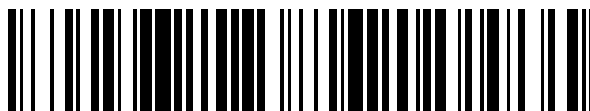


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 352**

51 Int. Cl.:
G01N 15/14 (2006.01)
G01N 1/10 (2006.01)
B01L 3/14 (2006.01)
H04L 25/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01937695 .3**
96 Fecha de presentación: **24.05.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1297334**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2003**

54 Título: **Procedimiento para analizar una muestra sanguínea o una muestra de un derivado sanguíneo usando un sistema hematológico basado en citometría de flujo**

30 Prioridad:
02.06.2000 US 208849 P
17.11.2000 US 715593

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.04.2012

73 Titular/es:
IDEXX LABORATORIES, INC.
ONE IDEXX DRIVE
WESTBROOK, ME 04092, US

72 Inventor/es:
ROCHE, John, W.;
HANSEN, W., Peter;
JULIAN, Marcus, F.;
FLYNN, Harold, C., Jr.;
RUSSELL, James, W.;
COLEMAN, Michelle, L. y
CREWS, Harold, R.

74 Agente/Representante:
González Palmero, Fé

ES 2 378 352 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

Procedimiento para analizar una muestra sanguínea o una muestra de un derivado sanguíneo usando un sistema hematológico basado en citometría de flujo

5

Esta invención se refiere en general al análisis de biopartículas, y más específicamente a un procedimiento para analizar una muestra sanguínea o una muestra de un derivado sanguíneo usando un sistema hematológico basado en citometría de flujo. Dicho sistema emplea un conjunto de características seleccionadas que, en combinación, proporcionan al menos un recuento sanguíneo completo, un recuento diferencial en cinco partes de leucocitos, y un

10

recuento de reticulocitos en un sistema que es pequeño, fiable y lo suficientemente económico como para ser adecuado para su uso en pequeños laboratorios clínicos, consultas médicas, consultas veterinarias y similares.

La sangre periférica de los mamíferos contiene habitualmente tres clasificaciones principales de los tipos celulares sanguíneos - eritrocitos (*red blood cells*, "RBCs"), leucocitos (*white blood cells*, "WBCs") y plaquetas (*platelets*, "PLT"). Estas células están suspendidas en una disolución denominada plasma, que contiene muchas proteínas, enzimas e iones diferentes. Las funciones de los componentes plasmáticos engloban la coagulación sanguínea, el

15

mantenimiento de la osmolalidad, la inmunovigilancia y muchas otras funciones.

Los mamíferos tienen habitualmente cualquier cifra entre $2-10 \times 10^{12}$ eritrocitos por litro. Los eritrocitos son responsables del transporte de oxígeno y de dióxido de carbono en el sistema circulatorio. En muchos mamíferos, incluyendo los seres humanos, los eritrocitos maduros normales tienen una forma transversal bicóncava y carecen de núcleo. Los eritrocitos pueden tener un diámetro de entre 4 y 9 micrómetros, dependiendo de la especie, y tienen un espesor que generalmente es inferior a 2 micrómetros. Dentro de los eritrocitos hay una proteína conocida como hemoglobina, que realiza el doble papel de transporte de oxígeno y de dióxido de carbono, y que está presente a

25

una concentración muy alta. La hemoglobina es responsable de la coloración global roja de la sangre, debido a la presencia de hierro en la molécula. En la presente solicitud, los términos "eritrocitos", "células rojas sanguíneas", "células rojas" y "RBCs" se usan de forma intercambiable para referirse a las células sanguíneas que contienen hemoglobina presentes en la circulación, según se describió anteriormente.

Además de los eritrocitos normales, a menudo pueden encontrarse más formas inmaduras de los eritrocitos en muestras de sangre periférica. La forma ligeramente inmadura de los eritrocitos se denomina reticulocito, y las formas muy inmaduras se denominan ampliamente eritrocitos nucleados (*nucleated red blood cells*, NRBCs). Prácticamente todos los animales no mamíferos tienen exclusivamente eritrocitos nucleados en su sangre.

30

Un reticulocito es un precursor de un eritrocito que ha completado la mayoría de las etapas de desarrollo celular normales en la médula ósea, y que ha expulsado su núcleo. La última porción que queda por abandonar del reticulocito antes de que se transforme en un eritrocito realmente maduro es el ARN transferente. La detección de los reticulocitos es importante en la evaluación clínica de la capacidad de los pacientes para producir nuevos eritrocitos. El recuento de reticulocitos también puede usarse para distinguir entre los distintos tipos de anemia. En la anemia, la producción de eritrocitos está disminuida hasta el punto en que ya no se puede continuar con la eliminación de eritrocitos, y como resultado el recuento eritrocitario global y el hematocrito son bajos. La presencia de un incremento en el número de reticulocitos en estos pacientes proporciona una prueba de que la médula ósea está funcionando, y de que está intentando compensar la deficiencia de eritrocitos. Si hay una cifra baja o no detectable de reticulocitos en estos pacientes, la médula ósea no está respondiendo adecuadamente a la deficiencia

35

40

45

en eritrocitos.

Los leucocitos (*white blood cells*, WBCs) existen en la sangre periférica en concentraciones muy bajas en comparación con los eritrocitos. Las concentraciones normales de estas células varían entre $5-15 \times 10^9$ por litro, lo que es aproximadamente tres órdenes de magnitud menos que los eritrocitos. Estas células son generalmente mayores que los eritrocitos, teniendo unos diámetros de entre 6 y 13 micrómetros, dependiendo del tipo de linfocito y de la especie. Al contrario que los eritrocitos, existe una variedad de tipos celulares de linfocitos que realizan diferentes funciones en el cuerpo. En esta solicitud, los términos "células blancas sanguíneas", "células blancas" y "WBCs" se usan de forma intercambiable para referirse a las células sanguíneas nucleadas que no contienen hemoglobina presentes en la circulación, según se describió anteriormente.

