 869 919 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 de análisis de glóbulos blancos

5 Referencia cruzada

Esta solicitud reivindica el beneficio de la patente provisional de Estados Unidos núm. 61/777,966, presentada el 12 de marzo de 2013.

10 Introducción

El recuento y la clasificación precisa de glóbulos blancos (WBC) en muestras de sangre total mediante el uso de un analizador hematológico automático es un procedimiento de diagnóstico esencial. El análisis de leucocitos típicamente se logra mediante la lisis simultánea de glóbulos rojos (RBC, eritrocitos) y la conservación de WBC en una muestra de sangre total. Típicamente, se necesitan uno o más reactivos de WBC para realizar estas funciones y para facilitar el análisis de los WBC en los analizadores de hematología modernos.

La calidad del recuento y la diferenciación de los WBC depende en gran medida de los métodos y los reactivos asociados que se usan para realizar el análisis. La formulación de reactivos de análisis de leucocitos robustos sigue siendo uno de los principales desafíos en la industria de la hematología. En principio, los reactivos de WBC robustos dan como resultado un análisis de WBC preciso. Idealmente, los reactivos de WBC bien formulados deberían facilitar (1) la lisis completa de los glóbulos rojos (RBC) en condiciones estándar, típicamente en un marco de tiempo de aproximadamente 30 segundos o menos; (2) romper o solubilizar grandes fragmentos de glóbulos rojos en trozos más pequeños; y (3) proteger los WBC del proceso de lisis de glóbulos rojos para que los WBC puedan contarse con precisión y clasificarse adecuadamente.

Si una muestra de sangre no está suficientemente lisada, los glóbulos rojos no lisados, incluso en porcentajes o concentraciones muy pequeños, o fragmentos de glóbulos rojos más grandes, pueden interferir con el análisis de WBC, ya que es difícil separar o diferenciar glóbulos rojos o fragmentos de glóbulos rojos de los linfocitos (los leucocitos más pequeños) mediante el uso de técnicas tradicionales de análisis de leucocitos. Si la muestra de sangre se lisa en exceso, la clasificación de los WBC puede verse muy afectada por un daño excesivo en las membranas celulares de los WBC. En consecuencia, existe la necesidad de reactivos, sistemas y métodos de análisis de WBC mejorados que puedan lograr estos objetivos.

El documento Estados Unidos 2012/282598 A1 describe un sistema de acuerdo con la reivindicación 1 para realizar un análisis diferencial de glóbulos blancos en una muestra de sangre total.

Resumen

La presente descripción incluye reactivos, sistemas y métodos de análisis de WBC que pueden usarse para analizar una muestra de sangre total para identificar, clasificar y/o cuantificar glóbulos blancos (WBC) y subpoblaciones de WBC en la muestra. Los reactivos de análisis de WBC de la presente descripción generalmente incluyen al menos un tinte fluorescente permeable a la membrana, un reactivo protector de WBC y un tensioactivo. Los reactivos WBC incluyen una cantidad adecuada de un componente de ajuste de la osmolalidad para ajustar la osmolalidad del reactivo WBC en un intervalo deseado.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un sistema de acuerdo con la reivindicación 1 para realizar un análisis diferencial de glóbulos blancos (WBC) en una muestra de sangre total, comprendiendo los sistemas: a) un analizador hematológico, el analizador hematológico comprende:

una fuente de excitación posicionada para excitar partículas dentro de la muestra de sangre; una pluralidad de detectores que incluyen (1) un detector de pérdida de luz axial posicionado para medir la pérdida de luz axial de la muestra de sangre excitada, (2) un detector de dispersión de ángulo intermedio posicionado para medir dispersiones de ángulo intermedio de la muestra de sangre excitada, (3) un detector de dispersión lateral posicionado para medir dispersiones laterales polarizadas de gran ángulo de la muestra de sangre excitada, (4) un detector de dispersión lateral despolarizado posicionado para medir la dispersión lateral despolarizada de gran ángulo de la muestra de sangre excitada, y (5) un detector de fluorescencia posicionado para medir la fluorescencia emitida por la muestra de sangre excitada; y un procesador configurado para: (I) recibir las mediciones de (1) pérdida de luz axial, (2) dispersiones de ángulo intermedio, (3) dispersiones laterales polarizadas de gran ángulo, (4) dispersiones laterales despolarizadas de gran ángulo y (5) fluorescencia de la pluralidad de detectores, y (II) 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; y (b) un reactivo para analizar los leucocitos en la muestra, comprendiendo el reactivo: un tinte fluorescente permeable a la membrana; un agente protector de WBC; y una osmolalidad

componente de ajuste; en donde la concentración del tinte fluorescente permeable a la membrana es suficiente para facilitar la identificación de una o más células en la muestra que contienen un núcleo mediante el uso del analizador hematológico; en donde la concentración del componente de ajuste de osmolalidad es suficiente para facilitar la identificación de una pluralidad de subpoblaciones de WBC en la muestra mediante el uso del analizador hematológico; y en donde los intervalos de concentración del componente de ajuste de osmolalidad varían de 0,1 % a 0,5 % y en donde el componente de ajuste de osmolalidad comprende cloruro de amonio y cloruro de sodio, para separar una pluralidad de subpoblaciones de WBC entre sí cuando se analizan con el analizador hematológico.

En algunas modalidades, el tinte fluorescente permeable a la membrana es naranja de acridina, yoduro de hexidio, SYTO RNA Select, SYTO 12 o SYTO 14. En algunas modalidades, la concentración del tinte fluorescente permeable a la membrana en el reactivo varía de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 0,0005%. En algunas modalidades, la concentración del tinte fluorescente permeable a la membrana en el reactivo varía de aproximadamente 0,01  $\mu$ M a aproximadamente 15  $\mu$ M. En algunas modalidades, el agente protector de WBC es formaldehído, glutaraldehído, butoxietanol, fenoxietanol o alcohol isopropílico. En algunas modalidades, la concentración del agente protector de WBC varía de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 1,0 %. En algunas modalidades, el reactivo comprende además un tensioactivo. En algunas modalidades, el tensioactivo es saponina. En algunas modalidades, la concentración del tensioactivo varía de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,05 %. En algunas modalidades, el reactivo comprende además un componente tamponador de pH. En algunas modalidades, el componente tamponador de pH es acetato de sodio o bicarbonato de sodio. En algunas modalidades, la concentración del componente tamponador de pH varía de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,5 %. En algunas modalidades, el reactivo comprende además un agente antimicrobiano. En algunas modalidades, el agente antimicrobiano es proclina. En algunas modalidades, la concentración del agente antimicrobiano varía de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,1 %. En algunas modalidades, el pH del reactivo varía de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 12,5 unidades de pH. En algunas modalidades, la osmolalidad del reactivo varía de aproximadamente 25 a aproximadamente 350 mOsm.

En algunas modalidades, el procesador está configurado además para preseleccionar las mediciones recibidas para eliminar de la consideración cualquier partícula que no alcance el umbral de fluorescencia. En algunas modalidades, el detector de pérdida de luz axial mide la pérdida de luz axial a una dispersión de 0°. En algunas modalidades, el detector del ángulo de dispersión intermedio mide la dispersión del ángulo de luz de aproximadamente 3° a aproximadamente 15°. En algunas modalidades, la pluralidad de detectores incluye uno o más tubos fotomultiplicadores. En algunas modalidades, la fuente de excitación es un láser. En algunas modalidades, el láser emite luz a una longitud de onda correspondiente al tinte fluorescente. En algunas modalidades, el tinte fluorescente se selecciona para que se corresponda con la fuente de excitación.

En algunas modalidades, el sistema comprende además un subsistema de incubación para diluir la muestra de sangre con el reactivo. En algunas modalidades, el subsistema de incubación se configura para incubar la muestra de sangre con el reactivo durante un período de tiempo inferior a aproximadamente 25 segundos. En algunas modalidades, el subsistema de incubación se configura para incubar la muestra de sangre con el reactivo durante un período de tiempo inferior a aproximadamente 17 segundos. En algunas modalidades, el subsistema de incubación se configura para incubar la muestra de sangre con el reactivo durante un período de tiempo inferior a aproximadamente 9 segundos. En algunas modalidades, el subsistema de incubación se configura para incubar la muestra de sangre con el reactivo a una temperatura que varía de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C. En algunas modalidades, el subsistema de incubación se configura para incubar la muestra de sangre con el reactivo a una temperatura de aproximadamente 40 °C.

#### Breve descripción de las figuras

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

La Figura 1 muestra un diagrama de dispersión de WBC (FL1 frente a IAS) que se obtuvo mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene naranja de acridina 3,8  $\mu$ M como colorante fluorescente. Los neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos se muestran en el diagrama de dispersión.

La Figura 2 muestra un diagrama de dispersión de WBC (FL1 vs. IAS) que se obtuvo mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene yoduro de hexidio 1,3  $\mu$ M como colorante fluorescente. Los neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos se muestran en el diagrama de dispersión.

La Figura 3 muestra un diagrama de dispersión de WBC (FL1 vs. IAS) que se obtuvo mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene 1,3  $\mu$ M SYTO RNA Select como tinte fluorescente. Los neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos se muestran en el diagrama de dispersión.

La Figura 4 muestra un diagrama de dispersión de WBC (FL1 vs. IAS) que se obtuvo mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene SYTO 12 1,3  $\mu\text{M}$  como colorante fluorescente. Los neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos se muestran en el diagrama de dispersión.

5 La Figura 5 muestra un diagrama de dispersión de WBC (FL1 vs. IAS) que se obtuvo mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene SYTO 14 1,3  $\mu\text{M}$  como colorante fluorescente. Los neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos se muestran en el diagrama de dispersión.

10 La Figura 6A muestra dos diagramas de dispersión de WBC (PSS vs. ALL y FL1 vs. IAS) que se obtuvieron mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene naranja de acridina como colorante fluorescente a una concentración de 11,3  $\mu\text{M}$  (IX). Los neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión.

15 La Figura 6B muestra dos diagramas de dispersión de WBC (PSS vs. ALL y FL1 vs. IAS) que se obtuvieron mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene naranja de acridina como colorante fluorescente a una concentración de 1,13  $\mu\text{M}$  (0,1X). Los neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión.

20 La Figura 6C muestra dos diagramas de dispersión de WBC (PSS vs. ALL y FL1 vs. IAS) que se obtuvieron mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene naranja de acridina como colorante fluorescente a una concentración de 0,11  $\mu\text{M}$  (0,01X). Los neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión.

25 La Figura 6D muestra dos diagramas de dispersión de WBC (PSS vs. ALL y FL1 vs. IAS) que se obtuvieron mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene naranja de acridina como colorante fluorescente a una concentración de 0,022  $\mu\text{M}$  (0,002X). Los neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión.

30 La Figura 7A muestra dos diagramas de dispersión de WBC (ALL vs. IAS y FL1 vs. ALL) obtenido mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene formaldehído al 0,22 % (la misma formulación que el ejemplo de reactivo de análisis de WBC #1). Los neutrófilos/eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión.

35 La Figura 7B muestra dos diagramas de dispersión de WBC (PSS vs. ALL y FL1 vs. IAS) obtenido mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene formaldehído al 0,22 % (la misma formulación que el ejemplo de reactivo de análisis de WBC #1). Los neutrófilos/eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión.

40 La Figura 7C muestra dos diagramas de dispersión de WBC (PSS vs. IAS y FL1 vs. PSS) obtenido mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene formaldehído al 0,22 % (la misma formulación que el ejemplo de reactivo de análisis de WBC #1). Los neutrófilos/eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión.

45 La Figura 8A muestra dos diagramas de dispersión de WBC (TODOS vs. IAS y FL1 vs. ALL) obtenido mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene glutaraldehído al 0,2 % (la misma formulación que el ejemplo de reactivo de análisis de WBC #6). Los neutrófilos/eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión.

50 La Figura 8B muestra dos diagramas de dispersión de WBC (PSS vs. ALL y FL1 vs. IAS) obtenido mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene glutaraldehído al 0,2 % (la misma formulación que el ejemplo de reactivo de análisis de WBC #6). Los neutrófilos/eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión.

55 La Figura 8C muestra dos diagramas de dispersión de WBC (PSS vs. IAS y FL1 vs. PSS) obtenido mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene glutaraldehído al 0,2 % (la misma formulación que el ejemplo de reactivo de análisis de WBC #6). Los neutrófilos/eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión.

60 La Figura 9A muestra dos diagramas de dispersión de WBC (ALL vs. IAS y FL1 vs. ALL) obtenido mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene 0,5 % de butoxietanol (la misma formulación que el ejemplo de reactivo de análisis de WBC #7). Los neutrófilos/eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión.

65 La Figura 9B muestra dos diagramas de dispersión de WBC (PSS vs. ALL y FL1 vs. IAS) obtenido mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene 0,5 % de butoxietanol (la misma formulación que el ejemplo de

reactivo de análisis de WBC #7). Los neutrófilos/eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión.

La Figura 9C muestra dos diagramas de dispersión de WBC (PSS vs. IAS y FL1 vs. PSS) obtenido mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene 0,5 % de butoxietanol (la misma formulación que el ejemplo de reactivo de análisis de WBC #7). Los neutrófilos/eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión.

La Figura 10A muestra dos diagramas de dispersión de WBC (ALL vs. IAS y FL1 vs. ALL) obtenido mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene 0,5 % de fenoxietanol (la misma formulación que el ejemplo de reactivo de análisis de WBC #8). Los neutrófilos/eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión.

La Figura 10B muestra dos diagramas de dispersión de WBC (PSS vs. ALL y FL1 vs. IAS) obtenido mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene 0,5 % de fenoxietanol (la misma formulación que el ejemplo de reactivo de análisis de WBC #8). Los neutrófilos/eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión.

La Figura 10C muestra dos diagramas de dispersión de WBC (PSS vs. IAS y FL1 vs. PSS) obtenido mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene 0,5 % de fenoxietanol (la misma formulación que el ejemplo de reactivo de análisis de WBC #8). Los neutrófilos/eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión.

La Figura 11A muestra dos diagramas de dispersión de WBC (ALL vs. IAS y FL1 vs. ALL) obtenido mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene 0,5 % de alcohol isopropílico (la misma formulación que el ejemplo de reactivo de análisis de WBC #9). Los neutrófilos/eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión.

La Figura 11B muestra dos diagramas de dispersión de WBC (PSS vs. ALL y FL1 vs. IAS) obtenido mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene 0,5 % de alcohol isopropílico (la misma formulación que el ejemplo de reactivo de análisis de WBC #9). Los neutrófilos/eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión.

La Figura 11C muestra dos diagramas de dispersión de WBC (PSS vs. IAS y FL1 vs. PSS) obtenido mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene 0,5 % de alcohol isopropílico (la misma formulación que el ejemplo de reactivo de análisis de WBC #9). Los neutrófilos/eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión.

La Figura 12A muestra tres diagramas de dispersión de WBC (ALL vs. IAS, PSS vs. ALL y PSS vs. IAS) obtenidos mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene cloruro de amonio al 0,5 % como componente de ajuste de osmolalidad. Los neutrófilos/eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión.

La Figura 12B muestra tres diagramas de dispersión de WBC (ALL vs. IAS, PSS vs. ALL y PSS frente a IAS) obtenidos mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene cloruro de amonio al 0,375 % como componente de ajuste de osmolalidad. Los neutrófilos/eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión.

La Figura 12C muestra tres diagramas de dispersión de WBC (ALL vs. IAS, PSS vs. ALL y PSS vs. IAS) obtenidos mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene cloruro de amonio al 0,25 % como componente de ajuste de osmolalidad. Los neutrófilos/eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión.

La Figura 12D muestra tres diagramas de dispersión de WBC (ALL vs. IAS, PSS vs. ALL y PSS vs. IAS) obtenidos mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene cloruro de amonio al 0,125 % como componente de ajuste de osmolalidad. Los neutrófilos/eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión. Una comparación entre las Figuras 12A-12D indica que los cambios en la concentración del cloruro de amonio en el reactivo de análisis de WBC dieron como resultado un cambio de posición de las subpoblaciones de WBC en los diagramas de dispersión.

La Figura 13, los paneles A-E muestran diagramas de dispersión de WBC (ALL vs. IAS) obtenido mediante el uso de reactivos WBC que contienen varias concentraciones de cloruro de sodio. Panel A: no se añadió NaCl; Panel B: + 0,033 % de NaCl; Panel C: + 0,066 % de NaCl; Panel D: + 0,100 % de NaCl; Panel E: + 0,133 % de NaCl. Los neutrófilos/eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión.

La Figura 14 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).

#### Descripción detallada

La presente descripción incluye reactivos, sistemas y métodos de análisis de WBC que pueden usarse para analizar una muestra de sangre total para identificar, clasificar y/o cuantificar glóbulos blancos (WBC) y subpoblaciones de WBC en la muestra. Los reactivos de análisis de WBC de la presente descripción generalmente incluyen al menos un tinte fluorescente permeable a la membrana, un reactivo protector de WBC y un tensioactivo. Los reactivos WBC incluyen una cantidad adecuada de un componente de ajuste de la osmolalidad para ajustar la osmolalidad del reactivo WBC en un intervalo deseado.

En algunos ejemplos, los reactivos, sistemas y métodos descritos en la presente descripción se usan para cribar WBC mediante el uso de una tinción de fluorescencia y una estrategia de activación de fluorescencia. Mediante el uso de este enfoque, la interferencia de los glóbulos rojos no lisados (por ejemplo, Glóbulos rojos resistentes a la lisis o "primeros glóbulos rojos") y fragmentos de glóbulos rojos se elimina sustancialmente o completamente, lo que de esta manera garantiza el recuento y la diferenciación precisos de WBC y subpoblaciones de WBC. La presente descripción también proporciona reactivos de análisis de WBC que facilitan el análisis mejorado de WBC mediante el uso, por ejemplo, de un analizador de hematología automatizado que se configura para llevar a cabo el enfoque de activación de fluorescencia. Los reactivos de análisis de WBC de la presente descripción también son adecuados para ensayos de muestras que contienen linfocitos frágiles (u otros WBC frágiles), incluidas muestras envejecidas.

En algunos ejemplos, los métodos descritos en la presente descripción implican: poner en contacto una muestra de sangre con un reactivo de análisis de WBC que incluye al menos un tinte fluorescente permeable a la membrana, un reactivo protector de WBC, un tensioactivo y un componente de ajuste de osmolalidad en una concentración que sea suficiente para subpoblaciones de WBC separadas en un diagrama de dispersión generado por un analizador de hematología; incubar la muestra de sangre con el reactivo de análisis de WBC a una temperatura elevada; teñir la muestra de sangre con el tinte fluorescente; usar un disparador de fluorescencia en un analizador de hematología para examinar la muestra de sangre en busca de WBC; y mediante el uso de una combinación de mediciones de (1) pérdida de luz axial, (2) dispersiones de ángulo intermedio, (3) dispersión lateral polarizada de gran ángulo, (4) dispersión lateral despolarizada de gran ángulo y (5) emisión de fluorescencia para realizar un análisis diferencial de WBC en la muestra (por ejemplo, contando el número de cada uno de una variedad de subtipos o subpoblaciones de WBC que están presentes en la muestra).

El uso de los tintes fluorescentes descritos en la presente descripción en combinación con el enfoque de análisis de activación de fluorescencia descrito en la presente descripción proporciona una sensibilidad excepcional en el análisis de WBC mediante la selección de los glóbulos rojos que no han sido lisados por el reactivo WBC. Esto, a su vez, facilita el uso de reactivos de análisis de WBC más suaves (por ejemplo, Reactivos de análisis que no lisan ni dañan los WBC en el proceso de lisar los glóbulos rojos en la muestra), que pueden ajustarse con precisión para facilitar una mayor separación de varias subpoblaciones de WBC entre sí (como se ve en uno o más diagramas de dispersión generados por un analizador de hematología) mediante el uso de componentes de ajuste de osmolalidad.

Como se usa en la presente, el término "información de fluorescencia" significa datos recopilados de un canal de fluorescencia de un analizador de hematología. Como se usa en la presente, el término "canal de fluorescencia" significa un dispositivo de detección, tal como un tubo fotomultiplicador, establecido en una banda de longitud de onda apropiada para medir la cantidad de fluorescencia emitida por una muestra.