55

La medición del número de leucocitos es importante en la detección y la monitorización de diversas alteraciones fisiológicas. Unas cifras elevadas de leucocitos anormales son un signo de leucemia, que es una proliferación incontrolada de una célula mielógena o linfógena. La neutrofilia, o cifras muy aumentadas de neutrófilos, es una indicación de inflamación o de destrucción tisular en el cuerpo, por cualquiera que sea la causa.

60

Los leucocitos pueden clasificarse ampliamente como granulares o agranulares. Las células granulares, o granulocitos, se subdividen adicionalmente en neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los linfocitos agranulares se denominan a menudo células mononucleares, y se subclasifican en linfocitos y monocitos. Las mediciones de estas dos subclasificaciones principales de los linfocitos (granulocitos y células mononucleares) se denominan un recuento diferencial de leucocitos en dos partes (o diferencial en dos partes). Las mediciones de los componentes de estas subclasificaciones (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos), producen un

65

recuento diferencial de leucocitos en cinco partes (o diferencial en cinco partes).

Los neutrófilos son la más prevalente de las cinco principales clases de leucocitos, su poniendo habitualmente un poco más de la mitad del número total de leucocitos totales. Los neutrófilos se denominan así porque contienen 5 gránulos en su citoplasma, que pueden ser teñidos con una tinción de pH neutro. Estas células tienen una vida relativamente corta, del orden de un día o menos. Los neutrófilos atacan y destruyen bacterias invasoras, y otros agentes extraños en los tejidos o la sangre circulante como parte de los mecanismos de respuesta inmunitaria del cuerpo.

10 Los eosinófilos son los siguientes más prevalentes de los granulocitos, por detrás de los neutrófilos, pero generalmente suponen menos del cinco por ciento del número total de leucocitos. Los eosinófilos también pueden contener granulocitos en su citoplasma, que pueden ser teñidos con una tinción de eosina. Al igual que los neutrófilos, estas células no existen durante largos períodos de tiempo en la sangre periférica. Los eosinófilos juegan un papel en los mecanismos de respuesta inmunitaria del cuerpo que se asocian habitualmente con alergias o 15 infecciones parasitarias.

Los basófilos son los menos comunes de los granulocitos, y los menos comunes de las cinco clasificaciones de leucocitos. Dado que son granulocitos, contienen gránulos en su citoplasma que pueden ser teñidos, en este caso usando una tinción a pH básico (alto). También se sabe que estas células juegan un papel en los mecanismos de 20 respuesta inmunitaria del cuerpo, pero no se conocen en concreto.

Los linfocitos son los más prevalentes de los tipos celulares mononucleares, y generalmente suponen entre el 20 y el 30 por ciento del número total de leucocitos. Los linfocitos no tienen gránulos en su citoplasma, y su núcleo ocupa una gran mayoría del volumen celular. La pequeña zona de citoplasma de los linfocitos puede teñirse, ya que 25 contiene ARN. Los linfocitos circulan en la sangre periférica, abandonan la circulación como parte del mecanismo de respuesta inmunitaria del cuerpo, y finalmente retornan a la sangre periférica. Muchos linfocitos son células relativamente longevas.

Los monocitos son formas inmaduras de los macrófagos que, por sí mismos, tienen poca capacidad para enfrentarse 30 a agentes infecciosos en la sangre circulante. Sin embargo, cuando hay una infección en los tejidos que rodean a un vaso sanguíneo, estas células abandonan la sangre circulante y entran en los tejidos circundantes. Cuando esto se produce, los monocitos experimentan una drástica transformación para formar los macrófagos, aumentando su diámetro tanto como hasta cinco veces y desarrollando un gran número de mitocondrias y lisosomas en su citoplasma. Entonces los macrófagos atacan a los objetos extraños invasores mediante fagocitosis y la activación de 35 otras células del sistema inmunitario, tales como los linfocitos T. Un incremento en las cifras de macrófagos es una señal de que se está produciendo una inflamación en el cuerpo.

Las plaquetas se encuentran en todas las especies de mamíferos, y están implicadas en la homeostasis. Los animales normales tendrán generalmente entre $1-5 \times 10^{11}$ plaquetas por litro. Estas partículas celulares son 40 habitualmente mucho más pequeñas que los eritrocitos, teniendo un diámetro de entre 1 y 3 μm . Las plaquetas se forman como yemas en las superficies de los megacariocitos, grandes células que se encuentran en la médula ósea que por sí mismas no abandonan la médula para entrar en la circulación sanguínea. En su lugar, las yemas se desprenden y entran en la circulación como plaquetas. Al igual que los eritrocitos, las plaquetas carecen de núcleo y por lo tanto no pueden reproducirse. Funcionalmente, las plaquetas actúan agregándose de forma que taponan o 45 reparan pequeños agujeros de los vasos sanguíneos. En el caso de agujeros más grandes, la agregación plaquetar actúa como una etapa temprana en la formación del coágulo. Como resultado, el recuento y la función plaquetares son clínicamente muy importantes. Recuentos anormalmente bajos de plaquetas pueden provocar alteraciones en la coagulación.

50 En conjunto, el recuento y el tamaño de los eritrocitos, el recuento de los leucocitos y el recuento de plaquetas se denomina hemograma completo (*complete blood count*, CBC). La categorización de los leucocitos en cinco clasificaciones principales, expresadas como una base de porcentaje, se denomina diferencial en cinco partes. La categorización de los eritrocitos en dos clasificaciones, eritrocitos maduros y eritrocitos reticulados, sobre una base de porcentaje, se denomina recuento de reticulocitos.