#### Reactivos de análisis de WBC

La presente descripción incluye reactivos de análisis de WBC que pueden usarse para mejorar el análisis de WBC y subpoblaciones de WBC en una muestra de sangre mediante el uso de un analizador hematológico automático. Los reactivos de análisis de WBC descritos en la presente descripción se usan generalmente para lisar los glóbulos rojos en la muestra de sangre, mientras que al mismo tiempo conservan los WBC en la muestra de sangre para el análisis. Los reactivos de análisis de WBC descritos en la presente descripción también proporcionan generalmente una separación mejorada y sin interferencias de subpoblaciones de WBC entre sí cuando se ven en un diagrama de dispersión diferencial producido por un analizador de hematología. Esta separación mejorada facilita un análisis más preciso de las diversas subpoblaciones de WBC que están presentes dentro de la muestra de sangre.

Los reactivos de análisis de WBC descritos en la presente descripción pueden incluir generalmente al menos un tinte fluorescente permeable a la membrana, un reactivo protector de WBC, un tensioactivo, un componente de ajuste de osmolalidad, así como también varios componentes adicionales. Cada uno de estos componentes se describe con más detalle más abajo.

#### Tintes fluorescentes permeables a la membrana

Pueden usarse tintes fluorescentes permeables a la membrana para diferenciar dos clases de células sanguíneas; específicamente, glóbulos que contienen ADN y glóbulos que no contienen ADN. Dado que los WBC contienen grandes cantidades de ADN en sus núcleos y los glóbulos rojos no, la inclusión de un tinte fluorescente permeable a la membrana que interactúa con el ADN facilita la diferenciación de los WBC de los glóbulos rojos. El propósito del tinte es atravesar la membrana celular, unirse a uno o más ácidos nucleicos con suficiente afinidad y emitir una señal fluorescente con un desplazamiento de Stokes adecuado cuando el tinte es excitado por una fuente de luz apropiada. El pico de absorción del tinte 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), en orden para excitar adecuadamente el tinte y lograr resultados óptimos.

El tinte fluorescente permeable a la membrana es preferentemente: 1) capaz de unirse a ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN), 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) emite fluorescencia al ser excitado por la fuente de luz, y 5) es bioestable y soluble en un líquido (por ejemplo, una solución acuosa). Los ejemplos de colorantes fluorescentes permeables a la membrana adecuados incluyen, pero no se limitan a: naranja de acridina, yoduro de hexidio, SYTO 12, SYTO 14, SYTO RNA Select o cualquier equivalente de los mismos.

El tinte fluorescente se usa generalmente para activar los WBC y filtrar los glóbulos rojos no lisados y los fragmentos de glóbulos rojos en función de un disparador de fluorescencia configurado en el analizador hematológico. En algunas modalidades, el tinte está presente en una concentración de aproximadamente 1 pg/L a aproximadamente 1 mg/L, en dependencia de la afinidad de unión, las características de penetración de la membrana y/o la intensidad de la emisión de fluorescencia del tinte. En algunas modalidades, el tinte está presente en una concentración de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 1 mM, en dependencia de la afinidad de unión, las características de penetración de la membrana y/o la intensidad de la emisión de fluorescencia del tinte. Si bien hay varios tintes disponibles, el tinte seleccionado generalmente se empareja con la fuente de excitación del analizador hematológico, de manera que se usa un solo tinte para teñir y excitar la emisión de fluorescencia en todas las subpoblaciones de WBC que se pretenden identificar, cuantificar y/o analizar. Como tal, en algunas modalidades puede usarse un solo colorante (es decir, exclusivo) para identificar, cuantificar y analizar todas las diferentes subpoblaciones de WBC que están presentes en la muestra al mismo tiempo. En algunas modalidades, se puede incluir más de un tinte fluorescente en el reactivo de análisis de WBC.

En algunas modalidades, un tinte fluorescente está presente en un reactivo de análisis de WBC a una concentración de aproximadamente 1,0  $\mu\text{M}$ , a aproximadamente 1,3  $\mu\text{M}$ , a aproximadamente 1,5  $\mu\text{M}$ , a aproximadamente 1,8  $\mu\text{M}$ , o a aproximadamente 2,0  $\mu\text{M}$  o más. En algunas modalidades, un tinte fluorescente está presente en un reactivo de análisis de WBC a una concentración de aproximadamente 0,0001 %, a aproximadamente 0,0002 %, a aproximadamente 0,0003 %, a aproximadamente 0,0004 % o a aproximadamente 0,0005 % o más. En ciertas modalidades, un tinte fluorescente está presente en un reactivo de análisis de WBC a una concentración de aproximadamente 0,01  $\mu\text{M}$ , a aproximadamente 0,022  $\mu\text{M}$ , a aproximadamente 0,05  $\mu\text{M}$ , a aproximadamente 0,1  $\mu\text{M}$ , a aproximadamente 0,11  $\mu\text{M}$ , a aproximadamente 0,5  $\mu\text{M}$ , a aproximadamente 1,0  $\mu\text{M}$ , a aproximadamente 1,13  $\mu\text{M}$ , a aproximadamente 5,0  $\mu\text{M}$ , a aproximadamente 10  $\mu\text{M}$ , a aproximadamente 11,3  $\mu\text{M}$ , a aproximadamente 15  $\mu\text{M}$  o más.

#### Agentes protectores de WBC

Los reactivos de análisis de WBC descritos en la presente descripción pueden incluir un agente protector de WBC que evita un daño excesivo a los WBC durante la lisis de los glóbulos rojos. Los ejemplos de reactivos protectores de WBC incluyen, pero no se limitan a, formaldehído, glutaraldehído, butoxietanol, fenoxietanol, alcohol isopropílico o sus combinaciones. En algunas modalidades, un agente protector de WBC está presente en un reactivo de análisis de WBC a una concentración de aproximadamente 0,1 %, a aproximadamente 0,2 %, a aproximadamente 0,3 %, a aproximadamente 0,4 %, a aproximadamente 0,5 %, a aproximadamente 0,6 %, a aproximadamente 0,7 %, a aproximadamente 0,8 %, a aproximadamente 0,9 % o a aproximadamente 1 %.

#### Componentes de ajuste de osmolalidad

Los reactivos de análisis de WBC descritos en la presente descripción pueden incluir un componente de ajuste de osmolalidad. Los componentes de ajuste de la osmolalidad son generalmente reactivos que cambian la osmolalidad del reactivo de análisis de WBC en la medida deseada. Los ejemplos de componentes de ajuste de la osmolalidad incluyen, pero no se limitan a: sales que contienen cationes, tales como, por ejemplo, sales que contienen  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ; sales que contienen aniones, tales como, por ejemplo, sales que contienen  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HSO}_4^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{COOH}^-$  y  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ; compuestos orgánicos, tales como, por ejemplo, azúcares (por ejemplo, glucosa y sacarosa) y alcoholes (por ejemplo, etanol y metanol); o equivalentes de los mismos.

En ejemplos que no caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, un componente de ajuste de osmolalidad está presente en un reactivo de análisis de WBC a una concentración de aproximadamente 0,1 % o más, a aproximadamente 0,125 % o más, a aproximadamente 0,25 % o más, a aproximadamente el 0,5 % o más.

## Componentes adicionales

Además de los componentes descritos anteriormente, los reactivos de análisis de WBC descritos en la presente descripción también pueden incluir una variedad de componentes adicionales. Por ejemplo, en algunas modalidades, un reactivo de análisis de WBC puede incluir un tampón o sal que se usa para ajustar y/o mantener el pH de la solución y lograr la osmolalidad óptima del reactivo. Los ejemplos de tampones o sales incluyen, pero no se limitan a, acetato de sodio, bicarbonato de sodio o sus combinaciones. En algunas modalidades, un tampón o sal puede estar presente en un reactivo de análisis de WBC a una concentración de aproximadamente 0,01 %, a aproximadamente 0,02 %, a aproximadamente 0,03 %, a aproximadamente 0,04 %, a aproximadamente 0,05 %, a aproximadamente 0,06 %, a aproximadamente 0,07 %, a aproximadamente 0,08 %, a aproximadamente 0,09 %, a aproximadamente 0,1 %, a aproximadamente 0,15 %, a aproximadamente 0,2 %, a aproximadamente 0,25 %, a aproximadamente 0,3 %, a aproximadamente el 0,35 %, a aproximadamente el 0,4 %, a aproximadamente el 0,45 %, a aproximadamente el 0,5 % o más.

En algunas modalidades, un reactivo de análisis de WBC puede tener un pH que varía de aproximadamente 2,5 unidades de pH, a aproximadamente 3,0 unidades de pH, a aproximadamente 3,5 unidades de pH, a aproximadamente 4,0 unidades de pH, a aproximadamente 4,5 unidades de pH, a aproximadamente 5,0 unidades de pH, a aproximadamente 5,5 unidades de pH, a aproximadamente 6,0 unidades de pH, a aproximadamente 6,5 unidades de pH, a aproximadamente 7,0 unidades de pH, a aproximadamente 7,5 unidades de pH, a aproximadamente 8,0 unidades de pH, a aproximadamente 8,5 unidades de pH, a aproximadamente 9,0 unidades de pH, a aproximadamente 9,5 unidades de pH, a aproximadamente 10 unidades de pH, a aproximadamente 10,5 unidades de pH, a aproximadamente 11 unidades de pH, a aproximadamente 11,5 unidades de pH, a aproximadamente 12 unidades de pH, a aproximadamente 12,5 unidades de pH.

En determinadas modalidades, un reactivo de análisis de WBC puede incluir un agente antimicrobiano que se usa para prevenir el crecimiento microbiano en el reactivo de análisis de WBC. Los ejemplos de agentes antimicrobianos incluyen, pero no se limitan a, Proclinas, por ejemplo, Proclina 300 o equivalentes del mismo. La concentración del agente antimicrobiano es generalmente suficiente para conservar el reactivo de análisis de WBC durante la vida útil requerida. En algunas modalidades, un agente antimicrobiano puede estar presente en un reactivo de análisis de WBC a una concentración de aproximadamente 0,01 %, a aproximadamente 0,02 %, a aproximadamente 0,03 %, a aproximadamente 0,04 %, a aproximadamente 0,05 %, a aproximadamente 0,06 %, a aproximadamente 0,07 %, a aproximadamente 0,08 %, a aproximadamente 0,09 % o a aproximadamente 0,1 % o más.

En algunas modalidades, un reactivo de análisis de WBC puede incluir un tensioactivo que se usa para minimizar la acumulación de fragmentos de glóbulos rojos y evitar que los fragmentos de glóbulos rojos interfieran con el análisis de WBC en la muestra. Los ejemplos de tensioactivos incluyen, pero no se limitan a, saponina o equivalentes de la misma. En algunas modalidades, un tensioactivo puede estar presente en un reactivo de análisis de WBC a una concentración de aproximadamente 0,01 %, a aproximadamente 0,015 %, a aproximadamente 0,02 %, a aproximadamente 0,025 %, a aproximadamente 0,03 %, a aproximadamente 0,035 %, a aproximadamente el 0,04 %, a aproximadamente el 0,045 %, a aproximadamente el 0,05 % o más.

En algunas modalidades, un reactivo de análisis de WBC puede incluir un componente de lisis de glóbulos rojos. Los componentes de lisis de glóbulos rojos generalmente pueden ayudar a lisar los glóbulos rojos en una muestra de sangre al mismo tiempo que contribuyen al ajuste de la osmolalidad del reactivo de análisis de WBC para facilitar la separación y/o análisis de diferentes clases de WBC presentes en la muestra. Los ejemplos de componentes de lisis de glóbulos rojos incluyen, pero no se limitan a: sales de amonio, tales como, por ejemplo, cloruro de amonio; sales de amonio terciario; sales de amonio cuaternario; o equivalentes de los mismos.

## Métodos de preparación de reactivos de análisis de WBC

En algunos ejemplos que no entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, se prepara un reactivo de análisis de WBC mediante el uso de un proceso de preparación de dos etapas para disolver el tinte fluorescente permeable a la membrana. En la primera etapa, el tinte fluorescente se disuelve en un solvente orgánico adecuado, por ejemplo, DMSO, para crear una solución que contiene el tinte fluorescente en una primera concentración adecuada. En la segunda etapa, la solución que contiene el tinte fluorescente en el solvente orgánico se mezcla con un solvente acuoso para crear un reactivo de análisis de WBC acuoso que contiene el tinte fluorescente en la concentración final deseada. En algunos ejemplos, el solvente acuoso puede contener componentes adicionales del reactivo de análisis de WBC.

## Métodos de lisar glóbulos rojos en una muestra de sangre

Los reactivos de análisis de WBC descritos en la presente descripción se pueden usar generalmente para lisar los glóbulos rojos en una muestra de sangre total. La lisis de los glóbulos rojos en una muestra de sangre se puede realizar a una temperatura superior a la temperatura ambiente (por ejemplo, entre aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C, como aproximadamente 40 °C) durante un período de tiempo que varía de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 1 minuto. La lisis de los glóbulos rojos se puede llevar a cabo en 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), luego de mezclar una muestra de sangre con un reactivo de análisis de WBC. La relación de dilución del volumen de la muestra de sangre al volumen del reactivo de análisis de WBC (expresada como "volumen de muestra de sangre: volumen de reactivo de análisis de WBC") puede variar mucho. La relación entre el volumen de la muestra de sangre y el volumen del reactivo de análisis de WBC puede variar de aproximadamente 1:10, a aproximadamente 1:20, a aproximadamente 1:30, a aproximadamente 1:40, a aproximadamente 1:50, a aproximadamente 1:60, a aproximadamente 1:70, a aproximadamente 1:80, a aproximadamente 1:90, a aproximadamente 1: 100 o más.

#### Métodos de análisis que involucran un activador de fluorescencia

Las células sanguíneas emiten diferentes magnitudes de señales de fluorescencia tras la excitación del tinte fluorescente por una fuente de luz. Las diferencias en la magnitud de las señales de fluorescencia surgen en parte 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. Las diferencias en la magnitud de la fluorescencia también surgen de, por ejemplo, la capacidad de un tinte fluorescente para penetrar las membranas celulares, el tamaño de las moléculas del tinte fluorescente, la cinética de unión entre el tinte fluorescente y el ácido nucleico unido, la afinidad de unión entre el tinte fluorescente y el ácido nucleico, y otros factores similares.

Los glóbulos rojos maduros emiten señales de fluorescencia mínimas porque no hay ADN dentro de los glóbulos rojos maduros. Los glóbulos rojos nucleados (nRBC) emiten señales de fluorescencia muy fuertes, porque no solo está presente el ADN dentro de los núcleos de los glóbulos rojos nucleados, sino que también la tinción se produce más fácilmente porque las membranas de los glóbulos rojos nucleados se destruyen durante el procedimiento de lisis. Los glóbulos rojos no lisados o los fragmentos de glóbulos rojos no emiten fluorescencia, aunque en algunos casos pueden emitir autofluorescencia muy débil.

Como tal, los sistemas y métodos presentados en la presente descripción usan un disparador de fluorescencia en combinación con reactivos de análisis de WBC para analizar WBC dentro de una muestra. Por ejemplo, un disparador 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. En otras palabras, el uso de un disparador de fluorescencia permite que las señales de los glóbulos rojos se separen o eliminen del análisis, lo que facilita la medición y el análisis más precisos de los WBC y las subpoblaciones de WBC en la muestra al eliminar la interferencia de las señales de los glóbulos rojos. En las Figuras se muestran ejemplos del uso de un FL1 o un disparador de fluorescencia. 1-5. La Figura 1 es un diagrama de dispersión de FL1 vs. IAS que demuestra el uso de un disparador fluorescente para eliminar cualquier fragmento de glóbulos rojos (partículas sin núcleo) y recolectar solo eventos que contienen núcleos (por ejemplo, WBC y/o glóbulos rojos). En la Figura 1, el tinte fluorescente en el reactivo de análisis de WBC era naranja de acridina y la concentración del tinte fluorescente era de 3,8  $\mu\text{M}$ . El uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene naranja de acridina como tinte fluorescente (incluso con concentraciones drásticamente diferentes del tinte, es decir, 11,3  $\mu\text{M}$  hasta 0,022  $\mu\text{M}$  como se muestra en la Figura 6) y un activador FL1 correctamente configurado facilita la identificación de núcleos que contienen eventos estableciendo un nivel de umbral en FL1. En consecuencia, solo los eventos por encima del disparador FL1 (por ejemplo, WBC y/o glóbulos rojos nucleados, si están presentes) se capturan para un análisis adicional.

#### Uso de canales ópticos y de fluorescencia para análisis

La invención implica el uso de canales ópticos y de fluorescencia para analizar WBC en una muestra de sangre. Por ejemplo, en algunas modalidades, se realiza un análisis diferencial de WBC por medio de la tecnología de Separación por Dispersión Polarizada de Ángulos Múltiples (MAPSS), con mejora de la información de fluorescencia. Se necesitan al menos un fotodiodo, o al menos un tubo fotomultiplicador, o ambos al menos un fotodiodo y al menos un tubo fotomultiplicador, para detectar la luz dispersada por cada glóbulo que pasa a través de una celda de flujo. Se usan dos o más fotodiodos para medir las señales en ALL, que miden aproximadamente 0 ° de dispersión, y señales IAS, que miden dispersiones de ángulo bajo (por ejemplo, de aproximadamente 3 ° a aproximadamente 15 °). Se usan dos o más tubos fotomultiplicadores (o fotodiodos de avalancha) para detectar señales PSS de gran ángulo (por ejemplo, 90 °) y señales DSS de gran ángulo (por ejemplo, 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, 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.

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

luz de 7 °. El aparato representado en la Figura 14 es simplemente un ejemplo de un aparato que puede usarse para llevar a cabo los métodos descritos en la presente descripción.

En la discusión que sigue, la fuente de luz es preferentemente un láser. Sin embargo, pueden usarse otras fuentes de luz como, por ejemplo, lámparas (por ejemplo, mercurio, xenón). La fuente de luz puede ser un láser refrigerado por aire y polarizado verticalmente Coherent Cube, disponible comercialmente de Coherent, Inc., Santa Clara, CA. En algunas modalidades, 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".

Se pueden 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 de un analizador de hematología automático adecuado, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos núm. 5,631,165, particularmente en la columna 41, línea 32 hasta la columna 43, línea 11. El sistema de trayectoria óptica de avance mostrado en la Figura 14 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 de diana capaz de detectar la pérdida de luz axial (ALL) y la dispersión frontal de ángulo intermedio (IAS). 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 440 nm a 680 nm, dependiendo del tinte 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 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 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 14, es decir, una hendidura 46, una lente de campo 48 y una segunda hendidura 50, se describen en la Patente de Estados Unidos núm. 5,631,165, en la columna 44, línea 63 hasta la columna 45, línea 26. Los filtros ópticos 52 o 56 y un polarizador 52 o 56, que se insertan en las trayectorias de luz de los tubos fotomultiplicadores para cambiar la longitud de onda o la polarización o tanto la longitud de onda como la polarización de la luz detectada, también se describen en la Patente de Estados Unidos núm. 5,631,165, en la columna 44, línea 63 hasta la columna 45, línea 26. Los filtros ópticos que son adecuados para su uso en la presente descripción incluyen filtros de paso de banda y filtros de paso largo.

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).

Además de la información recopilada de los cuatro canales MAPSS tradicionales (ALL, IAS, PSS, DSS), el canal FL1 distingue aún más las subpoblaciones celulares entre sí. 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.

Los métodos descritos en la presente descripción mejoran el análisis de WBC para analizadores de hematología y proporcionan un recuento de WBC más preciso y una clasificación más precisa de las subpoblaciones de WBC, porque la interferencia de los glóbulos rojos y los fragmentos de glóbulos rojos no lisados se elimina sustancialmente. El uso de fluorescencia proporciona más información para mejorar el análisis diferencial de los WBC. Los métodos descritos en la presente descripción muestran ventajas sobre los métodos tradicionales cuando se analizan muestras que tienen glóbulos rojos no lisados y muestras que tienen WBC frágiles.

**Ejemplos de formulaciones de reactivos de análisis de WBC:**

Se proporcionan varios ejemplos de formulaciones de reactivos de análisis de WBC más abajo. Las formulaciones 1 a 10 proporcionadas más abajo sirven simplemente como ejemplos que no forman parte de la invención reivindicada. Cualquiera de una variedad de combinaciones de los componentes descritos en la presente descripción se pueden usar en reactivos de análisis de WBC.