55 La determinación de un hemograma completo, con un recuento diferencial en cinco partes y de reticulocitos, es un procedimiento diagnóstico común realizado para diagnosticar, rastrear y tratar numerosas dolencias. Estas pruebas suponen la gran mayoría de los análisis hematológicos que se realizan en laboratorios clínicos humanos y animales en el mundo. Estas tres pruebas pueden realizarse usando un microscopio, una centrifugadora, una cámara de 60 recuento, un portaobjetos y los reactivos apropiados. Sin embargo, las habilidades necesarias para realizar estas pruebas manualmente son poco frecuentes y requieren años de entrenamiento. Adicionalmente, el tiempo necesario para realizar cada una de estas pruebas manualmente es muy elevado. Como resultado, en este campo se ha perseguido una significativa automatización a través de la instrumentación desde los inicios de 1950, cuando aparecieron los primeros contadores celulares Coulter de impedancia.

65 Un contador de impedancia consiste en dos cámaras rellenas con una disolución salina y conectadas a través de un

pequeño orificio. En presencia de un voltaje constante a través del orificio, las células pasan individualmente a través del orificio desplazando un volumen de disolución salina e incrementando así la impedancia del orificio. El tamaño de la célula puede relacionarse con el pulso de voltaje generado por el paso de la célula a través del orificio. Como resultado, cuando una célula pasa a través del orificio, su presencia y tamaño puede determinarse a partir del pulso de voltaje resultante.

Al evolucionar la tecnología de impedancia, se desarrollaron contadores celulares automatizados que eran capaces de contar eritrocitos, leucocitos y plaquetas simultáneamente en el mismo instrumento, basándose en los diferentes tamaños de estas clases de células. Esta automatización mostró ser de gran ayuda en los laboratorios hospitalarios. Sin embargo, estos sistemas eran incapaces de distinguir entre todos los diferentes tipos de leucocitos, y por lo tanto eran incapaces de proporcionar un recuento diferencial de cinco partes. Adicionalmente, estos instrumentos también eran incapaces de distinguir entre reticulocitos y eritrocitos normales, y por lo tanto tampoco podrían proporcionar un recuento de reticulocitos.

La citometría de flujo es un poderoso procedimiento de análisis para determinar el contenido celular de diversos tipos de muestras, y en particular de muestras que contienen células vivas. En aplicaciones clínicas, los citómetros de flujo son útiles para el recuento y la clasificación de linfocitos, para la caracterización inmunológica de leucemias y linfomas y para las pruebas de histocompatibilidad para trasplantes. En la mayoría de las técnicas de citometría de flujo, se hace que las células de una disolución fluida fluyan individualmente a través de un rayo de luz, producido habitualmente por una fuente de luz láser. Al incidir la luz sobre cada célula, la luz es dispersada, y la luz dispersada resultante es analizada para determinar el tipo de célula. La célula también puede marcarse opcionalmente con un marcador uni do a una molécula fluorescente, que fluoresce cuando la luz que incide sobre ella y revela así la presencia del marcador en la célula. De esta forma puede obtenerse información sobre los componentes superficiales de la célula. Algunos ejemplos de dichas moléculas fluorescentes incluyen FITC (*fluorescein isothiocyanate*, isotiocianato de fluoresceína), TRITC (*tetramethyl rhodamine isothiocyanate*, isotiocianato de tetrametil rodamina), rojo de Texas (sulforrodamina 101) y PE (*phycoerythrin*, ficoeritrina). Además, los componentes intracelulares de la célula, tales como los ácidos nucleicos, pueden tñirse y subsiguientemente detectarse por fluorescencia. Algunos ejemplos de dichos compuestos incluyen bromuro de etidio, yoduro de propidio, YOYO-1, YOYO-3, TOTO-1, TOTO-3, BO-PRO-1, YO-PRO-1 y TO-PRO-1.

Las mediciones de las células sanguíneas realizadas usando citometría de flujo emplean a menudo dos mediciones por separado – una para medir los eritrocitos y las plaquetas, y la otra para medir los mucho menos habituales leucocitos. La razón de las medidas por separado es que los eritrocitos son mucho más habituales que los demás tipos de células sanguíneas, y por lo tanto la detección de otro tipo celular en presencia de los eritrocitos requiere bien que los eritrocitos sean eliminados o bien grandes volúmenes de la muestra que se va a medir. Alternativamente, estas células pueden distinguirse sobre la base de una tinción inmunológica de los antígenos de la superficie celular en particular y/o una tinción diferencial del tipo celular. Por lo tanto, en la patente de EE.UU. N° 5.047.321 (Loken y col.), un procedimiento de etapa única para el análisis de células sanguíneas emplea al menos dos pigmentos fluorescentes y un marcador celular marcado para diferenciar las células entre sí. Sin embargo, salvo que se realicen dos diluciones por separado de la misma muestra, el procedimiento aún requiere grandes volúmenes de muestra para proporcionar los datos estadísticos suficientes con respecto a los componentes sanguíneos menos habituales.

Las mediciones de la dispersión de la luz se usan ampliamente en los citómetros de flujo para medir los tamaños celulares y distinguir entre los muchos y diferentes tipos de células. Se sabe que la luz incidente es dispersada por las células con un ángulo pequeño (de aproximadamente $0,5 - 20^\circ$) con respecto a la línea recorrida por la luz incidente que interroga las células, y que la intensidad de la luz dispersada es proporcional al volumen celular. La luz dispersada con ángulos pequeños se denomina luz dispersada anterógrada. La luz dispersada anterógrada (denominada también dispersión de la luz anterógrada o dispersión de ángulo pequeño para ángulos de dispersión de entre $0,5 - 2,0^\circ$) es útil en la determinación del tamaño celular. La capacidad de medir los tamaños celulares se ve afectada por la longitud de onda empleada y el intervalo preciso de ángulos sobre los que se recoge la luz. Por ejemplo, el material interior de las células, con una fuerte absorción a la longitud de onda iluminante, puede interferir con la determinación del tamaño porque las células que contienen este material producen señales de dispersión anterógrada más pequeñas de lo que se esperaría de otro modo, dando lugar a subestimaciones del tamaño celular. Además, las diferencias en el índice de refracción entre las células y el medio circundante también pueden influir en las medidas de dispersión de ángulo pequeño.

Los diferentes tipos celulares pueden distinguirse sobre la base de la cantidad de luz ortogonal dispersada (o dispersión lateral de ángulo recto) que producen. Las células con un alto grado de granularidad, tales como los granulocitos sanguíneos, dispersan la luz incidente con un ángulo elevado mucho más que las células con baja granularidad, tales como los linfocitos. Como resultado, la medición de la dispersión lateral de ángulo anterógrado y recto se usa habitualmente para distinguir entre los diferentes tipos de células sanguíneas, tales como eritrocitos, linfocitos, monocitos y granulocitos. Adicionalmente, los eosinófilos pueden distinguirse de los neutrófilos y otros linfocitos y otros granulocitos sobre la base de la medición de la polarización de la dispersión lateral de ángulo recto. Normalmente, la luz polarizada incidente es dispersada ortogonalmente y permanece polarizada. Sin embargo, los eosinófilos provocan que la luz polarizada incidente dispersada ortogonalmente se despolarice en mayor extensión

- que otras células. Este mayor grado de despolarización permite la identificación específica de poblaciones de eosinófilos en muestras sanguíneas. La Solicitud de Patente de EE.UU. pendiente de tramitación 09/ 507.515, presentada el 18 de febrero de 2000, desvela un citómetro de flujo mejorado de alta apertura numérica que emplea un detector de la luz dispersada lateral de ángulo elevado para detectar eosinófilos en una muestra sanguínea. El uso de un detector la luz dispersada lateral de ángulo elevado (a unos ángulos de aproximadamente 130°) permite una mayor discriminación de los eosinófilos en las poblaciones celulares sanguíneas. Sin embargo, al contrario que en los sistemas convencionales, el sistema descrito en la Solicitud de Patente de EE.UU. pendiente de tramitación N° 09/507.515 no requiere que la luz incidente esté polarizada.
- 10 La patente de EE.UU. N° 5.492.833 (Rodríguez y col.) describe un procedimiento para distinguir eritrocitos de reticulocitos tratando las células con un reactivo fantasma, seguido de la medición de la dispersión de la luz. La patente de EE.UU. N° 5.559.037 (Kim y col.) describe un procedimiento para contar eritrocitos nucleados (*nucleated red blood cells*, NRBCs) en primer lugar dejando reposar los eritrocitos y después exponiendo los NRBCs a una tinción nuclear y midiendo la fluorescencia la dispersión de la luz. La patente de EE.UU. N° 5.733.784 (Studholme y col.) enseña un procedimiento para medir la concentración de reticulocitos en una muestra sanguínea que emplea un reactivo de tinción de reticulocitos que es incubado durante un periodo de entre 15 minutos y 4 horas antes de que se realicen las mediciones de dispersión de la luz. La patente de EE.UU. N° 5.879.900 (Kim y col.) describe un procedimiento para el análisis simultáneo y cuantitativo de leucocitos y eritrocitos nucleados lesionados, y subpoblaciones de leucocitos, que emplea mediciones multidimensionales de la dispersión de la luz y de la fluorescencia. La patente de EE.UU. N° 5.891.734 (Gill y col.) describe un sistema para diferenciar células sanguíneas en una muestra sanguínea que aspira una porción de sangre y la mezcla con un reactivo fluorescente, y después automáticamente hace pasar la muestra teñida a través de un citómetro de flujo y mide la dispersión multiangular de la luz y la fluorescencia.
- 25 Para obtener una información significativa sobre el número y los tipos de células en una muestra, o de la concentración de marcadores en las superficies celulares, las muestras deben ser estandarizadas con respecto a la cantidad de dispersión de la luz, fluorescencia o impedancia asociada con poblaciones estandarizadas de las células. Además, el propio instrumento de citometría de flujo debe ser calibrado para asegurar un rendimiento apropiado. La calibración del instrumento se realiza típicamente haciendo pasar partículas estándar a través del instrumento y midiendo la dispersión, fluorescencia o impedancia resultantes. Los citómetros de flujo pueden calibrarse bien con materiales estándar sintéticos (por ejemplo, perlas de poliestireno) o bien con células u otro material biológico (por ejemplo, polen o núcleos teñidos). Estos materiales de estandarización están realizados con un tamaño extremadamente uniforme y contienen cantidades precisas de moléculas fluorescentes que sirven para calibrar los tubos fotomultiplicadores usados en la detección de las sondas fluorescentes. Sin embargo, los procedimientos de calibración son largos y complicados, y requieren una amplia formación para que realicen apropiadamente. Adicionalmente, estos procedimientos de calibración se realizan típicamente una vez al comienzo del análisis. Los cambios en el instrumento, es decir, la deriva, o en la muestra, pueden alterar el rendimiento del instrumento. Consecuentemente, hay una necesidad de un medio para realizar una calibración automática de la máquina de los citómetros de flujo que elimine la necesidad de una calibración manual cualificada y que pueda ajustar la calibración según las necesidades para tener en cuenta los cambios en el instrumento con el tiempo y con las diferencias en las muestras, de forma que se consiga un rendimiento óptimo del instrumento para cada muestra medida.
- La patente de EE.UU. N° 5.627.037 (Ward y col.) describe un procedimiento en una etapa para determinar los miembros absolutos de una o más poblaciones de reticulocitos y/o leucocitos en una muestra sanguínea completa usando citometría de flujo. El procedimiento comprende mezclar una muestra sanguínea con un diluyente, en el que el diluyente contiene un fijador, uno o más marcadores celulares fluorescentes y un número conocido de micropartículas fluorescentes por unidad de volumen, y analizar a continuación la muestra mediante citometría de flujo. La fluorescencia debida a las micropartículas debe ser distinguible de la debida a los marcadores celulares. El citómetro de flujo se hace funcionar con un conjunto activador de la fluorescencia, de forma que todas las células y las micropartículas superen el nivel de activación. Entonces se reanalizan los acontecimientos en unas condiciones en las que las micropartículas son distinguibles de los marcadores celulares. Entonces se cuentan el número de micropartículas y el número de células (determinado por el número de marcadores celulares). El número de células y el número de micropartículas proporciona una proporción que puede usarse, conociendo el número de micropartículas por unidad de volumen y el volumen total de muestra, para calcular el número absoluto de células en la muestra sanguínea completa. Sin embargo, el procedimiento descrito en la patente de EE.UU. N° 5.627.037 depende de dos etapas analíticas para proporcionar el número absoluto de células por muestra, y no enseña o sugiere que el citómetro de flujo podría estandarizarse simultáneamente usando las micropartículas incluidas en la muestra.
- 60 La patente de EE.UU. N° 5.380.663 (Schwartz y col.) describe un procedimiento para calibrar un citómetro de flujo, que emplea poblaciones combinadas de microesferas fluorescentes y un programa informático correspondiente a cada población combinada de microesferas. Cada lote de microesferas contiene al menos dos poblaciones diferentes de microesferas fluorescentes, y cada población tiene una intensidad de fluorescencia diferente. El programa informático contiene información sobre la intensidad de fluorescencia de cada población de microesferas del lote. El programa informático monitorea las microesferas fluorescentes comprobando la degradación de la