#### Ejemplo de Formulación 1:

Componente	Concentración
Acetato de sodio	0,152 %
Bicarbonato de sodio	0,203 %
Saponina	0,014 %
Proclina 300	0,060 %
Cloruro de amonio	0,250 %
Formaldehído	0,220 %
Naranja de acridina	3,8 $\mu$ M

#### Ejemplo de Formulación 2:

Componente	Concentración
Acetato de sodio	0,152 %
Bicarbonato de sodio	0,203 %
Saponina	0,014 %
Proclina 300	0,060 %
Cloruro de amonio	0,250 %
Formaldehído	0,220 %
Yoduro de hexidio	1,3 $\mu$ M

#### Ejemplo de Formulación 3:

Componente	Concentración
Acetato de sodio	0,152 %
Bicarbonato de sodio	0,203 %
Saponina	0,014 %
Proclina 300	0,060 %
Cloruro de amonio	0,250 %
Formaldehído	0,220 %
SYTO RNA Select	1,3 $\mu$ M

#### Ejemplo de Formulación 4:

Componente	Concentración
Acetato de sodio	0,152 %
Bicarbonato de sodio	0,203 %
Saponina	0,014 %
Proclina 300	0,060 %
Cloruro de amonio	0,250 %
Formaldehído	0,220 %
SYTO 12	1,3 $\mu$ M

**Ejemplo de Formulación 5:**

Componente	Concentración
Acetato de sodio	0,152 %
Bicarbonato de sodio	0,203 %
Saponina	0,014 %
Proclina 300	0,060 %
Cloruro de amonio	0,250 %
Formaldehído	0,220 %
SYTO 14	1,3 µM

**Ejemplo de Formulación 6:**

Componente	Concentración
Acetato de sodio	0,152 %
Bicarbonato de sodio	0,203 %
Saponina	0,014 %
Proclina 300	0,060 %
Cloruro de amonio	0,250 %
Glutaraldehído	0,200 %
Naranja de acridina	0,0003 %

**Ejemplo de Formulación 7:**

Componente	Concentración
Acetato de sodio	0,152 %
Bicarbonato de sodio	0,203 %
Saponina	0,014 %
Proclina 300	0,060 %
Cloruro de amonio	0,250 %
Butoxietanol	0,500 %
Naranja de acridina	0,0003 %

**Ejemplo de Formulación 8:**

Componente	Concentración
Acetato de sodio	0,152 %
Bicarbonato de sodio	0,203 %
Saponina	0,014 %
Proclina 300	0,060 %
Cloruro de amonio	0,250 %
Fenoxietanol	0,500 %
Naranja de acridina	0,0003 %

**Ejemplo de Formulación 9:**

Componente	Concentración
Acetato de sodio	0,152 %
Bicarbonato de sodio	0,203 %
Saponina	0,014 %
Proclina 300	0,060 %
Cloruro de amonio	0,250 %
Alcohol isopropílico	0,500 %
Naranja de acridina	0,0003 %

**Ejemplo de Formulación 10:**

Componente	Concentración
Acetato de sodio	0,152 %
Bicarbonato de sodio	0,203 %
Saponina	0,014 %
Proclina 300	0,060 %
Cloruro de amonio	Variada, 0,125 % - 0,5 %
Formaldehído	0,220 %
Naranja de acridina	0,0003 %

**Ejemplo de Formulación 11:**

Componente	A	B	C	D	E
Acetato de sodio	0,152 %	0,152 %	0,152 %	0,152 %	0,152 %
Bicarbonato de sodio	0,203 %	0,203 %	0,203 %	0,203 %	0,203 %
Saponina	0,014 %	0,014 %	0,014 %	0,014 %	0,014 %
Proclina 300	0,060 %	0,060 %	0,060 %	0,060 %	0,060 %
Cloruro de amonio	0,125 %	0,125 %	0,125 %	0,125 %	0,125 %
Cloruro de Sodio	No	0,033 %	0,066 %	0,100 %	0,133 %
Formaldehído	0,220 %	0,220 %	0,220 %	0,220 %	0,220 %
Naranja de acridina	0,0003 %	0,0003 %	0,0003 %	0,0003 %	0,0003 %
Osmolalidad (mOsm)	149	158	168	181	191

**Ejemplos:**

Las Figuras 1-5 muestran los diagramas de dispersión diferenciales de WBC (FL1 vs. IAS) para una muestra de sangre total normal que se analizó mediante el uso de los reactivos y sistemas de análisis de WBC descritos anteriormente en las Formulaciones de Ejemplo 1-5, respectivamente. Como puede observarse en las Figuras 1-5, los reactivos de análisis de WBC pudieron distinguir y diferenciar suficientemente los WBC en las muestras.

Las Figuras 6A-6D muestran diagramas de dispersión diferencial de WBC (PSS vs. ALL y FL1 vs. IAS) para cuatro formulaciones diferentes de reactivos de análisis de WBC. Los resultados indican que se obtienen diferenciales de WBC similares incluso cuando las concentraciones de colorante fluorescente permeable a la membrana en el reactivo de análisis de WBC varían significativamente. Las cuatro formulaciones ensayadas fueron similares a las del Ejemplo de Formulación 1, excepto que las concentraciones de naranja de acridina se prepararon a 11,3  $\mu$ M (IX), 1,13  $\mu$ M (0,1X), 0,11  $\mu$ M (0,01X) y 0,022  $\mu$ M (0,002X), con los voltajes de FL1 PMT establecidos en 375 V, 420 V, 475 V y 520 V, respectivamente.

Las Figuras 7A-7C muestran varios diagramas de dispersión de WBC de una muestra de sangre total normal que se analizó mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene formaldehído al 0,22 % como agente protector de WBC (la misma formulación que la Formulación de ejemplo 1).

5 Las Figuras 8A-8C muestran varios diagramas de dispersión de WBC de una muestra de sangre total normal que se analizó mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene glutaraldehído al 0,2 % como agente protector de WBC (la misma formulación que la Formulación de ejemplo 6).

10 Las Figuras 9A-9C muestran varios diagramas de dispersión de WBC de una muestra de sangre total normal que se analizó mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene butoxietanol al 0,5 % como agente protector de WBC (la misma formulación que la Formulación de ejemplo 7).

15 Las Figuras 10A-10C muestran varios diagramas de dispersión de WBC de una muestra de sangre total normal que se analizó mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene fenoxietanol al 0,5 % como agente protector de WBC (la misma formulación que la formulación del ejemplo 8).

20 Las Figuras 11A-11C muestran varios diagramas de dispersión de WBC de una muestra de sangre total normal que se analizó mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene alcohol isopropílico al 0,5 % como agente protector de WBC (la misma formulación que la Formulación de ejemplo 9).

25 Las Figuras 12A-12D muestran varios diagramas de dispersión de WBC (ALL frente a IAS, PSS frente a ALL y PSS frente a IAS) obtenidos mediante el uso de un reactivo de análisis de WBC que contiene la concentración indicada de cloruro de amonio como componente de ajuste de osmolalidad. Los neutrófilos/eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos se muestran en los diagramas de dispersión. El reactivo de análisis de WBC tenía la misma formulación que se usó en la Formulación del Ejemplo 10, excepto que la concentración de cloruro de amonio se ajustó como se indica. Los cambios en la concentración de cloruro de amonio en el reactivo de análisis de WBC dieron como resultado un cambio de posición de las subpoblaciones de WBC en los diagramas de dispersión. Por ejemplo, la concentración de cloruro de amonio se varió del 0,125 % al 0,5 % en el reactivo WBC. El cambio de osmolalidad resultante de varios cambios en la concentración de cloruro de amonio afectó las posiciones relativas entre neutrófilos, linfocitos y monocitos en los diagramas de dispersión de ALL frente a IAS. Una concentración más baja de cloruro de amonio y una osmolalidad más baja parecían "elevar" la población de neutrófilos y crear espacio para los basófilos en el diagrama de dispersión. Las osmolalidades se midieron a 263, 224, 181 y 146 mOsm, respectivamente, para los reactivos WBC que contienen 0,5 %, 0,375 %, 0,25 % y 0,125 % de cloruro de amonio. El cambio de posición de la población de neutrófilos/eosinófilos se puede ver comparando los diagramas de dispersión.

35 Figura 13 muestra el cambio relativo de las poblaciones de WBC debido a los cambios de osmolalidad que resultan de diversas concentraciones de NaCl (véase el Ejemplo de Formulación 11). La osmolalidad osciló entre 149 y 181 mOsm en este experimento.

40 La descripción anterior de la invención se ha presentado con fines ilustrativos y descriptivos. No pretende ser exhaustiva ni limitar la invención a la forma precisa descrita. Pueden ser posibles otras modificaciones y variaciones a la luz de las enseñanzas anteriores. Las modalidades se eligieron y describieron con el fin de explicar mejor los principios de la invención y su aplicación práctica, y de esta manera permitir que otros expertos en la técnica usen mejor la invención en diversas modalidades y diversas modificaciones que sean adecuadas para el uso particular contemplado. Se pretende que las reivindicaciones adjuntas se interpreten para incluir otras modalidades alternativas de la invención.

50 La descripción detallada anterior se refiere a los dibujos adjuntos que ilustran una o más modalidades ilustrativas. Son posibles otras modalidades. Se pueden realizar modificaciones a la modalidad descrita sin apartarse del espíritu y alcance de la presente invención. Por lo tanto, la descripción detallada no pretende ser limitante. Además, las secciones resumen y el resumen pueden establecer una o más, pero no todas las modalidades de la presente invención ilustrativas contempladas por el inventor o inventores y, por lo tanto, no pretenden limitar la presente invención y las reivindicaciones adjuntas de ninguna manera.

# REIVINDICACIONES

1. Un sistema para realizar un análisis diferencial de glóbulos blancos (WBC) en una muestra de sangre total, el sistema comprende:
  - a) un analizador hematológico, el analizador hematológico comprende:

una fuente de excitación posicionada para excitar partículas dentro de la muestra de sangre;  
una pluralidad de detectores que incluyen (1) un detector de pérdida de luz axial posicionado para medir la pérdida de luz axial de la muestra de sangre excitada, (2) un detector de dispersión de ángulo intermedio posicionado para medir dispersiones de ángulo intermedio de la muestra de sangre excitada, (3) un detector de dispersión lateral posicionado para medir dispersiones laterales polarizadas de gran ángulo de la muestra de sangre excitada, (4) un detector de dispersión lateral despolarizado posicionado para medir la dispersión lateral despolarizada de gran ángulo de la muestra de sangre excitada, y (5) un detector de fluorescencia posicionado para medir la fluorescencia emitida por la muestra de sangre excitada; y  
un procesador configurado para:

    - I) recibir las mediciones de (1) pérdida de luz axial, (2) dispersiones de ángulo intermedio, (3) dispersiones laterales polarizadas de gran ángulo, (4) dispersiones laterales despolarizadas de gran ángulo y (5) fluorescencia de la pluralidad de detectores, y
    - II) 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; y
  - b) un reactivo para analizar WBC en la muestra, el reactivo comprende:

un tinte fluorescente permeable a la membrana;  
un agente protector de WBC; y  
un componente de ajuste de osmolalidad;  
en donde la concentración del tinte fluorescente permeable a la membrana es suficiente para facilitar la identificación de una o más células en la muestra que contienen un núcleo mediante el uso del analizador hematológico; y  
en donde la concentración del componente de ajuste de osmolalidad es suficiente para facilitar la identificación de una pluralidad de subpoblaciones de WBC en la muestra mediante el uso del analizador hematológico,  
caracterizado porque la concentración del componente de ajuste de osmolalidad varía de 0,1 % a 0,5 % y que el componente de ajuste de osmolalidad comprende cloruro de amonio y cloruro de sodio, para separar una pluralidad de subpoblaciones de WBC entre sí cuando se analizan con el analizador hematológico.
2. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tinte fluorescente permeable a la membrana es naranja de acridina o yoduro de hexidio.
3. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la concentración del tinte fluorescente permeable a la membrana en el reactivo varía de 0,0001 % a 0,0005 %, o de 0,01  $\mu$ M a 15  $\mu$ M.
4. El sistema de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el agente protector de WBC es formaldehído, glutaraldehído, butoxietanol, fenoxietanol o alcohol isopropílico.
5. El sistema de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la concentración del agente protector de WBC varía de 0,1 % a 1,0 %.
6. El sistema de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el reactivo comprende además un tensioactivo.
7. El sistema de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la concentración del tensioactivo varía de 0,01 % a 0,05 %.
8. El sistema de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el reactivo comprende además un componente tamponador de pH.
9. El sistema de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la concentración del componente tamponador de pH varía de 0,01 % a 0,5 %.
10. El sistema de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la osmolalidad del reactivo varía de 25 a 350 mOsm.

11. El sistema de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el procesador está configurado además para preseleccionar las mediciones recibidas para eliminar de la consideración cualquier partícula que no alcance el umbral de fluorescencia.
- 5 12. El sistema de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el detector de pérdida de luz axial mide la pérdida de luz axial a una dispersión de 0°.
13. El sistema de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el detector de dispersión de ángulo intermedio mide la dispersión del ángulo de luz entre 3° y 15°.
- 10 14. El sistema de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la fuente de excitación es un láser.
15. El sistema de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el láser emite luz a una longitud de onda correspondiente al tinte fluorescente.
- 15 16. El sistema de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende además un subsistema de incubación para diluir la muestra de sangre con el reactivo.
- 20 17. El sistema de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el subsistema de incubación se configura para incubar la muestra de sangre con el reactivo durante un período de tiempo inferior a 25 segundos.
18. El sistema de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, en donde el subsistema de incubación se configura para incubar la muestra de sangre con el reactivo a una temperatura que varía de 30 °C a 50 °C.