fluorescencia, y alerta al operador cuando la intensidad de la fluorescencia cae por debajo de unos niveles aceptables. El procedimiento no proporciona un medio para estandarizar muestras automáticamente de forma que se reduzca o elimine la variabilidad en las mediciones debida a las diferencias entre los citómetros de flujo.

- 5 La patente de EE.UU. N° 5.451.525 (Shenkin y col.) desvela un procedimiento para determinar el número total de células en una muestra que no requiere un volumen de muestra conocido. El procedimiento emplea un número conocido de partículas aisladas que se añaden a un espécimen sanguíneo antes de que el espécimen sea ensayado en un citómetro de flujo. Contando las partículas añadidas y las células y relacionando el número de partículas contadas con el número de partículas añadidas, puede determinarse el número de células en la muestra sanguínea completa sin necesidad de medir el volumen de la muestra medida. Debido a que el volumen de la muestra medida es desconocido, el procedimiento desvelado es incapaz de determinar si se han realizado las diluciones apropiadas de la muestra. Además el procedimiento no desvela un medio automático para calibrar el instrumento para asegurar que se reduce o se elimina la variabilidad de las mediciones debida a las diferencias entre los citómetros de flujo.
- 10
- 15 Las técnicas de citometría de flujo que usan características de dispersión de la luz por parte de las células fueron aplicadas por Technicon al comienzo de los años 70 para realizar un análisis diferencial de leucocitos, en combinación con la determinación del hemograma completo. El análisis automatizado de reticulocitos se desarrolló en los años 80 en Becton-Dickinson y en sistemas de citometría de flujo fluorescente de Coulter. Sin embargo, estos sistemas tempranos no realizaban un hemograma completo ni un diferencial de leucocitos. Finalmente, algunos fabricantes como Technicon (Bayer), Coulter (Beckman-Coulter) y Abbott incorporaron el recuento de reticulocitos en sus sistemas automatizados de hemograma completo y diferencial de leucocitos, en sistemas hematológicos de gama alta tales como Technicon (Bayer) H*3, Bayer Advia 120, Coulter STKS, Coulter Genesis, y Abbotts CeliDyn 3500 y CellDyn 4000. Estos sistemas instrumentales eran capaces de medir todos los parámetros para un análisis hematológico completo que son clínicamente importantes para la valoración del paciente, a saber, hemograma completo, diferencial de leucocitos en cinco partes y recuento de reticulocitos. Sin embargo, estos instrumentos emplean típicamente unos sistemas ópticos caros y complejos. Adicionalmente, los sistemas hematológicos de gama alta están diseñados para ser máquinas de alto rendimiento, por lo que a menudo se están procesando múltiples muestras de especímenes diferentes simultáneamente, que requieren diferentes combinaciones de tratamientos y análisis. El análisis de eritrocitos y de leucocitos requiere diferentes sistemas de reactivos, y a menudo están optimizados de forma que requieren vías hidráulicas completamente diferentes. Como resultado, para realizar simultáneamente análisis tanto de eritrocitos como de leucocitos, se crean vías hidráulicas completamente separadas y distintas para cada tipo de muestra. Esta combinación de múltiples vías hidráulicas de muestras simultáneas crea una indeseable elevada complejidad debido al uso de un gran número de válvulas, líneas de vacío, cámaras de reacción, jeringas y similares.
- 20
- 25
- 30
- 35 Además, se requiere una cantidad significativa de entrenamiento para aprender a usar estos instrumentos adecuadamente, y estos sistemas instrumentales requieren un mantenimiento varias veces al año, como mínimo. Como resultado, los elevados costes asociados a la adquisición, uso y mantenimiento de estos instrumentos de alto rendimiento los hacen financieramente inaccesibles para las pequeñas clínicas y consultas médicas. Los médicos pueden tener acceso a estos instrumentos utilizando laboratorios comerciales que recogerán las muestras sanguíneas de la clínica o la consulta del médico y transportarán las muestras de vuelta a laboratorio para su análisis en estos sistemas hematológicos de gama alta. Entonces los resultados se envían al médico. Este proceso requiere mucho tiempo y a menudo el médico no tendrá los resultados hasta el día siguiente como muy pronto.
- 40
- 45 Por lo tanto, si un médico desea una valoración hematológica completa (hemograma completo, y diferencial de leucocitos en cinco partes y recuento de reticulocitos) rápidamente, entonces el laboratorio de la clínica debe usar una combinación de procedimientos manuales. Los instrumentos, tales como los contadores de impedancia que realizan hemogramas completos con unos diferenciales de leucocitos limitados, están disponibles para estos laboratorios de clínicas, pero los sistemas que pueden producir los diferenciales en cinco partes y los recuentos de reticulocitos no lo están. Por lo tanto, para obtener valores para estos parámetros se emplean procedimientos manuales. Sin embargo, estos procedimientos manuales son lentos, laboriosos y tendentes a presentar errores del operador.
- 50