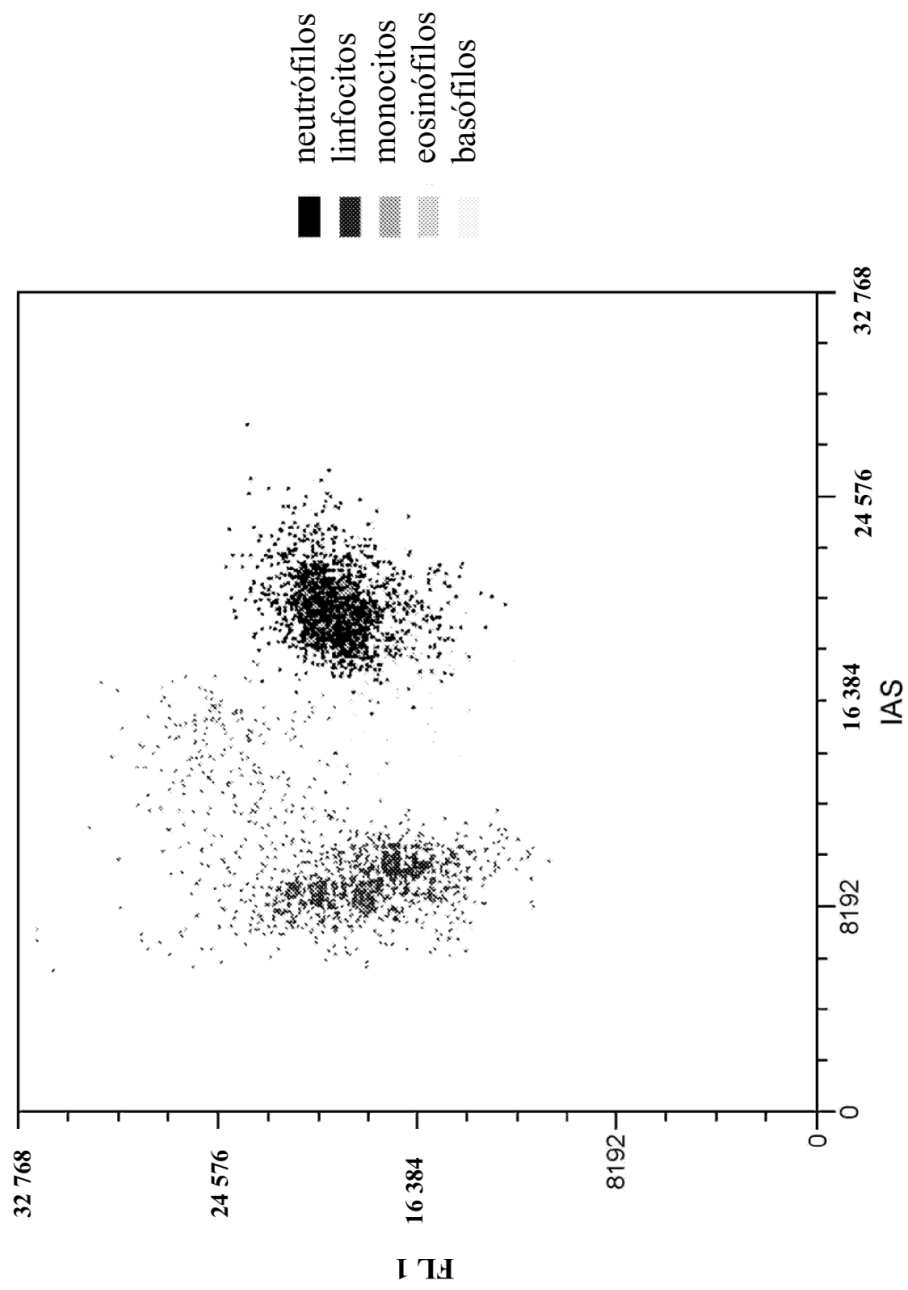


Figura I

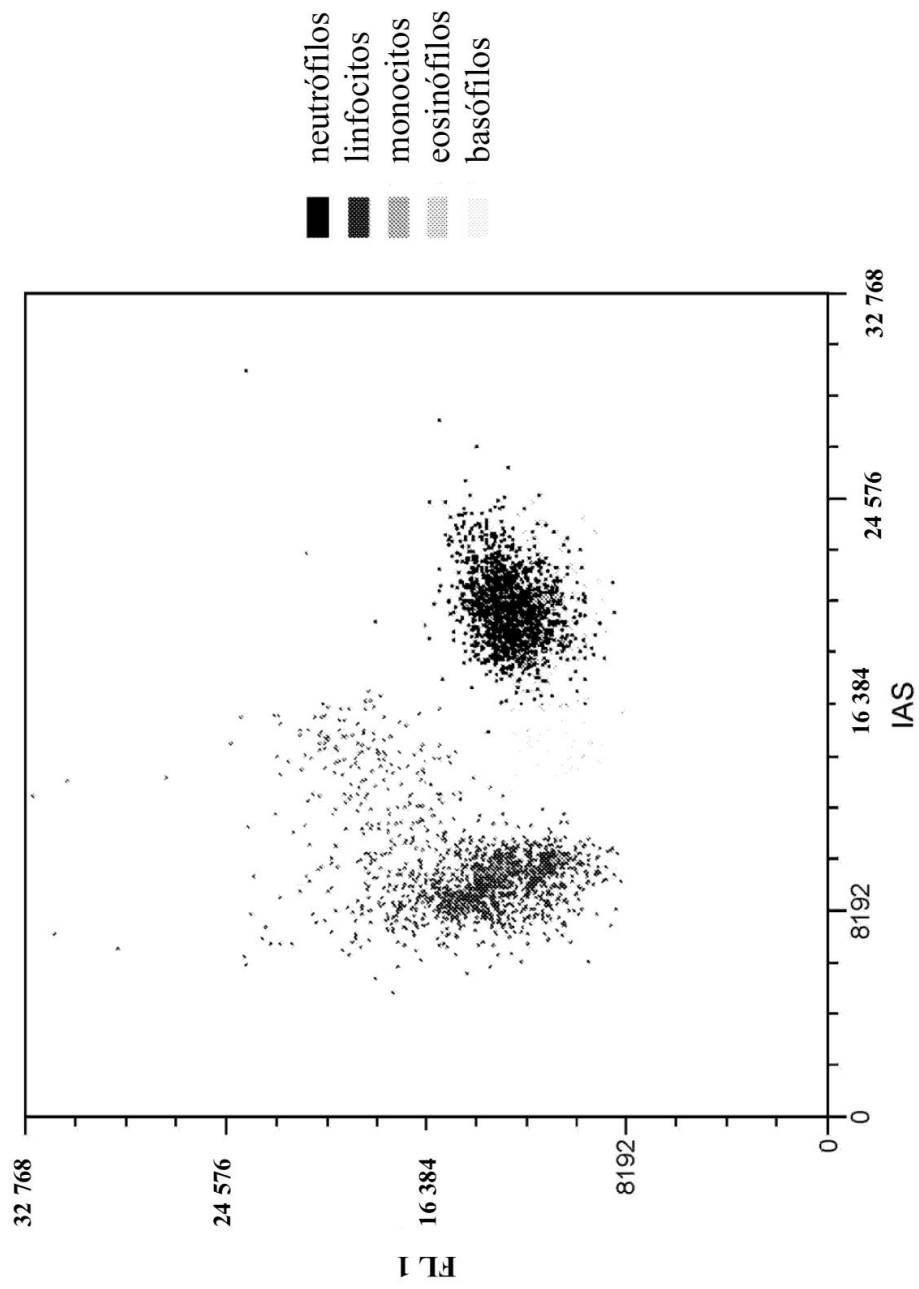


Figura 2

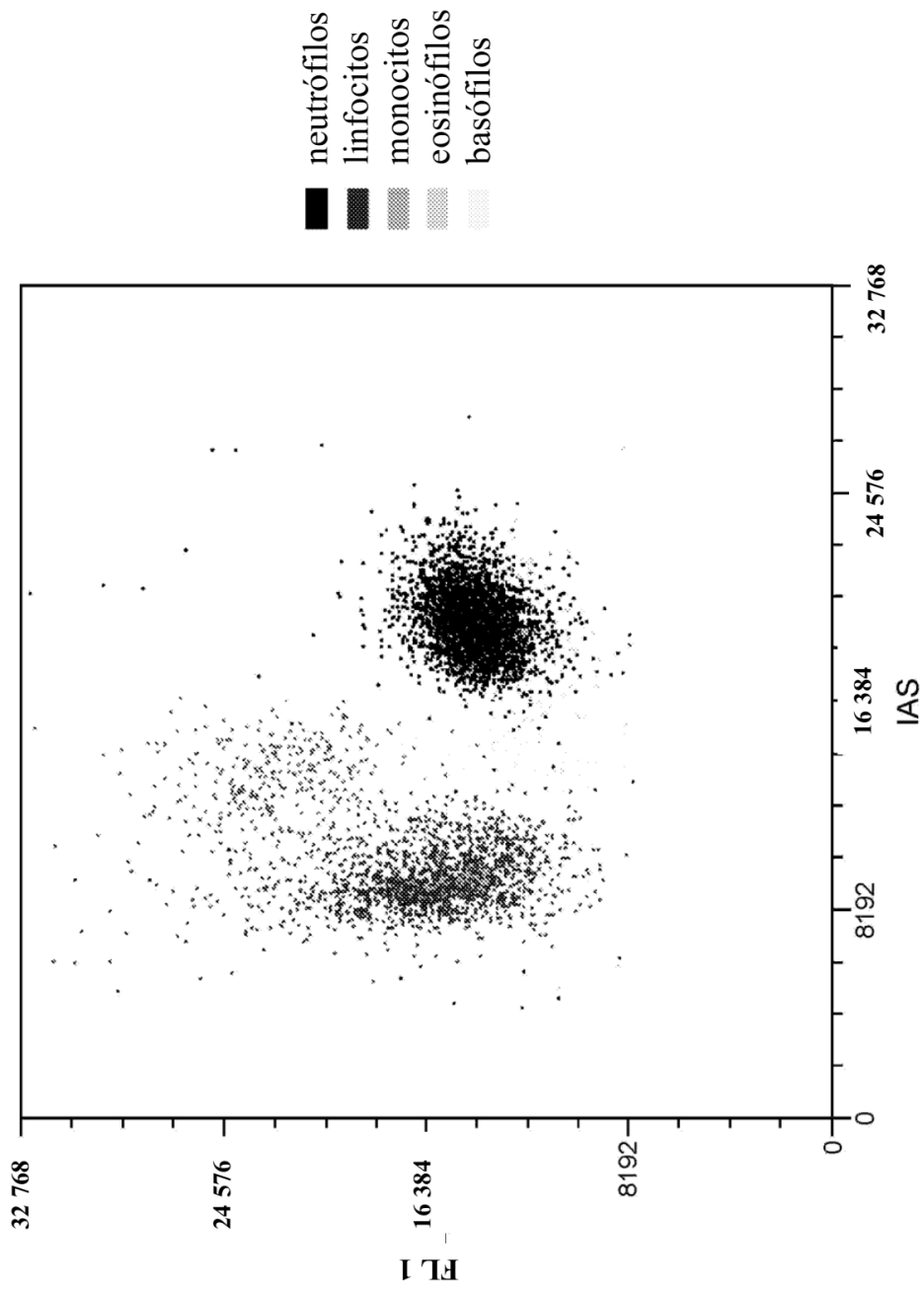


Figura 3

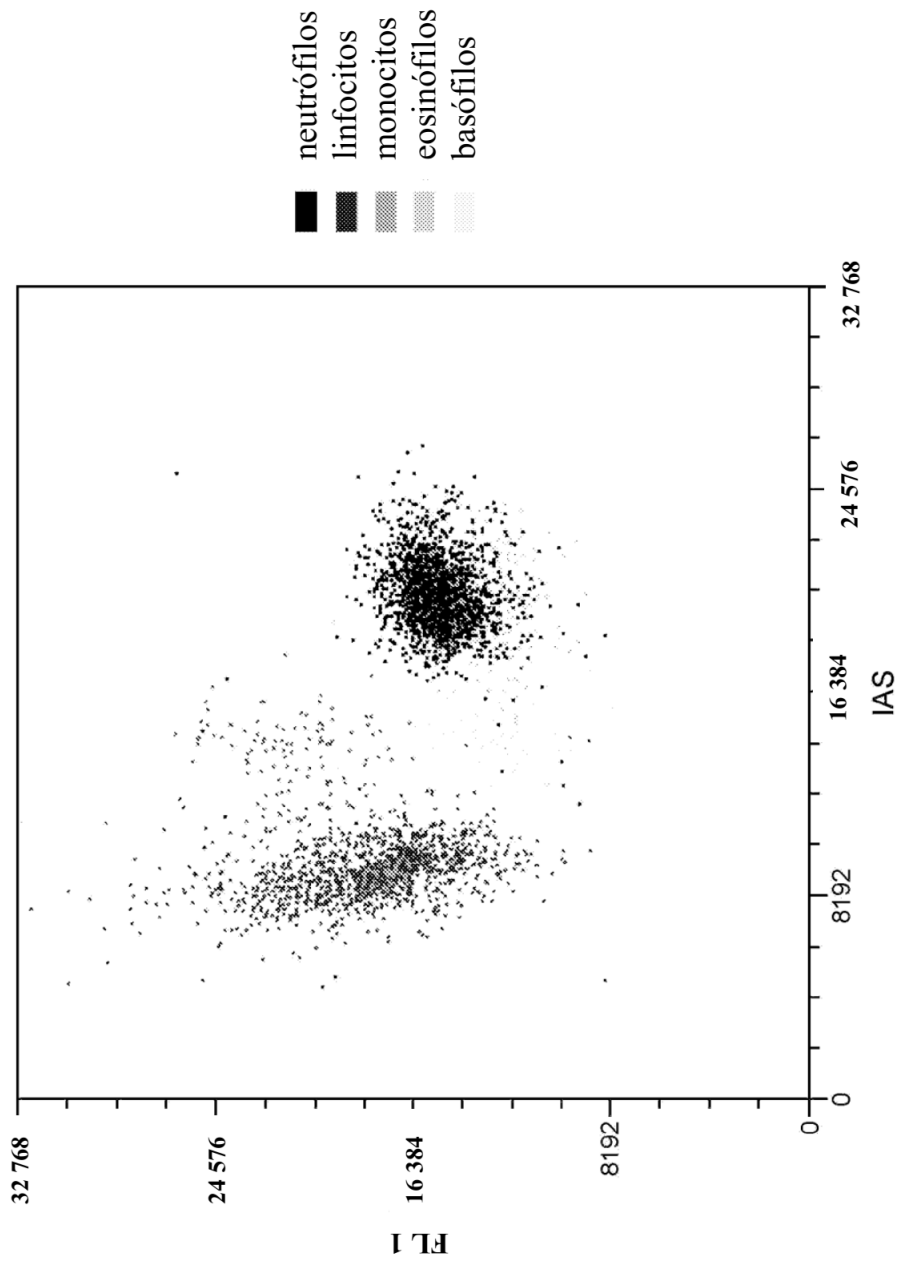


Figura 4

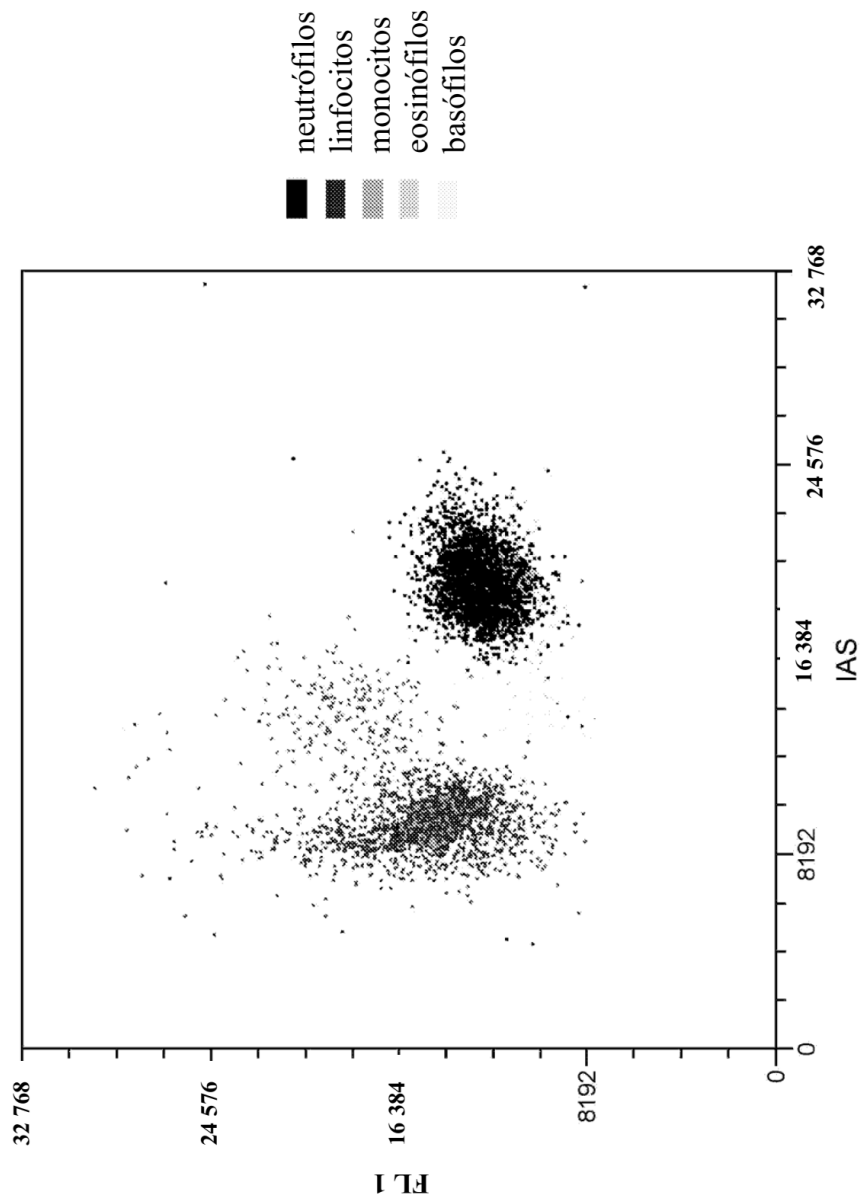


Figura 5

11,3  $\mu\text{M}$  (1X)

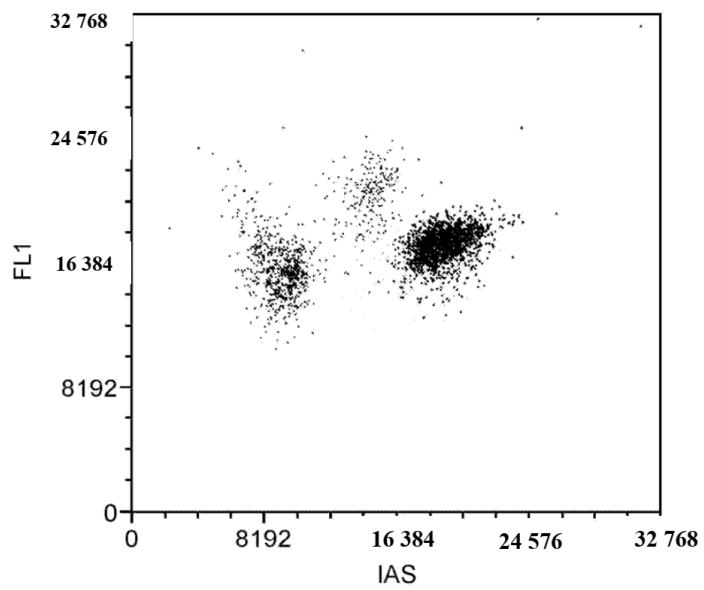
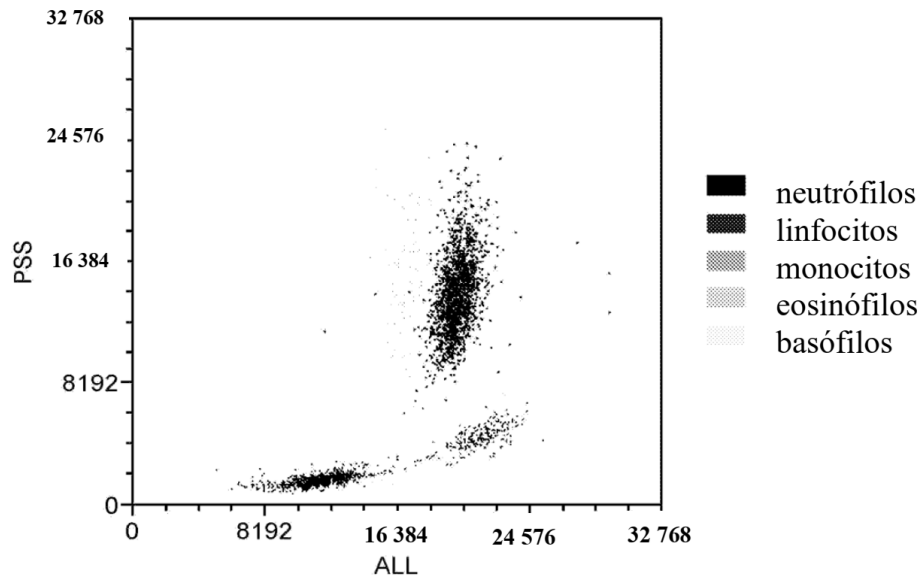


Figura 6A

1,13  $\mu\text{M}$  (0,1X)

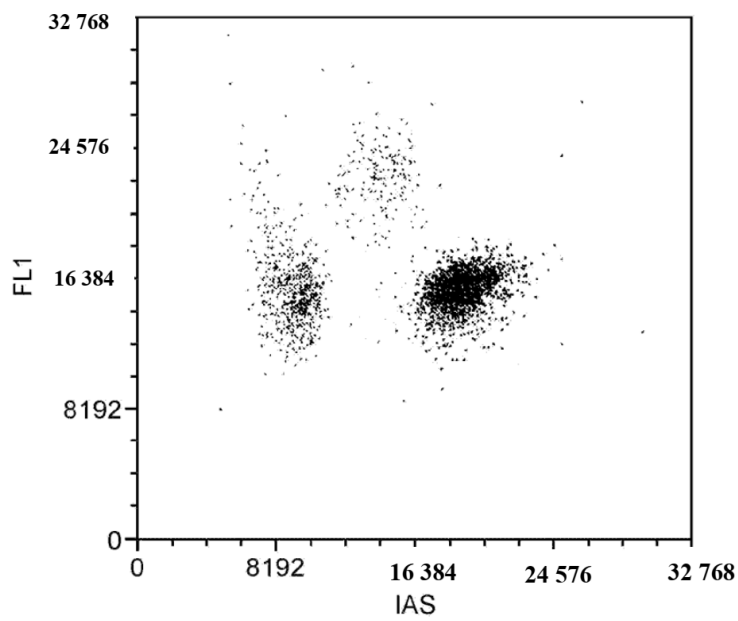
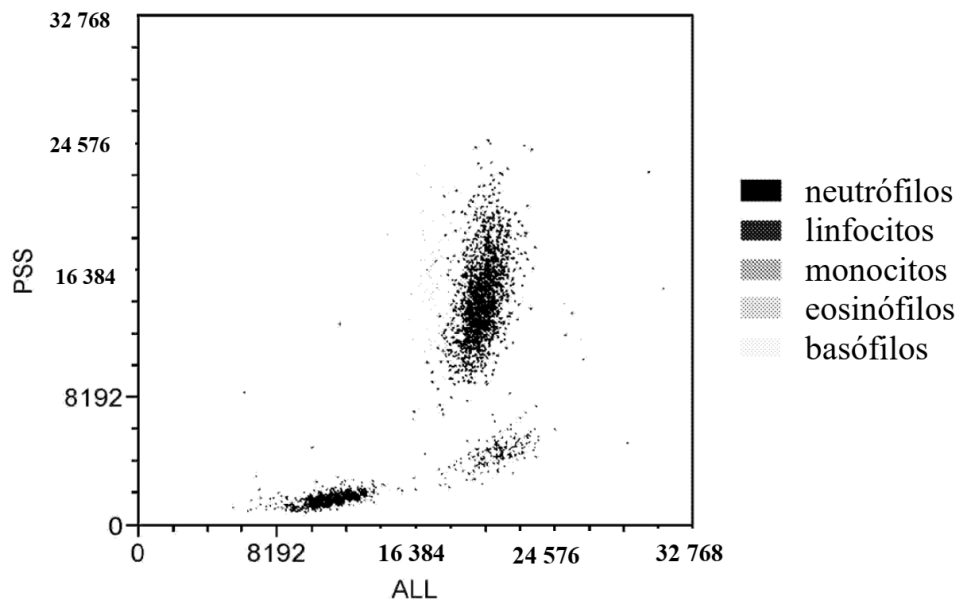


Figura 6B

0,11  $\mu$ M (0,01X)

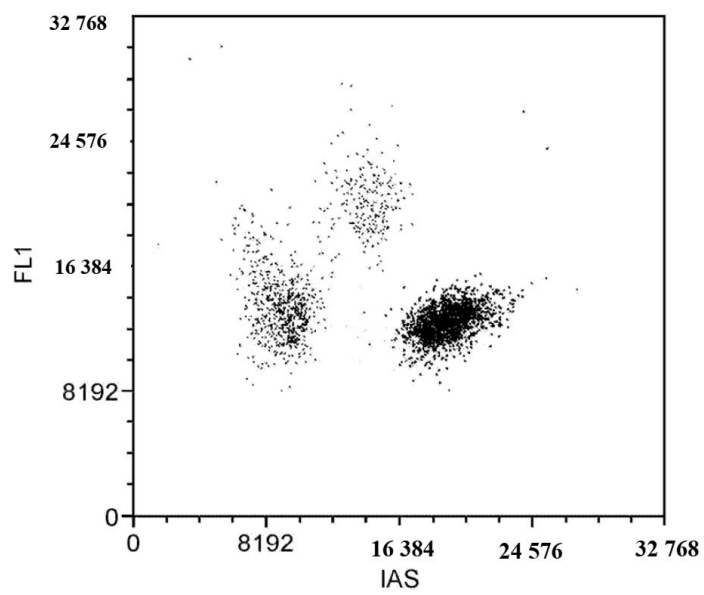
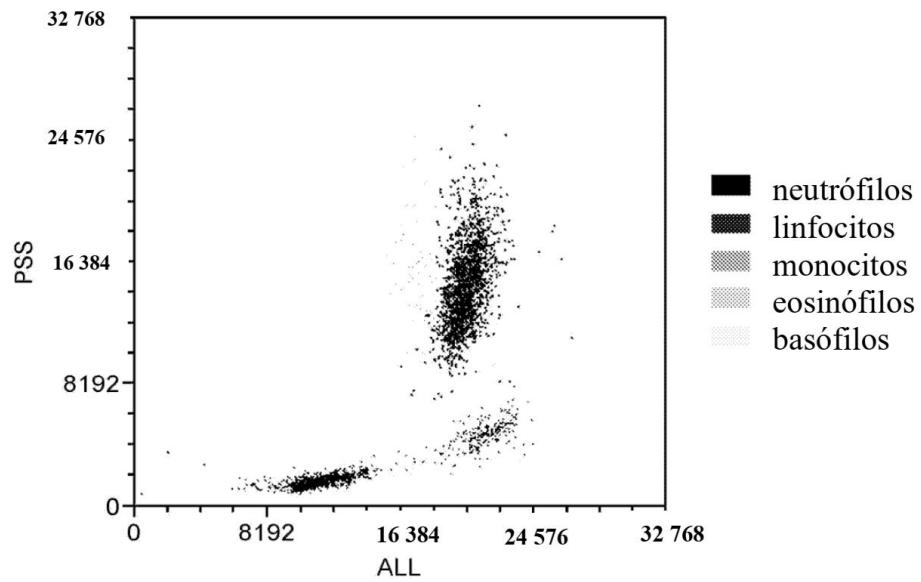