Los contadores de impedancia de gama baja disponibles en las clínicas y las consultas médicas incluyen sistemas tales como Abbott 1200, ABX Micros y Sysmex K-21. Mientras que los sistemas hematológicos de gama alta mejoraron mediante la incorporación de técnicas citométricas de flujo y otros avances, la tecnología usada en los sistemas de gama baja ha cambiado muy poco. Estas unidades de gama baja se han vuelto mucho más compactas y eficientes mediante la incorporación de una microelectrónica semiconductor cuando es aplicable; sin embargo, al final estos sistemas no son funcionalmente diferentes de los instrumentos Coulter usados por los laboratorios clínicos a finales de los 70 y principios de los 80. En particular, estos instrumentos aún no pueden realizar un diferencial de leucocitos en cinco partes, ni pueden producir un recuento de reticulocitos.

55

60

Los instrumentos de impedancia de gama baja usados en las clínicas pequeñas y las consultas médicas usan generalmente paquetes de reactivos a granel que están destinados a laboratorios mayores. Dado que el número de muestras analizadas en estos instrumentos es bajo en comparación con sus equivalentes de laboratorios, se desperdician significativos volúmenes de reactivos en la realización de los ciclos de inicio y cierre, así como en la

65

limpieza del sistema entre muestras. Por lo tanto, es imposible predecir cuántas muestras de pacientes obtendrá un usuario a partir de un paquete de reactivos. Como resultado, el usuario debe mantener una cantidad en exceso de reactivos a mano, dando lugar inevitablemente a un sustancial desperdicio de reactivos. Además, la hidráulica de estos instrumentos, aunque generalmente menos compleja que los sistemas de laboratorio de gama alta, aún tiende a las mismas cuestiones de fiabilidad asociadas con las tuberías, las numerosas válvulas, las bombas de vacío y el pequeño tamaño de las aberturas usadas para contar las células. Por lo tanto, para aplicaciones en clínicas y en consultas, los instrumentos de impedancia de gama baja son generalmente más eficientes en la producción de los resultados necesarios para un completo análisis hematológico, son consumidores muy ineficaces de los reactivos y tienen los mismos problemas de fiabilidad inherentes que están asociados con los sistemas de análisis de fluidos de gama alta la misma.

Se han realizado algunos intentos de abordar las necesidades de análisis clínicos de muestras sanguíneas en laboratorios pequeños y consultas médicas, pero estos esfuerzos sólo han tenido un éxito limitado. Por ejemplo, la tecnología QBC®, desarrollada por Becton-Dickinson, no requiere citometría de flujo ni otra tecnología cara. La única parte móvil requerida es una centrífuga para forzar a los componentes celulares de la sangre a estratificarse en un tubo capilar sobredimensionado y perforado de forma precisa. Dentro del tubo capilar, un "flotador" de plástico que está elaborado de forma precisa para las características de densidad y tamaño, establece un equilibrio de densidad en las capas de leucocitos y de plaquetas, expandiendo así diez veces las capas. Esto permite estimaciones bastante precisas del recuento plaquetario, el recuento leucocitario y un recuento leucocitario diferencial en dos partes (granular y agranular), así como una medición muy precisa del hematocrito. El sistema QBC® no utiliza ningún reactivo líquido, y es por lo tanto muy fiable. Este procedimiento es también un procedimiento de dosis unitaria, ya que se usa un único tubo capilar y flotador para cada análisis. Como resultado, no se desperdicia reactivo.

Mientras que la tecnología QBC® aborda aspectos de fiabilidad y desperdicio de reactivos para el usuario de la clínica, se queda bastante corta proporcionando los parámetros requeridos de un hemograma completo, produce un diferencial incompleto y no cuantifica los reticulocitos. Adicionalmente, la precisión y exactitud de los parámetros producidos por el sistema QBC®, excepto para el hematocrito, son peores que los de los sistemas de impedancia de gama baja. Consecuentemente, permanece una gran necesidad de un sistema de análisis de fluidos biológicos barato que sea capaz de producir los parámetros de los que dependen los profesionales clínicos y los médicos para tomar decisiones que afectan al tratamiento de un gran porcentaje de sus pacientes.

Para abordar la necesidad de parámetros hematológicos que están más allá de la capacidad de los instrumentos de impedancia de gama baja en un entorno de clínica, deben abordarse muchos factores principales. El tamaño, el coste y la complejidad asociada con los sistemas hematológicos de gama alta deben reducirse, conservando la capacidad de realizar un alto número de análisis sanguíneos completos. Los principales subsistemas que contribuyen al coste y la complejidad de los sistemas hematológicos de gama alta son el diseño de la óptica y el diseño de manipulación de fluidos, así como los sistemas de reactivos.