Figura 6C



0,022  $\mu$ M (0,002X)

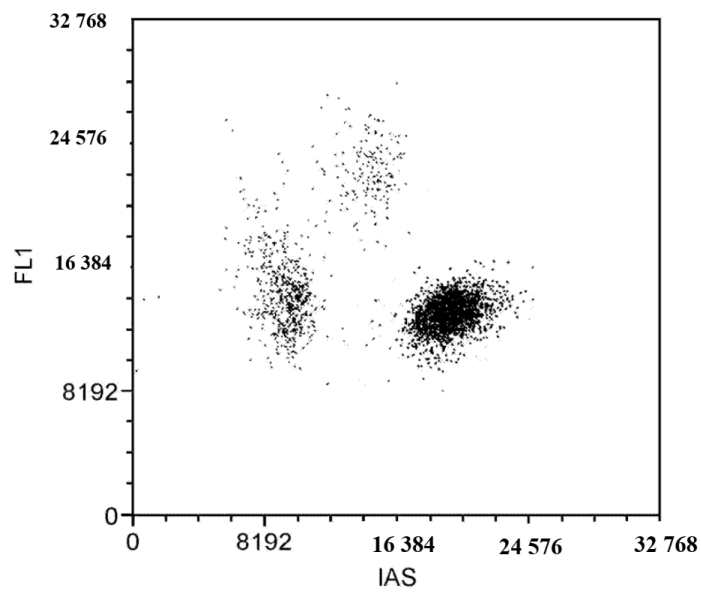
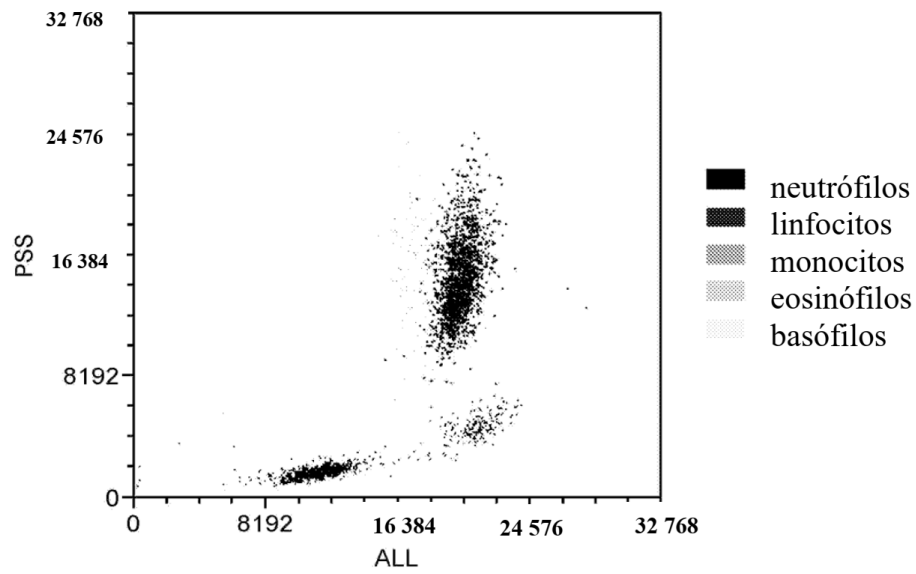


Figura 6D

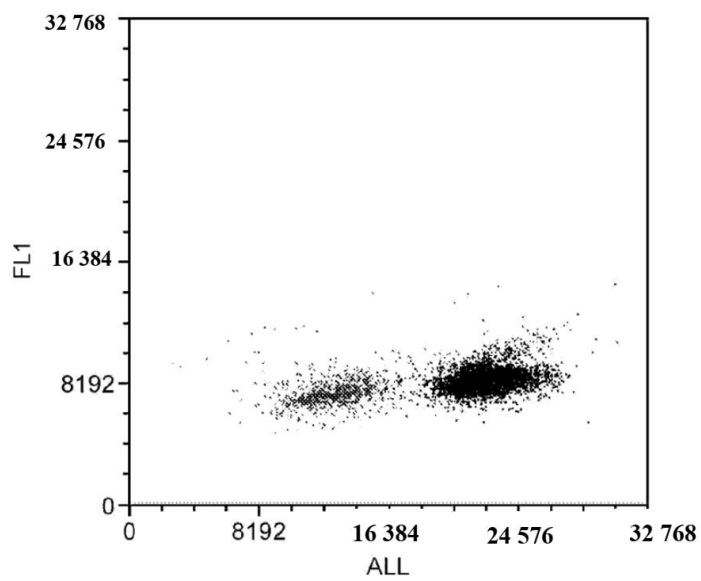
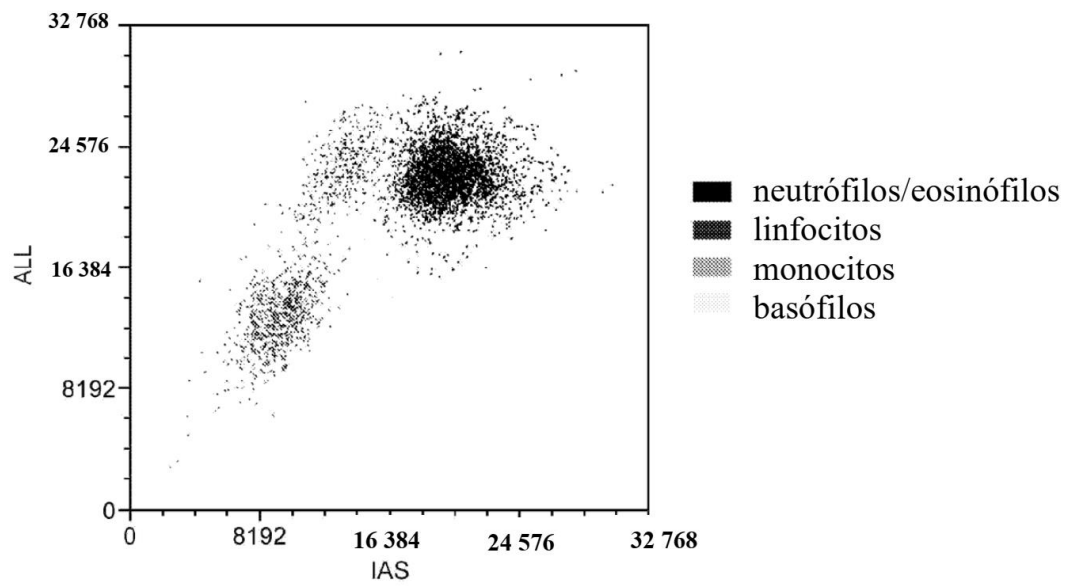


Figura 7A

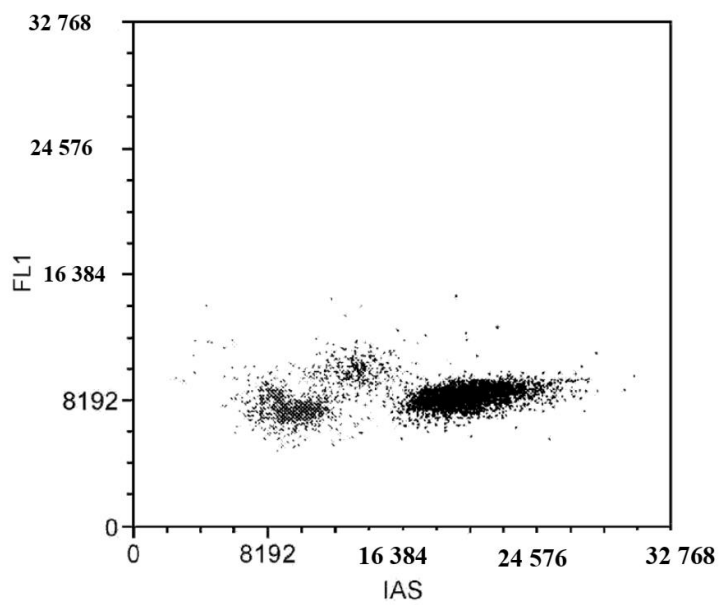
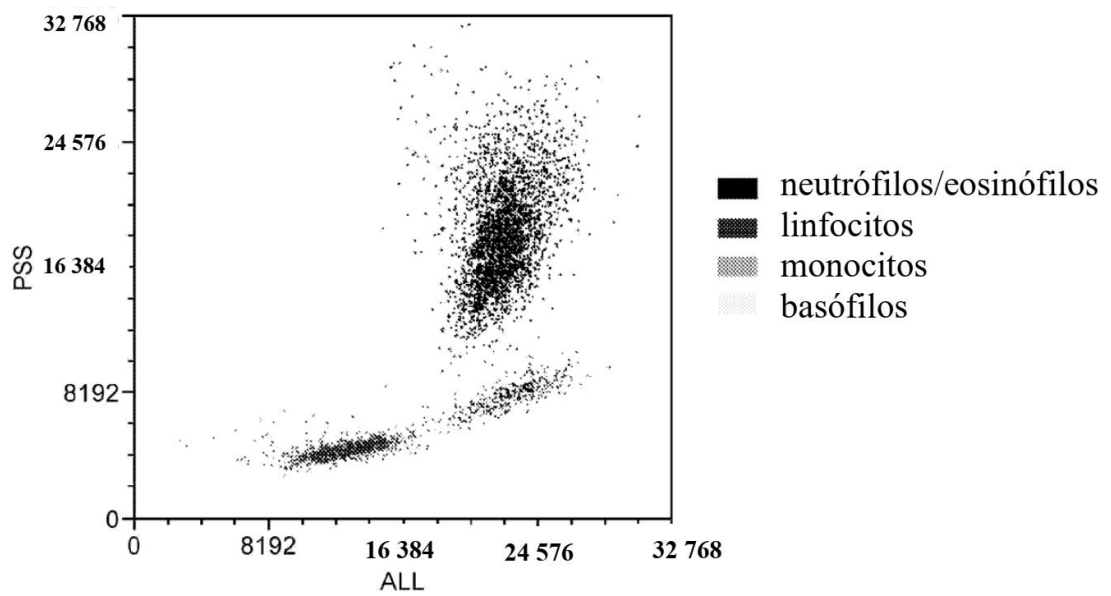


Figura 7B

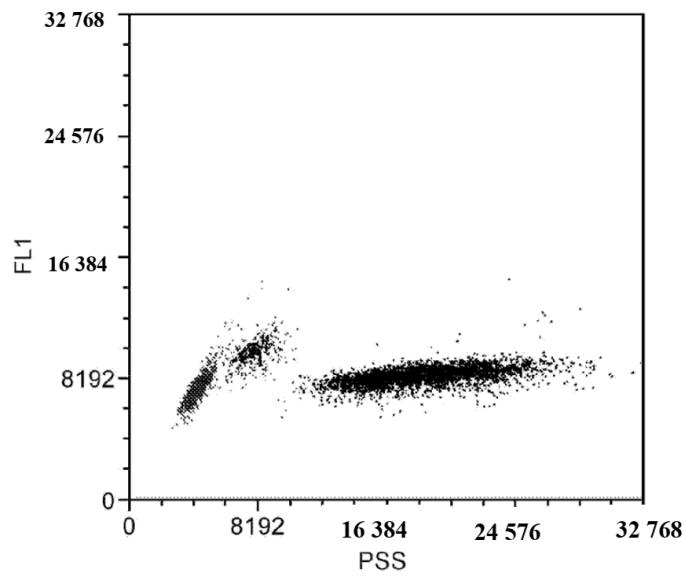
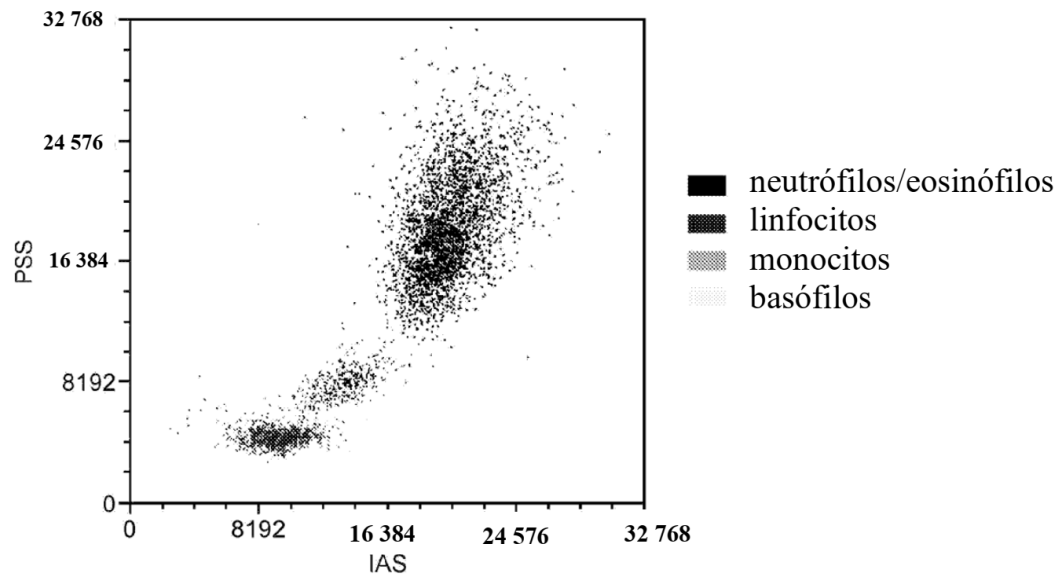


Figura 7C

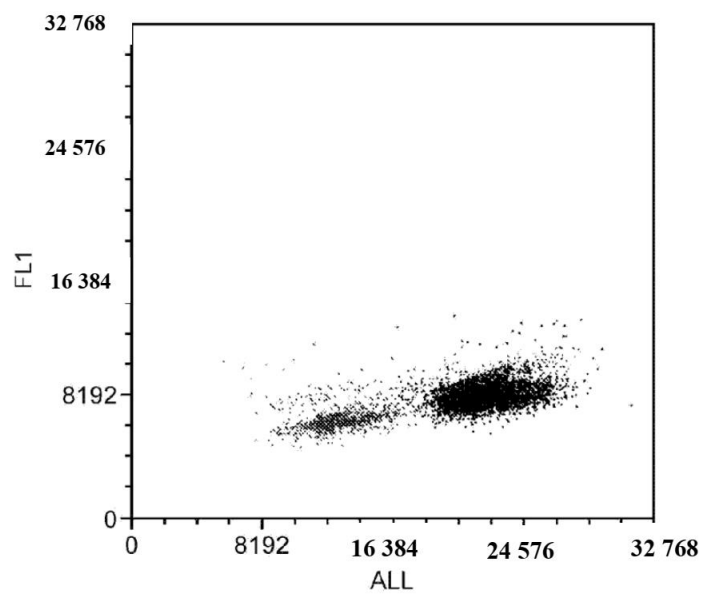
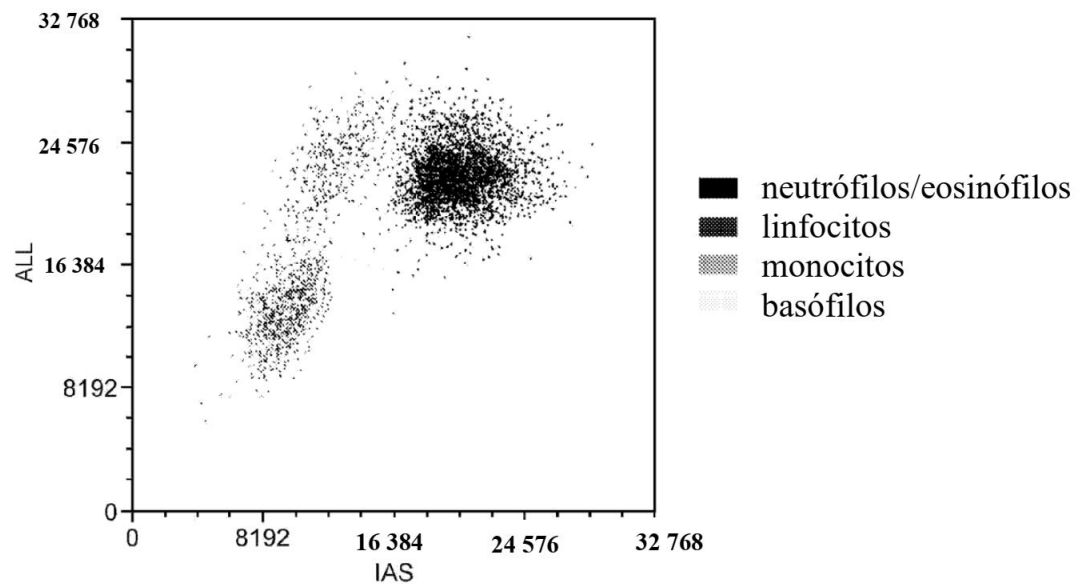


Figura 8A

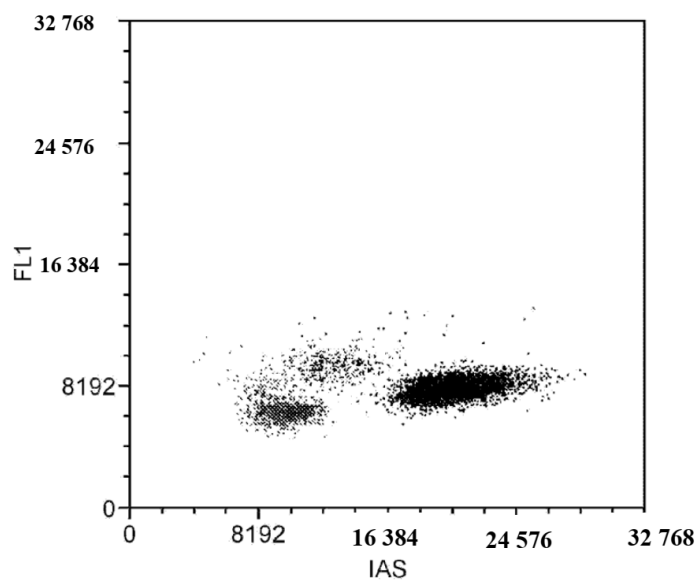
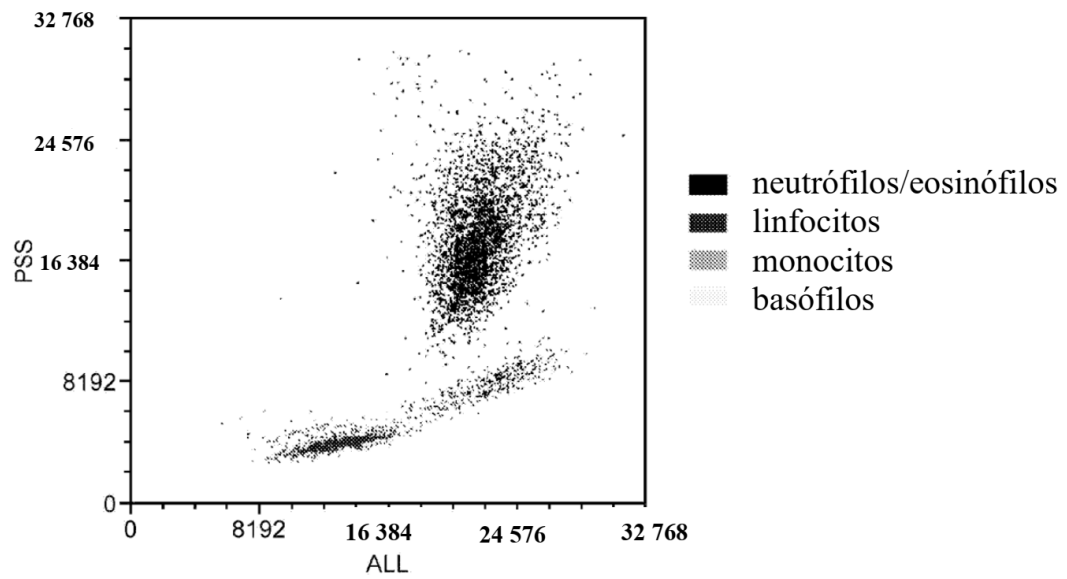