Para reducir el tamaño del sistema óptico de láser, la incorporación de un diodo de láser sobre un gas de láser reduce significativamente el tamaño total del conjunto. Adicionalmente, un diodo de láser también puede reducir el coste del sistema de láser. Sin embargo, los diodos de láser no tienen las características ópticas de los láseres de gas. Son astigmáticos, y tienen regiones ruidosas dependientes de la temperatura, que se denominan "salto modal". Este ruido por salto modal hace que la detección de partículas pequeñas tales como las plaquetas sea muy difícil. El control de la temperatura del diodo de láser a un área térmica tranquila puede reducir este problema de salto modal. Esto puede conseguirse mediante diversos sistemas de retroalimentación de la temperatura, tales como un refrigerador térmico eléctrico, que mantiene la temperatura del láser de diodo en un intervalo muy estrecho de temperatura. Sin embargo, cualquier tipo de control térmico es costoso, especialmente dado que el propio diodo de láser es una fuente de calor. Por lo tanto, incluso el acto de encender el láser de diodo provoca efectos de salto modal hasta que se alcanza el equilibrio térmico, lo que puede tardar entre cinco y diez minutos.

Además de la fuente de luz láser, hay un coste y una complejidad significativos asociados con el modelado del rayo y la óptica de recolección de la luz para los instrumentos del tipo de citometría de flujo.

Las ópticas de modelado de rayo están generalmente destinadas a tomar un rayo láser gaussiano circular, y crear una elipse en la que la distribución de la potencia sea tanto más intensa como más uniformemente distribuida en el área de interés. Muchos instrumentos hematológicos usan una metodología colimada, estando bloqueadas las colas de la curva gaussiana por una abertura. Esto crea un efecto sombrero de copa que aporta uniformidad en la región de interés y reduce la necesidad de control de fluidos, y una estabilidad en la puntería del láser, pero sacrifica la densidad de potencia en la célula.

Adicionalmente, para crear un rayo muy fino que sea de tamaño subcelular (<4 micrómetros), que sea útil para la medición de la duración del vuelo, la metodología tradicional ha tenido que expandir primero el rayo láser inicial, de forma que pueda ser enfocado entonces hacia un punto de pequeño tamaño. Tanto la etapa de expansión como la etapa de focalización se consiguen usando diversos elementos ópticos, tales como lentes, divisores de rayo y espejos. En estos casos se incurre en unos costes significativos al tener muchos componentes ópticos. Además del

elevado coste de elaboración de cada uno de estos componentes, cada componente óptico incurre en un coste adicional ya que cada uno necesita ser mantenido de forma segura en el espacio y alineado cuidadosamente.

Las ópticas de recolección de luz en los sistemas de citometría de flujo son incluso más complejas que las ópticas de modelado de rayo. Esto es debido a que en la mayoría de las aplicaciones se realiza una medida de la luz. Para conseguir esto se necesitan dos o más fuentes de detección. Cada detector requiere diversos componentes ópticos que conducen la luz desde el área de interés hasta el detector. Como en el caso del modelado de rayo, se incurre en unos costes significativos por el requerimiento de numerosos componentes ópticos, cada uno de los cuales debe ser mantenido en el espacio y alineado cuidadosamente.

10

A partir del documento US5093234 se sabe proporcionar un recipiente para su uso en un sistema hematológico basado en citometría de flujo que comprende un tubo cerrado, un número conocido de partículas de referencia en dicho tubo, teniendo cada una de dichas partículas de referencia un diámetro predeterminado, de forma que cuando dichas partículas de referencia son iluminadas por la luz, dicha luz es dispersada por dichas partículas de referencia de forma que dicha luz dispersada cae en al menos uno de una pluralidad de canales predeterminados de dispersión de la luz.

La invención está definida por las reivindicaciones.

20 Esta memoria descriptiva desvela un procedimiento que comprende una etapa de proporcionar un recipiente consumible para su uso en un sistema que emplea un conjunto seleccionado de características que, combinadas, crean un dispositivo que es capaz de producir un análisis hematológico completo. Este sistema es un citómetro de flujo que incluye un sistema de detección óptico sin lentes para la recolección de la luz emitida a partir de una fuente de luz láser, tras interactuar con una célula o partícula. La fuente de luz láser es una fuente de luz láser de diodo estándar que está modelada para producir una línea fina, según se desvela en la patente de EE.UU. N° 6612719. La forma del rayo de luz láser está ajustada para la detección de la luz dispersada. Adicionalmente, la fiabilidad del sistema está mejorada adicionalmente mediante el uso de una matriz fotodetectora que no incluye ninguna parte móvil, ni requiere ninguna lente. La matriz fotodetectora es tal que la luz dispersada es detectable, y estos datos recogidos proporcionan un análisis hematológico completo cuando se usa en combinación con una técnica de elevada apertura numérica. El recipiente consumible actúa como cámara de reacción, cámara de mezcla y cámara de desechos para los análisis de muestras sanguíneas. El recipiente consumible incorpora partículas de látex o similar (células fijadas), que actúan como estándares internos para asegurar que las diluciones realizadas durante el procesamiento de las muestras se han realizado correctamente. El uso de estos recipientes consumibles da como resultado menos desechos y una precisión y validación de los resultados altamente mejoradas.

35

Ahora se describirán formas de realización de la invención, únicamente a modo de ejemplo, y con referencia a los dibujos anexos, en los que:

La Figura 1 es una representación esquemática de la hidráulica del sistema que muestra las válvulas de los sistemas (1, 2, 3, 4, 5), las jeringas (6, 7), los frascos de reactivos a granel (8, 9), y otros componentes principales de un sistema de citometría de flujo, que comprende el recipiente de la presente invención;

40

La Figura 2 es un dibujo del conjunto de la célula de flujo usada en el sistema de detección óptico del sistema de citometría de flujo de la Figura 1. Éste contiene tres puertos para tubos (20, 21, 23) que permiten el flujo laminar a través del canal de flujo de cuarzo (22) en el que el láser interactúa con las células.