Figura 8B

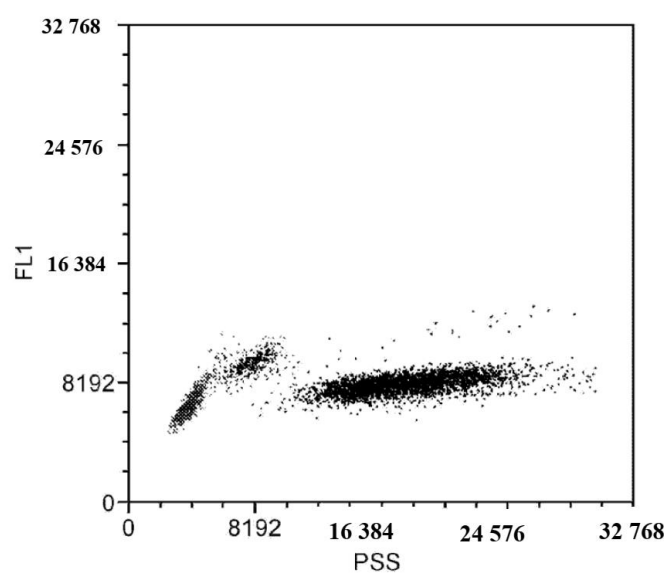
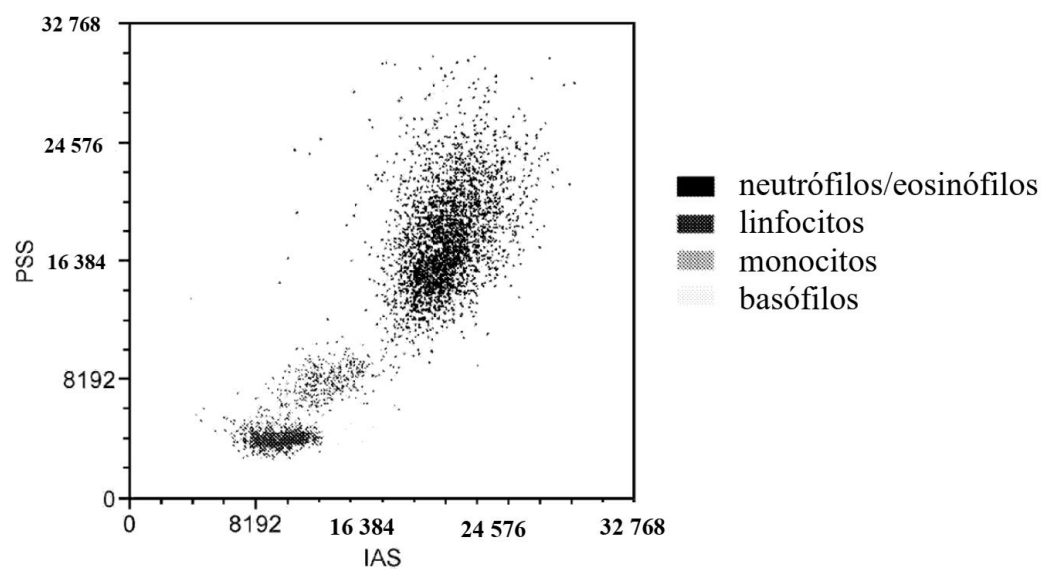


Figura 8C

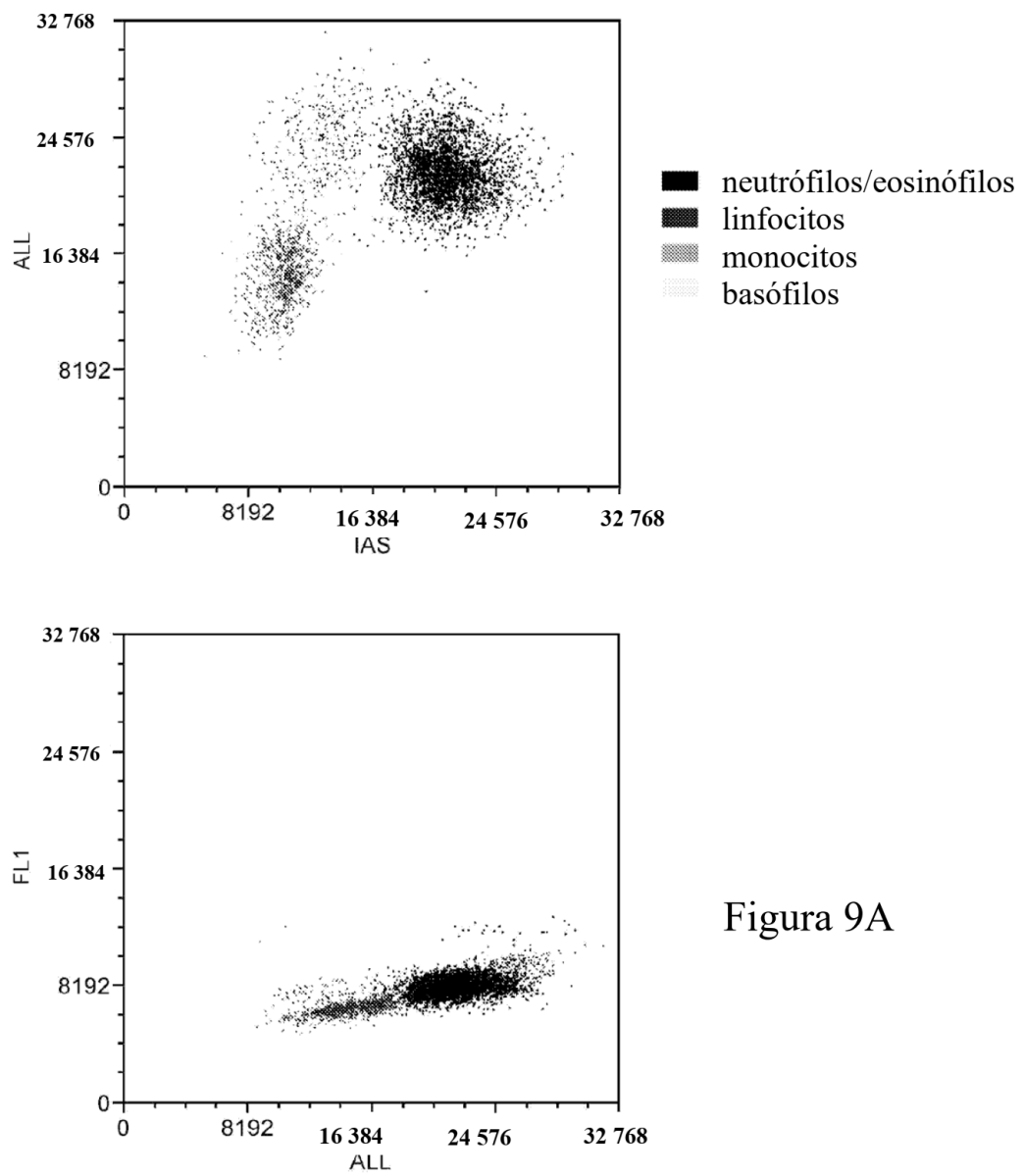


Figura 9A



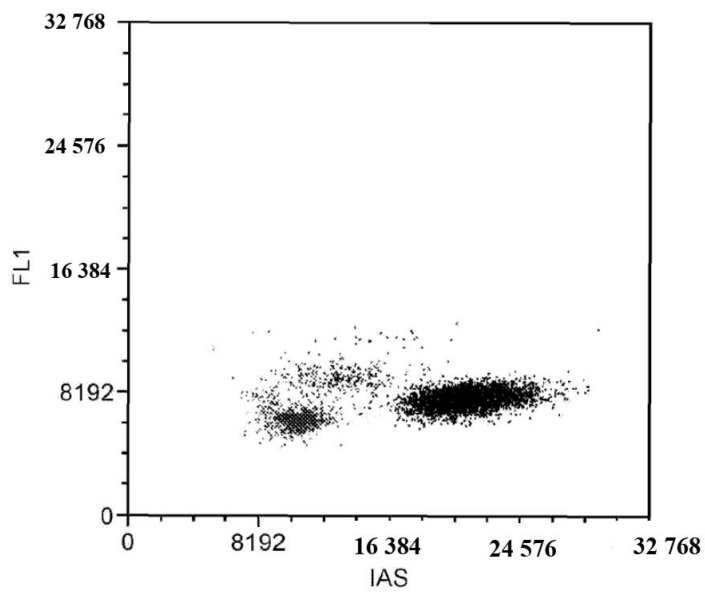
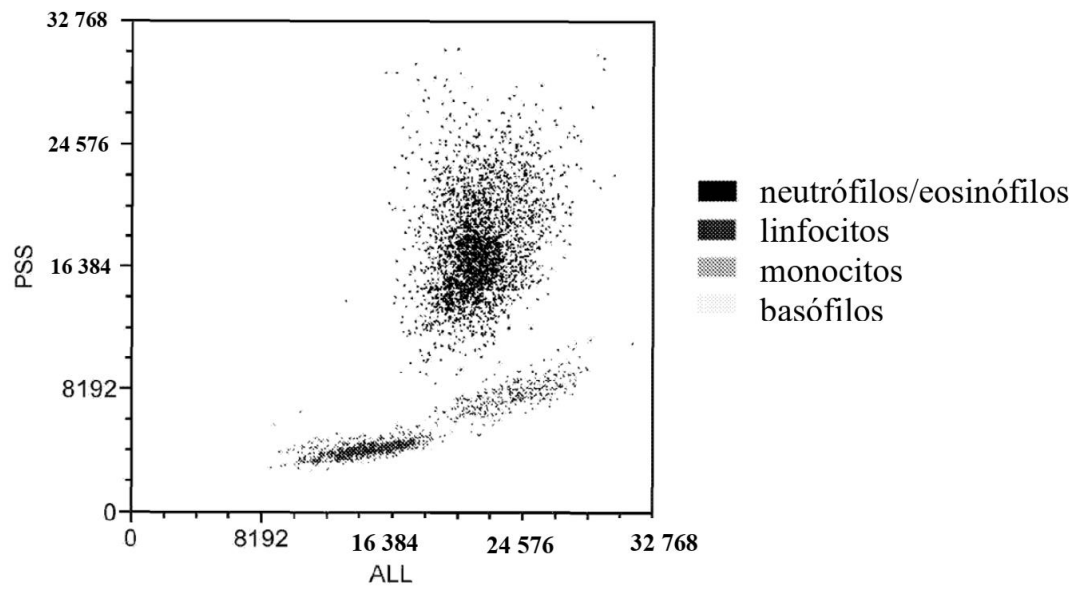


Figura 9B

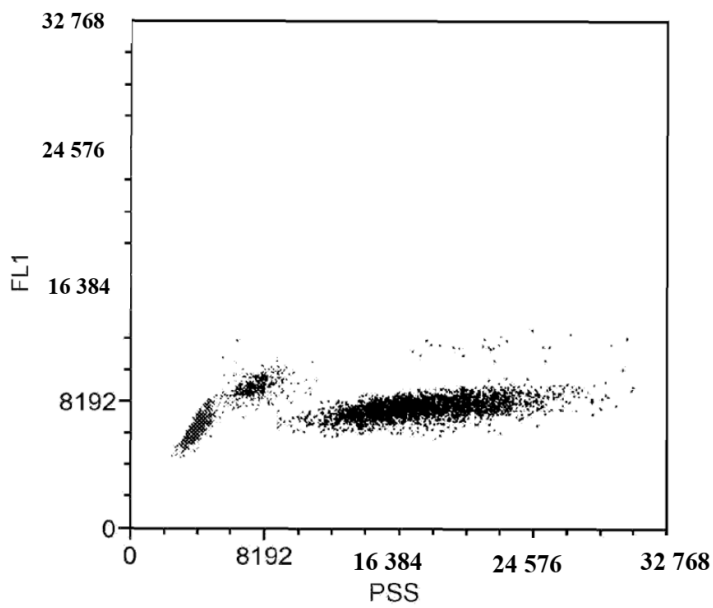
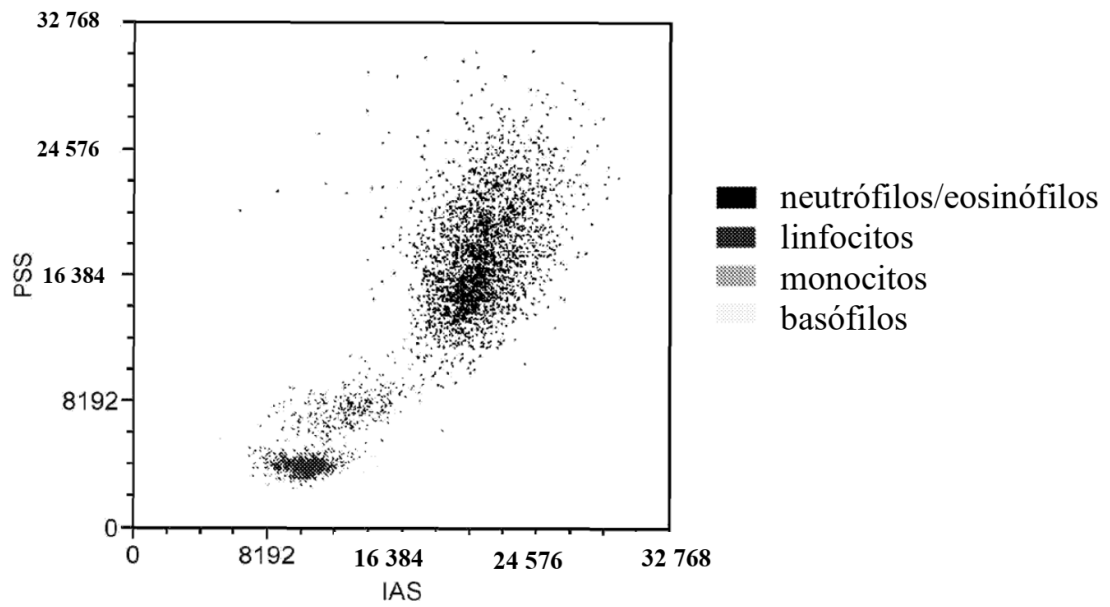


Figura 9C

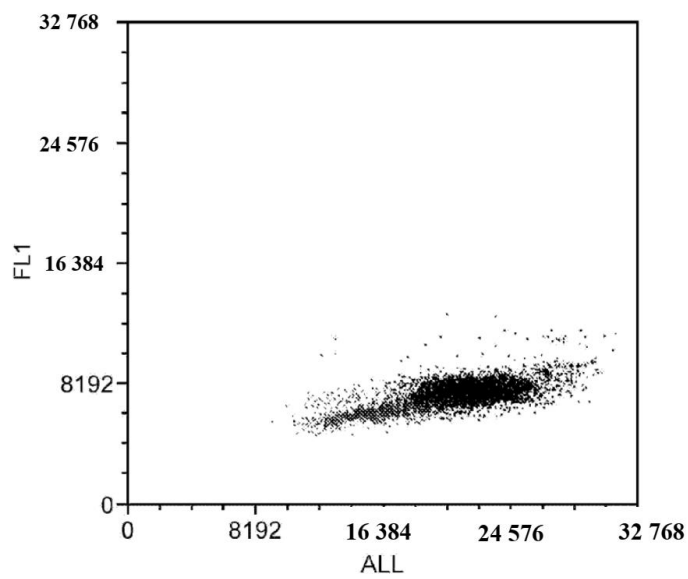
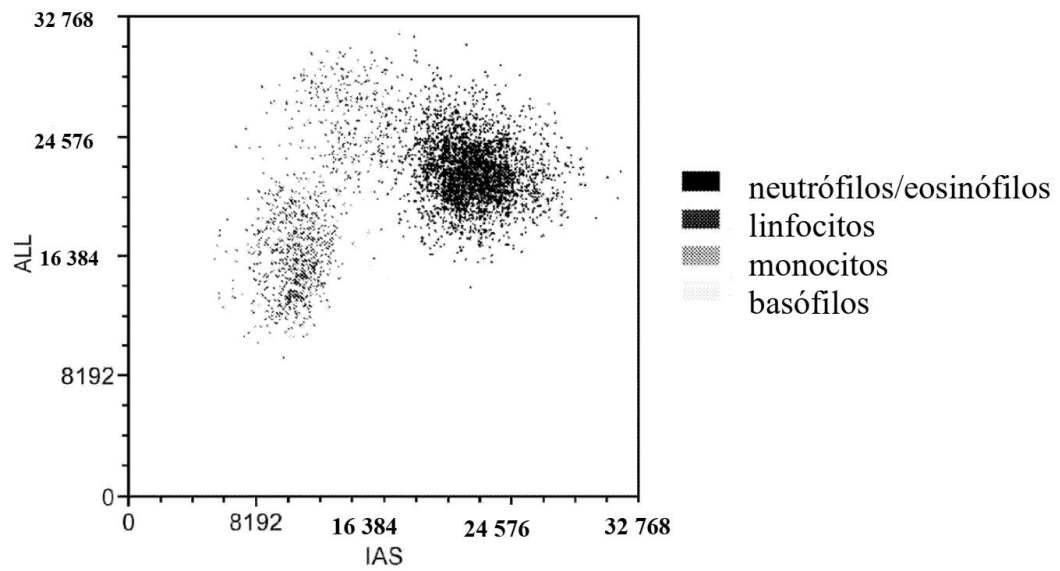


Figura 10A

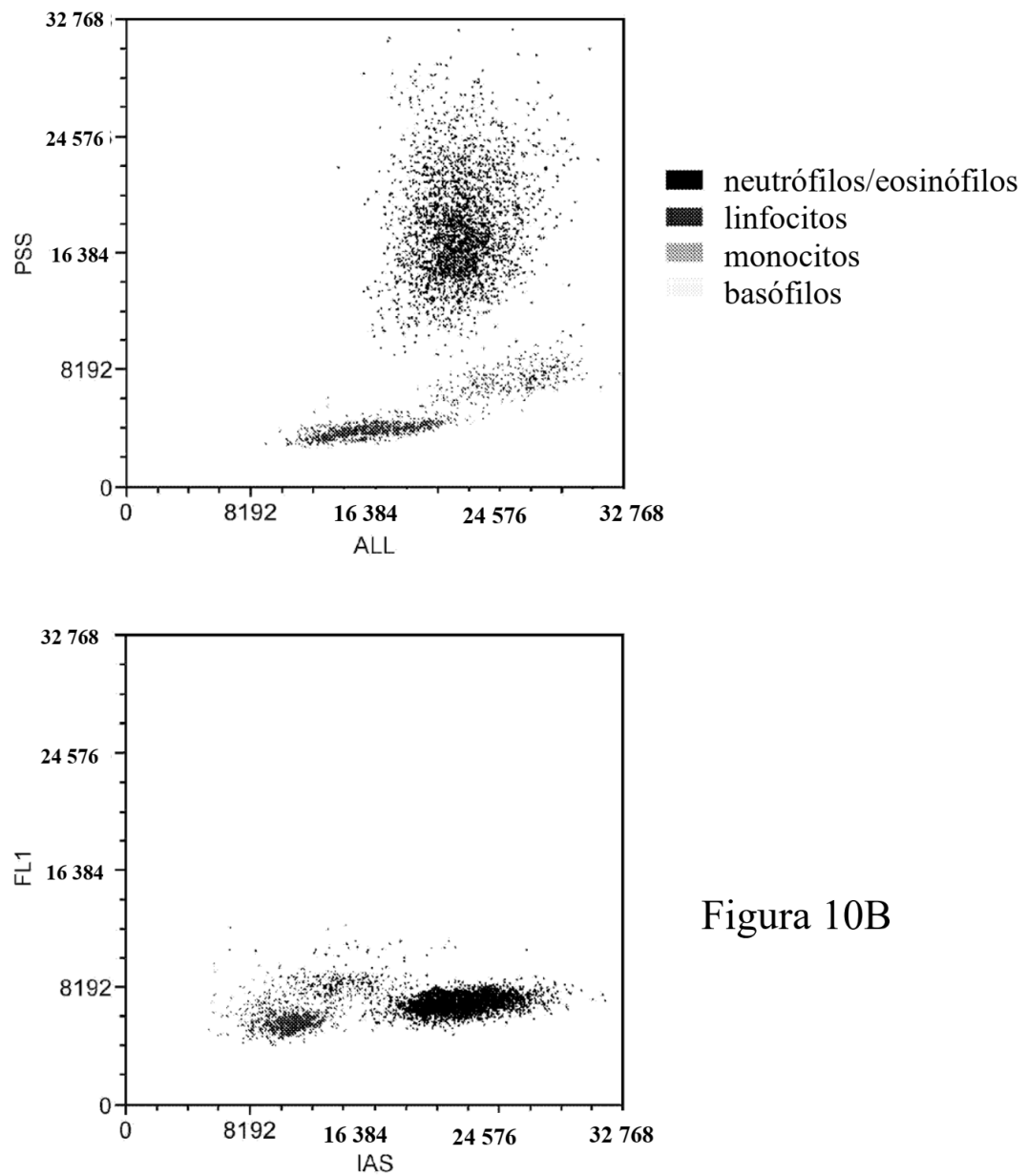


Figura 10B

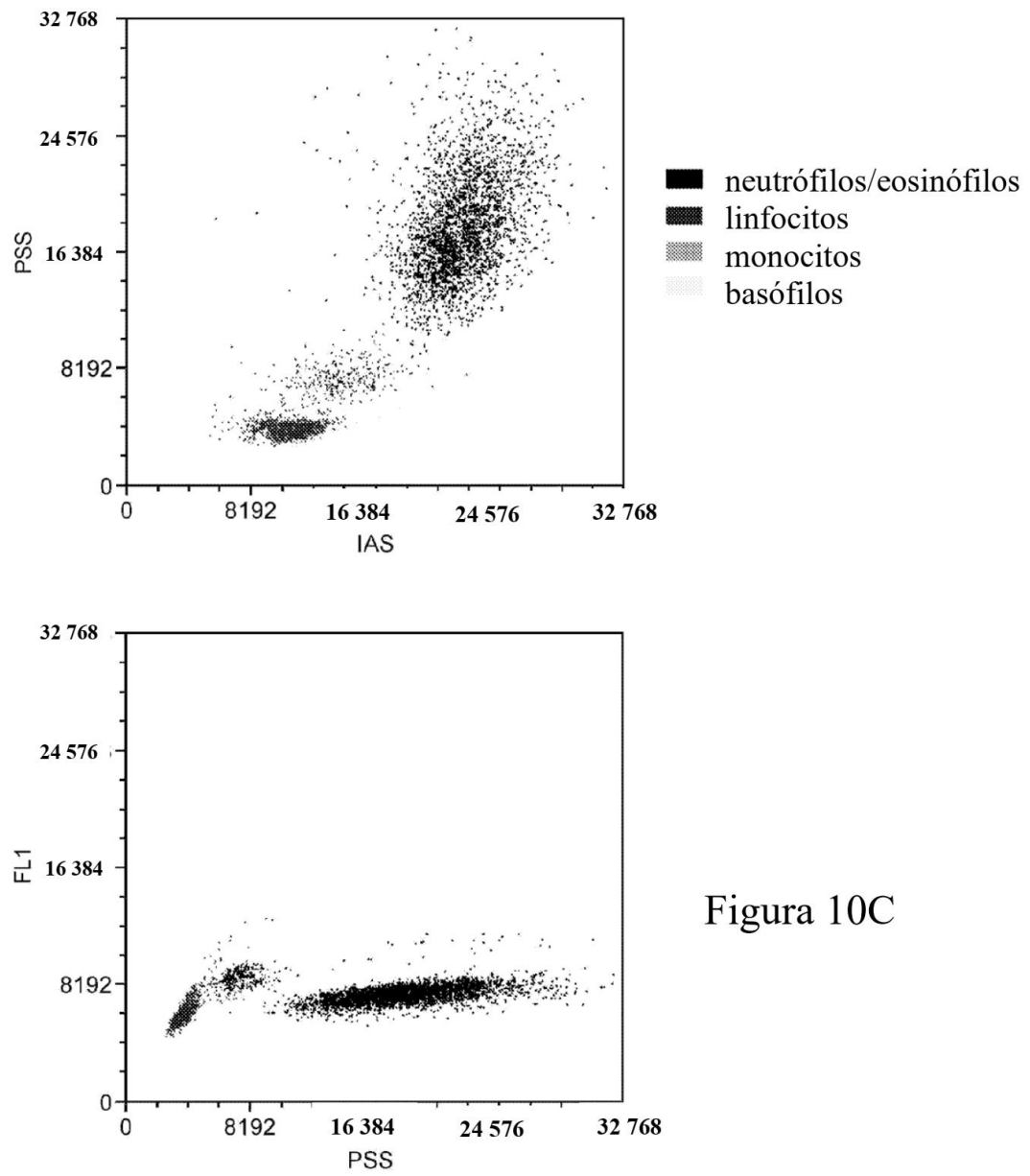


Figura 10C

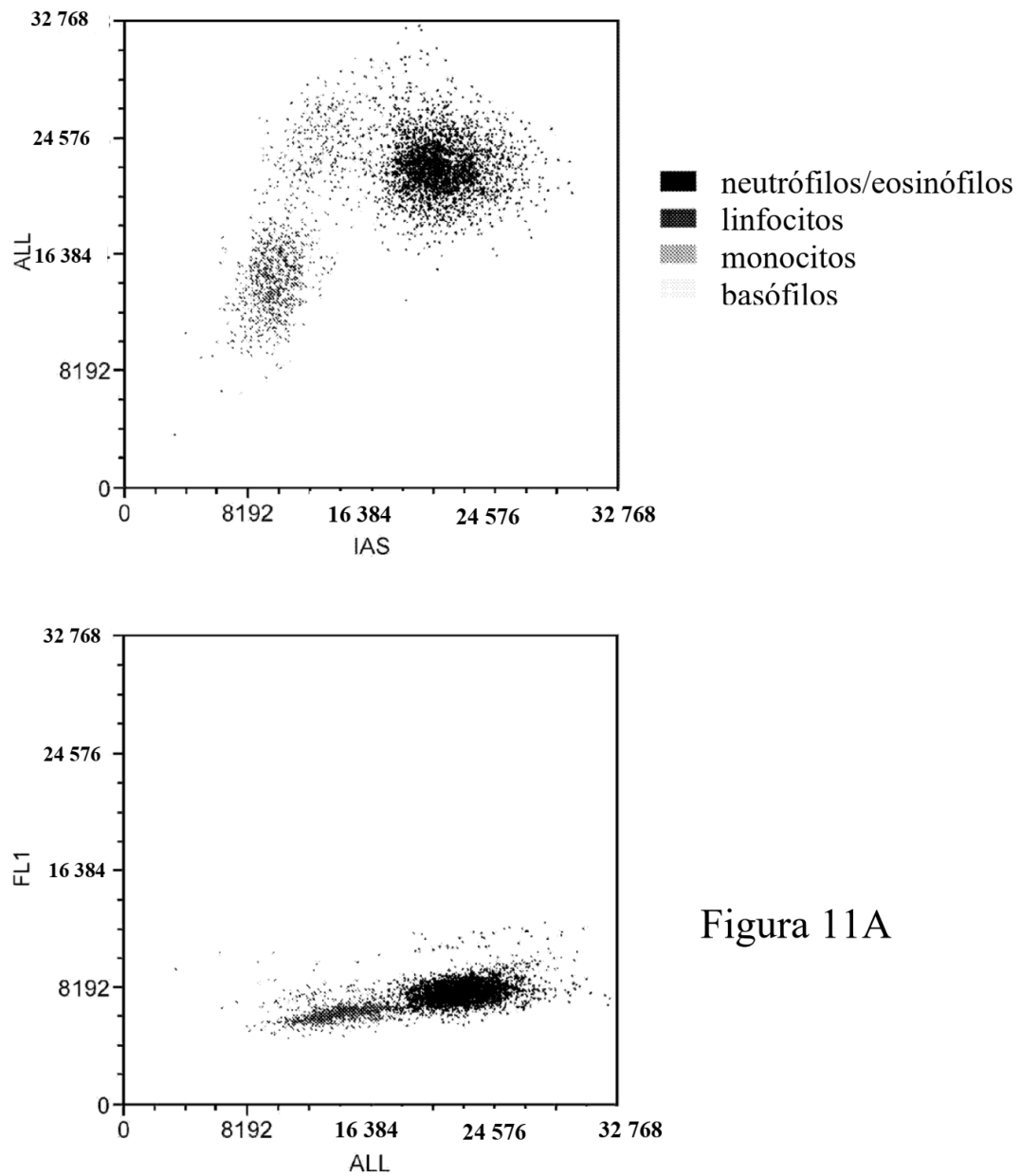


Figura 11A

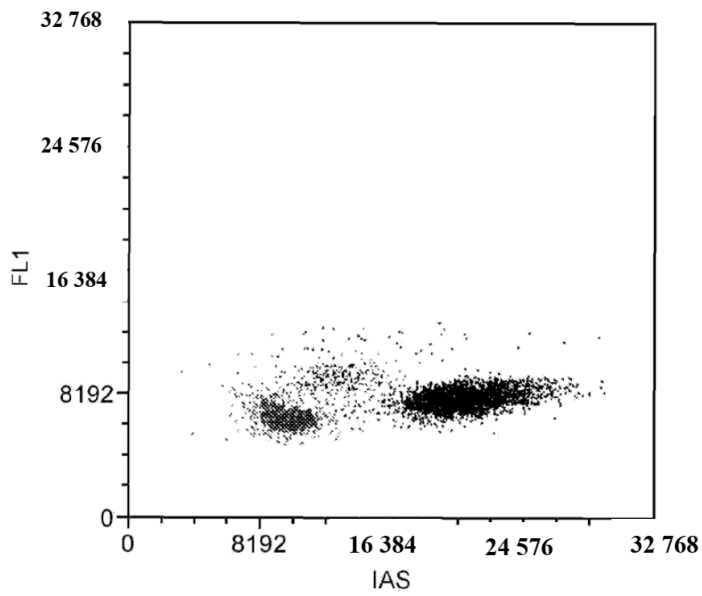
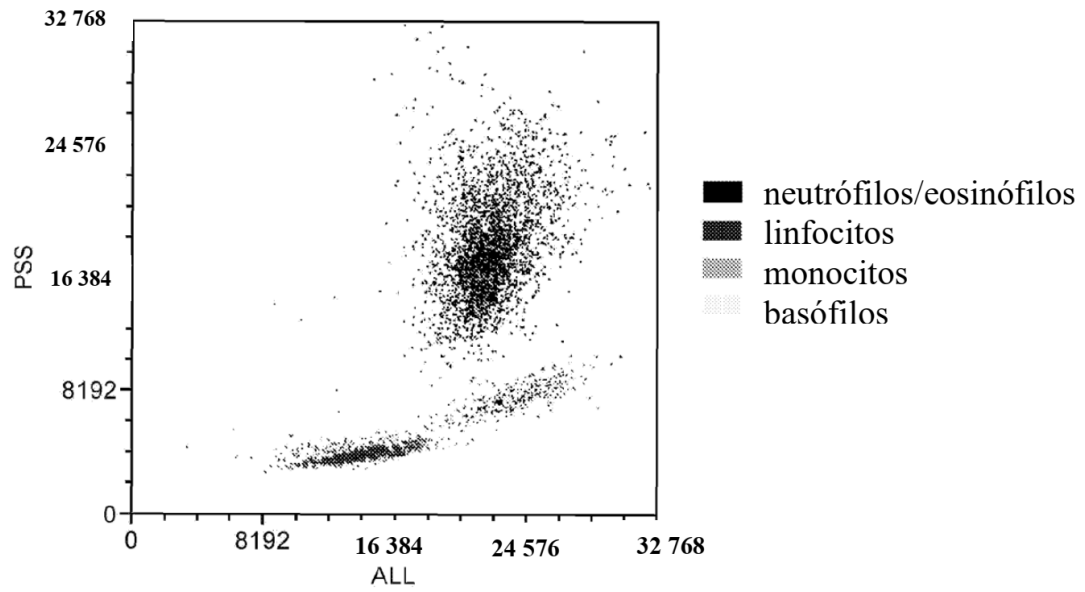


Figura 11B

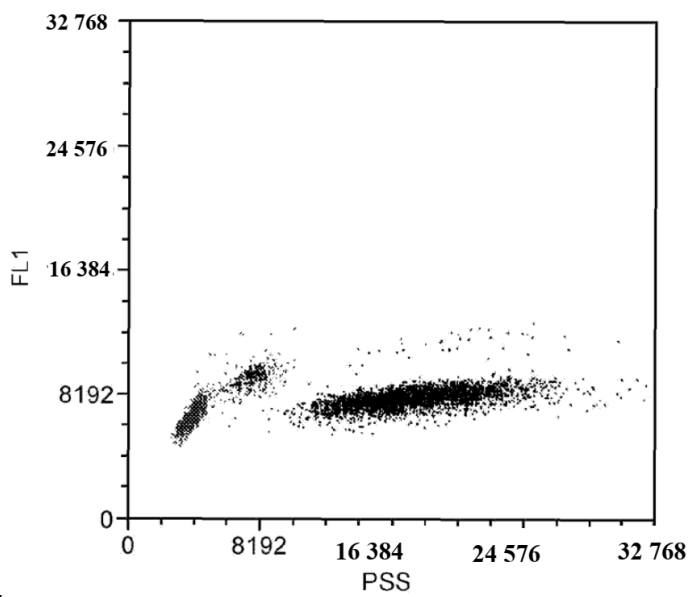
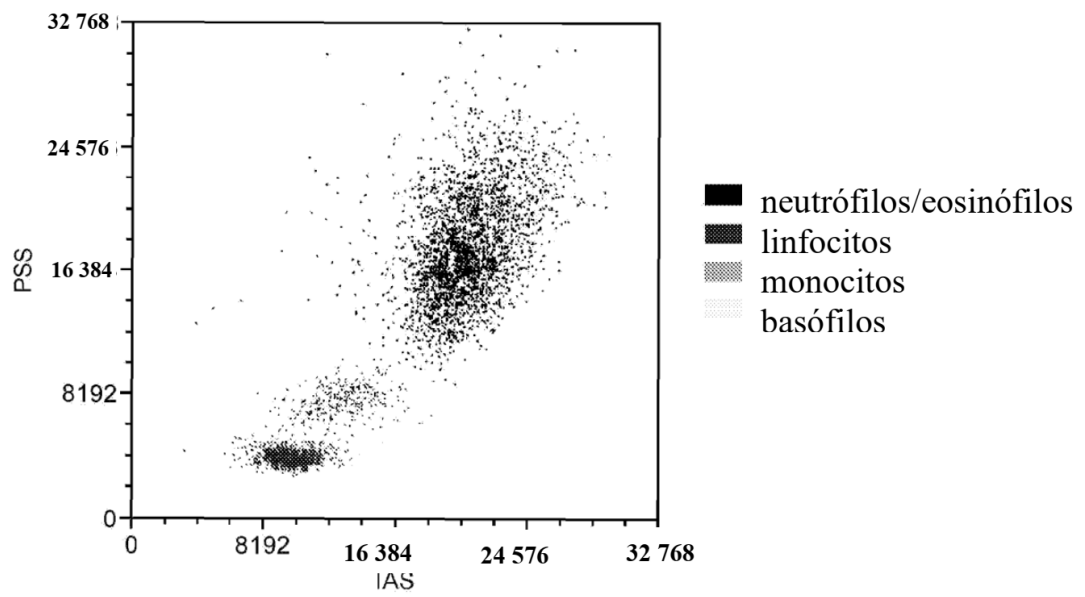


Figura 11C



(0,5 %  $\text{NH}_4\text{Cl}$ )

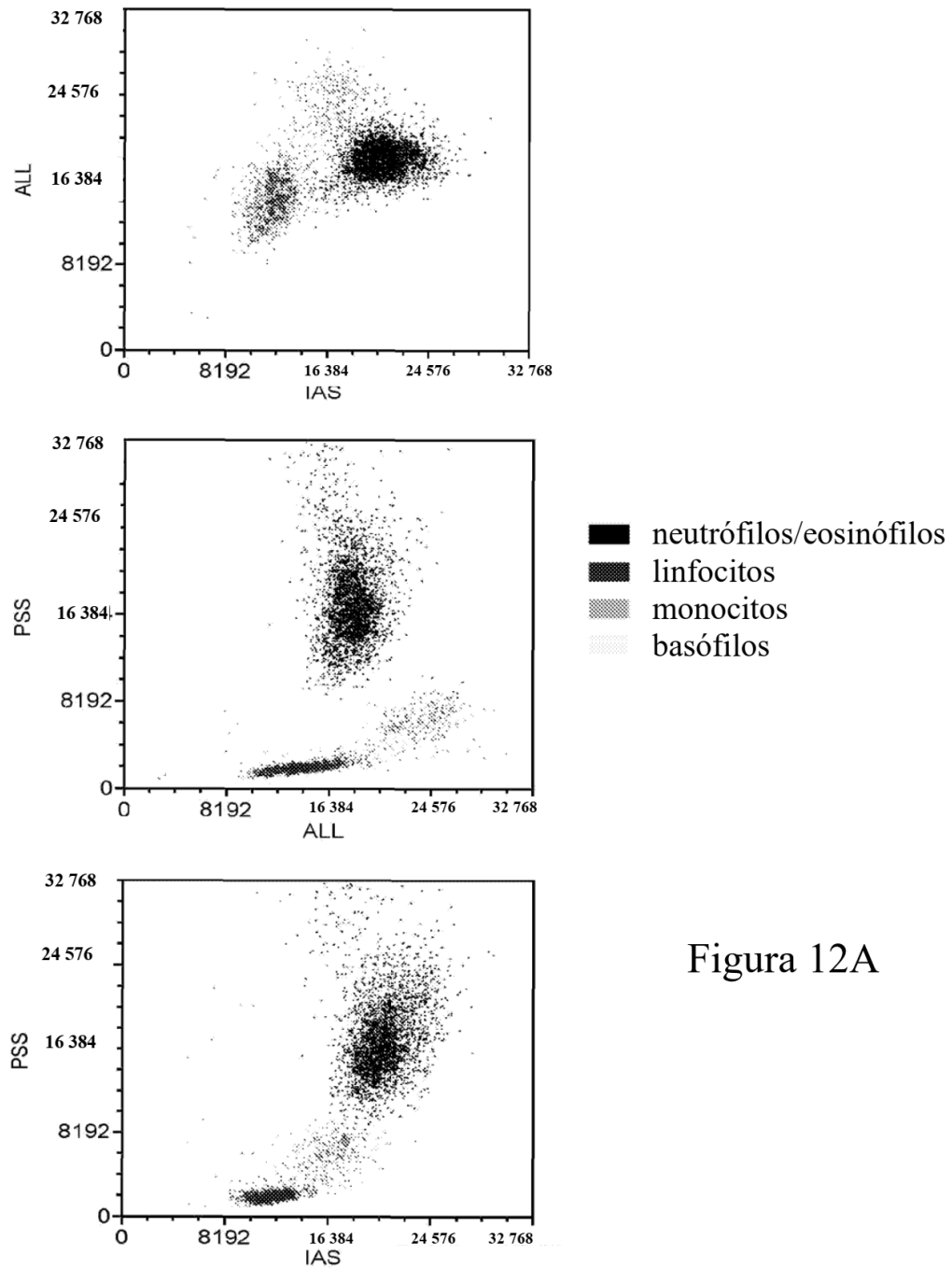


Figura 12A

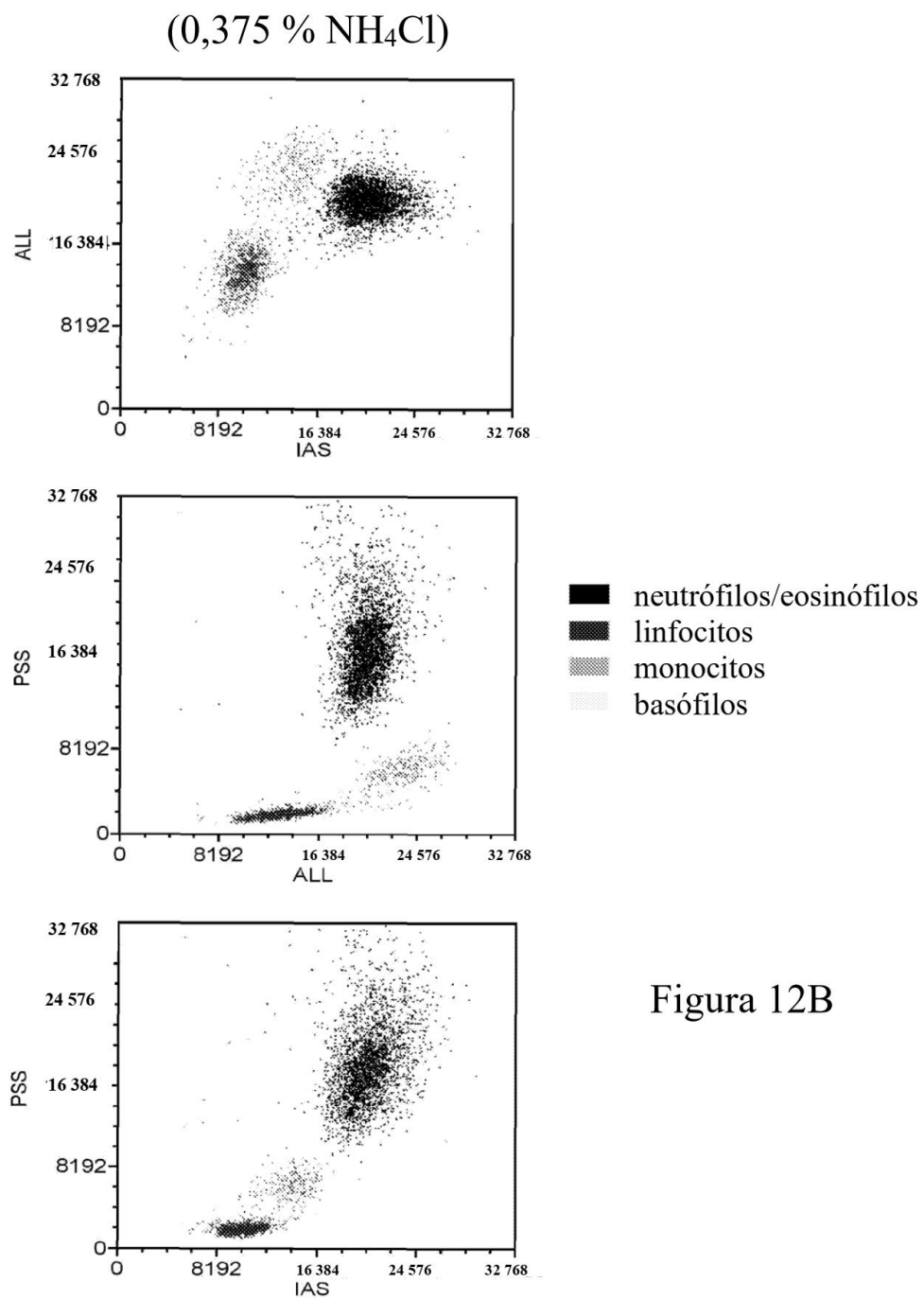
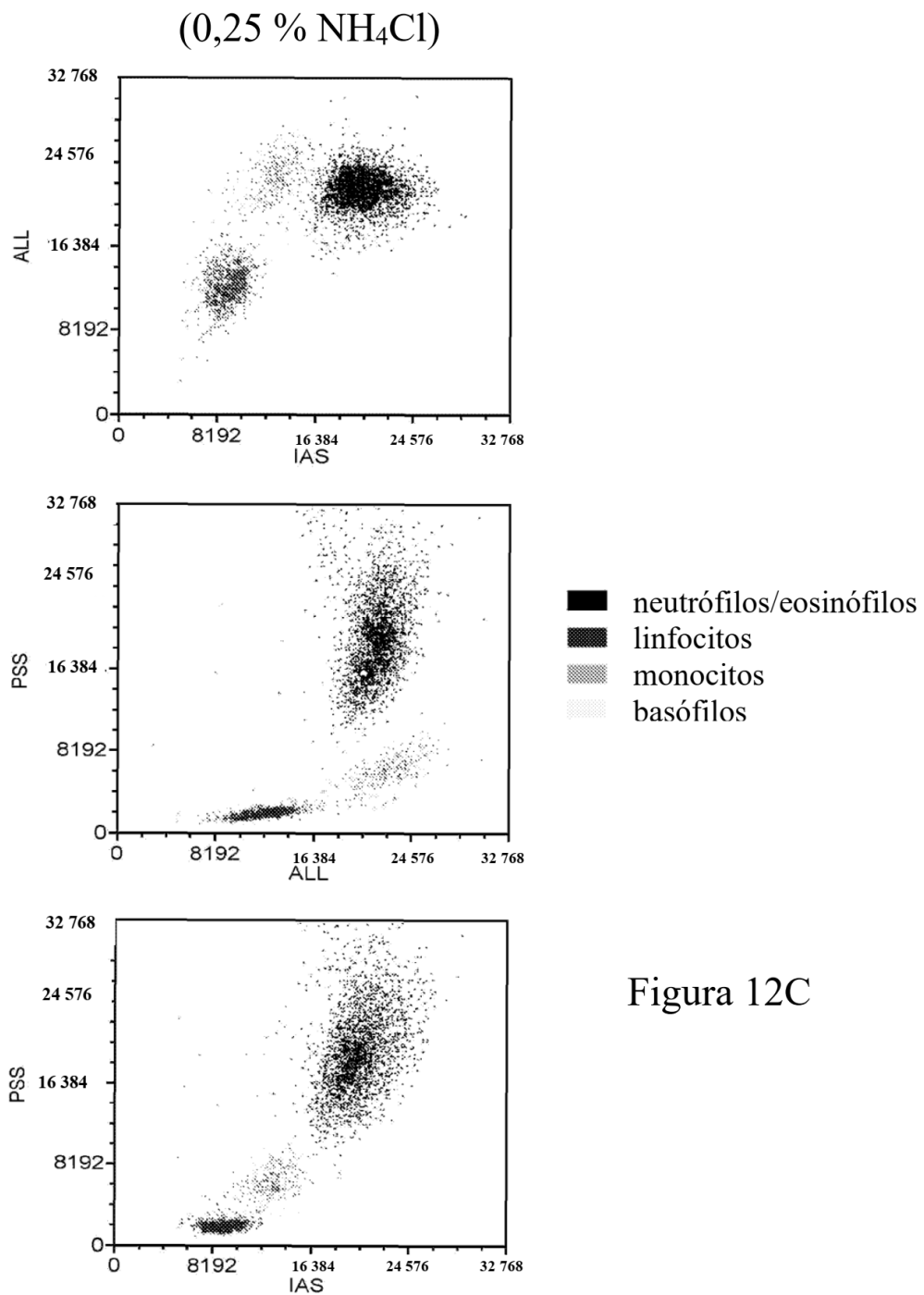


Figura 12B



(0,125 %  $\text{NH}_4\text{Cl}$ )

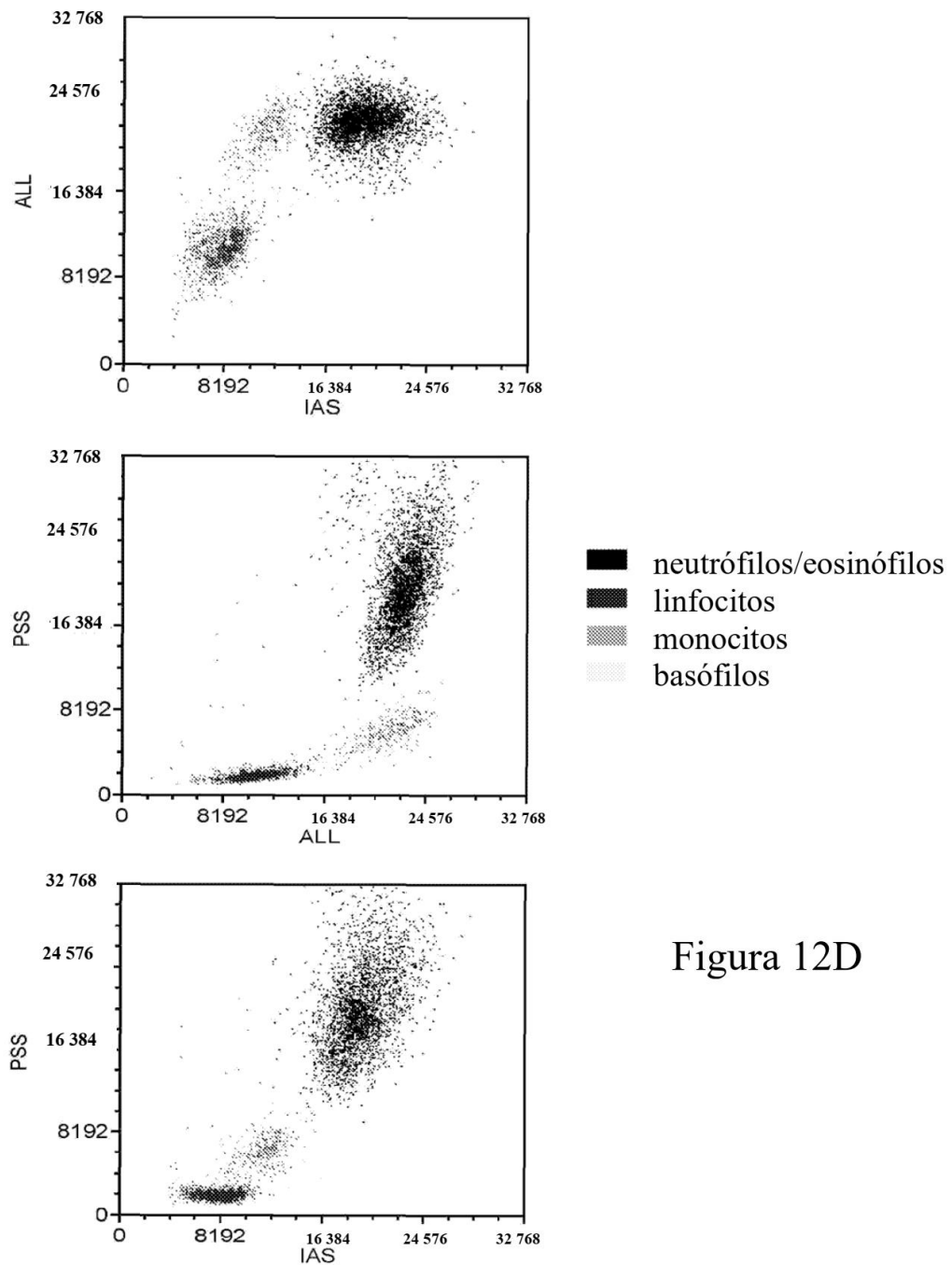


Figura 12D

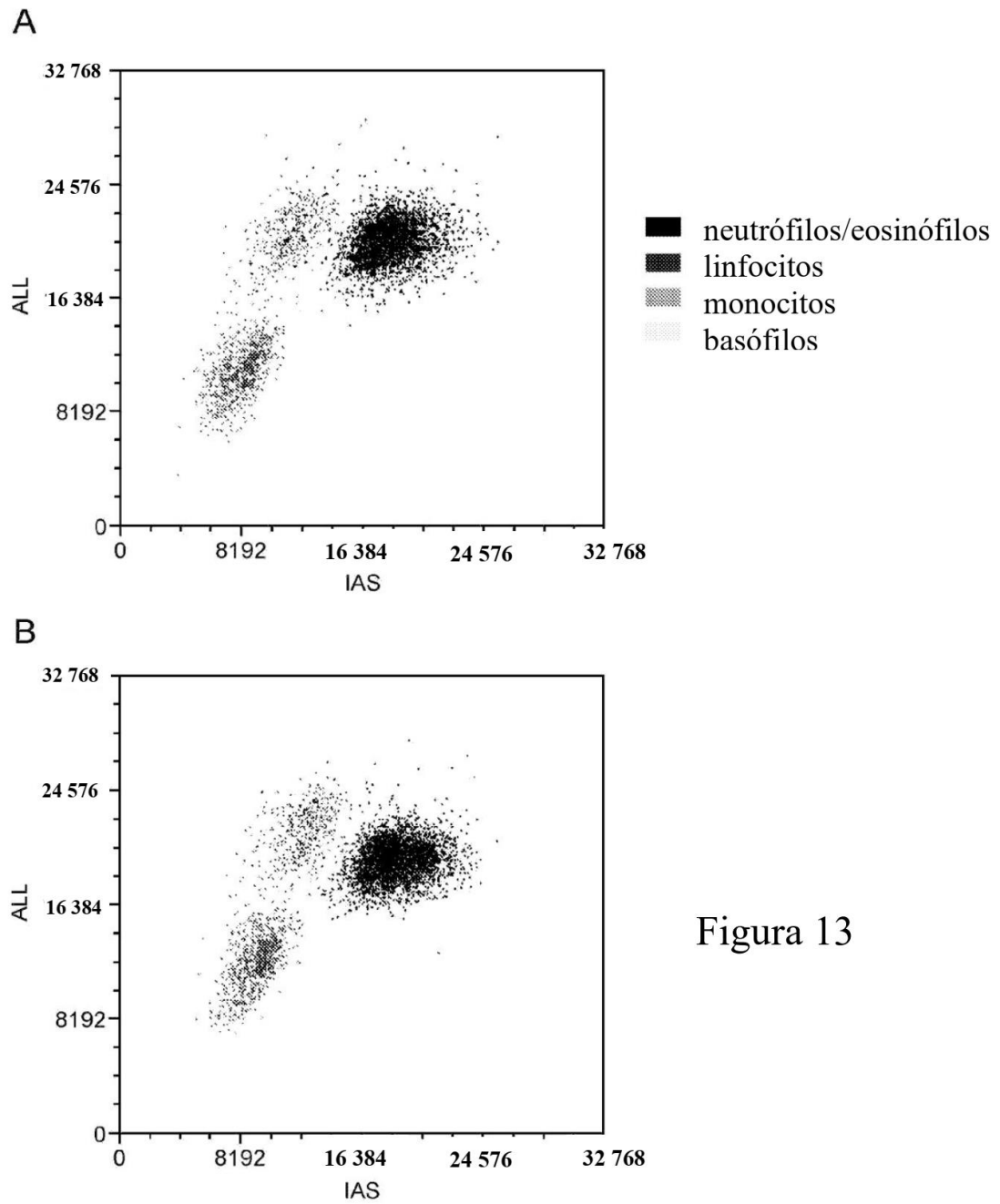


Figura 13

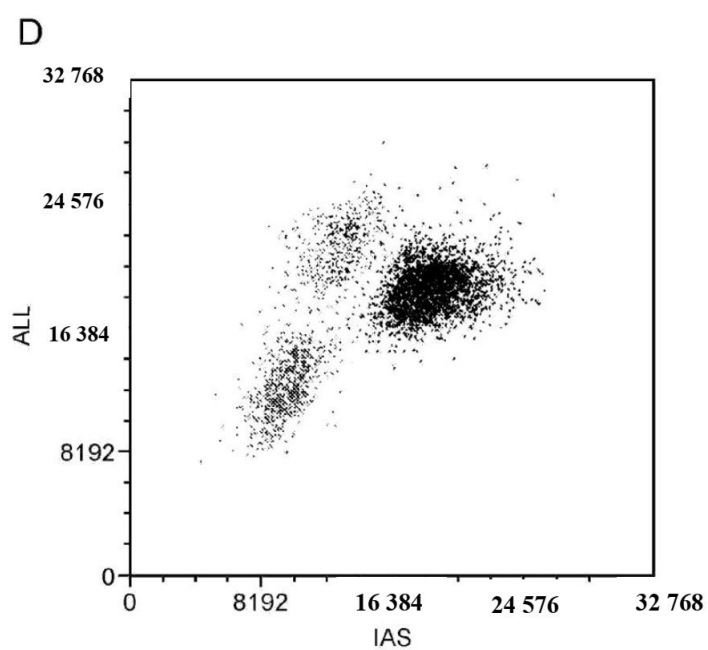
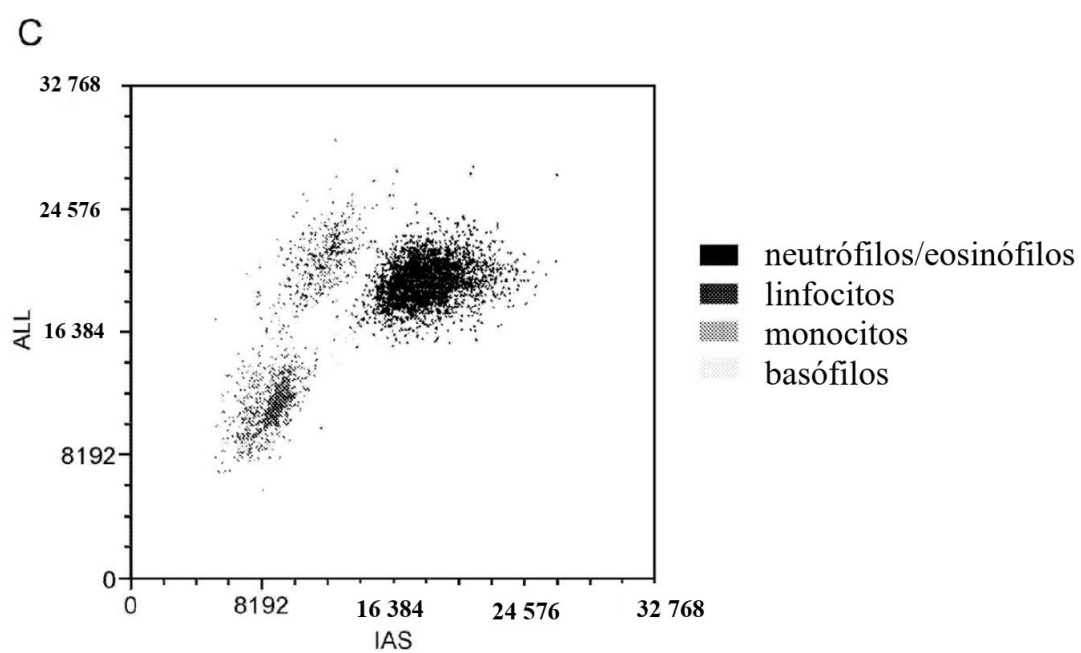


Figura 13  
(continuación)

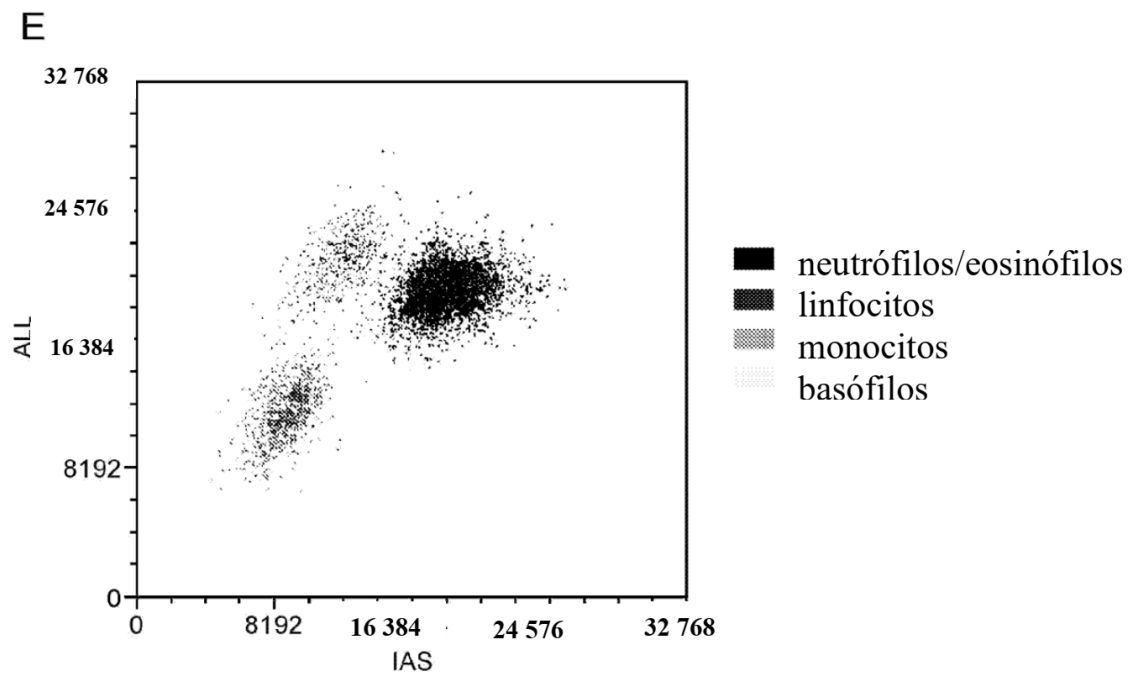


Figura 13  
(continuación)

Figura 14