45

Las Figuras 3A y 3B son representaciones esquemáticas de la óptica de modelado del rayo láser. La Figura 3A proporciona una representación cenital, y la Figura 3B proporciona una representación lateral. La fila de diodos láser, 30, emite una luz que diverge en dos ejes separados. Una lente de colimación 31 elimina la divergencia en ambos ejes e ilumina la lente 32. La lente 32 actúa convergiendo el rayo en un eje de forma que prácticamente toda la luz del rayo láser puede pasar a través del ancho del canal de flujo de 22. W representa este ancho. Una tercera lente 33 se introduce entre 32 y W, de forma que produce un foco nítido en W. El punto focal de la lente 33 es la intersección deseada entre la luz láser y la partícula o célula de interés. El punto focal de la lente 32 es el plano deseado para colocar los fotodetectores para medir los parámetros de dispersión, ya que aquí es donde el láser ha convergido hasta su punto más pequeño en ese eje.

55

La FIG. 4 es una ilustración del sistema de detección celular, que muestra las células o partículas fluyendo a través de 22, que se mantiene en el espacio al rededor de al menos dos, pero preferiblemente cuatro, detectores de fotodiodo, sin ninguna lente de recolección o de imagen. Estos detectores recogen la dispersión ortogonal, 42, la dispersión anterógrada de ángulo pequeño, 45, la pérdida o extinción de luz axial, 44, y la dispersión anterógrada de ángulo elevado, 43. La luz láser es iluminada sobre 22 a través de 41, que contiene la óptica de modelado de rayo de la figura 3.

60

La FIG. 5 es un dibujo de la máscara de fotodiodo que acomoda tres mediciones ópticas independientes en dirección anterógrada del láser. La dispersión anterógrada de ángulo pequeño es enmascarada por 51, la pérdida de la luz axial por 52, y la dispersión anterógrada de ángulo elevado por 53. Estas tres áreas pueden estar en una única

65

fabricación 50, de un material semiconductor en el que sólo la geometría deseada es una parte activa del material semiconductor. Otras metodologías tendrían 50 como una máscara metálica que podría asentarse sobre tres pequeños fotodiodos.

5 La FIG. 6 es una representación esquemática de lo que sucede en el consumible durante el ciclo del sistema. El tubo consumible, 60, comienza con una pequeña cantidad de reactivos del procedimiento, a lo que se añaden cantidades medidas de forma precisa de sangre completa a través de 6, u otro material desconocido con el fluido de revestimiento de los sistemas, desde 8, a través de 7, mediante la aguja hidráulica 11. Esto crea 60, que se analiza entonces mediante la óptica de la Figura 4. Para crear 62, se añade más sangre completa u otro material
10 desconocido al tubo consumible. Al analizador se añaden leucocitos, un agente lítico y fluido de revestimiento, para crear 63, que se analiza entonces con la óptica de la Figura 4. Finalmente, se limpian las líneas hidráulicas descargando de nuevo en el tubo consumible para crear 64, que es ahora un tubo de desecho.

La FIG. 7 es un dibujo del conjunto de posicionamiento de tubos que mueve los tubos mostrados en la Fig. 6.
15 Pueden mantenerse simultáneamente 4 tubos de prueba. La ranura A está destinada a la muestra del paciente de sangre completa, u otro tipo de espécimen apropiado. La ranura B está destinada al tubo consumible representado en la Figura 6. La ranura C es para un tubo que contiene un lisado que permanece en el sistema en la ranura C, para numerosos usos de consumibles (uno por kit de más de 20, idealmente 50 consumibles). La ranura D es para un tubo de limpieza del sistema, que también está destinado a actuar como tubo de cebado, para posicionar
20 apropiadamente los fluidos en el inicio del sistema.

La FIG. 8 es un dibujo del conjunto de mezcla y perforación. Para conseguir elaborar las diluciones representadas en la Figura 6, las ranuras de tubos de la Figura 7 se mueven entre una estación de perforación donde las agujas 11 y 12 se insertan simultáneamente en los tubos de prueba taponados mediante un motor 81. Cuando se inyecta un
25 fluido en el tubo mediante una jeringa 6 ó 7, a través de la aguja 11, la aguja 12 purga el cambio de presión hacia un filtro de aire 13, que está a presión atmosférica. Una vez que se crea la nueva de disolución en el consumible, el carro de la Figura 7 mueve el consumible por debajo de 80, donde mediante el uso de varios motores, incluyendo 82, se mezcla el consumible, haciendo homogénea la disolución de su interior.

30 La FIG. 9 es un dibujo del sistema mostrado en la Figura 1. Un bloque colector sustenta las válvulas que tienen vías hidráulicas apropiadas, e integra las jeringas y la mecánica motriz del motor.

La FIG. 10 muestra los datos del histograma de eritrocitos (C), plaquetas (A) y látex (B) obtenidos a partir del sistema. La Figura 10 A representa los datos del histograma del canal digitalizado de alta dispersión anterógrada,
35 43, sobre el eje x (desde 0 hasta 1023, u 8 bits) frente al número de eventos (o acontecimientos) recogidos por cada uno de los canales individuales. La Figura 10 B muestra la misma serie de datos, excepto porque representa el canal de extinción o pérdida de luz axial, 44. La Figura 10 C muestra la misma serie de datos, excepto porque representa el canal de dispersión de ángulo recto, 42. La Figura 10 D muestra la misma serie de datos, excepto porque representa la medición de la duración del vuelo o ancho del pulso. Las mediciones del ancho del pulso pueden realizarse fuera de
40 cualquiera de los demás canales que utilizan un fotodetector, pero se prefiere usar bien el de extinción, 44, o bien el de baja dispersión anterógrada, 45.

La FIG. 11 muestra los mismos datos de eritrocitos, plaquetas y látex de la Figura 10, pero en forma de representación gráfica de la dispersión. Las representaciones gráficas de la dispersión son simplemente una
45 representación de los datos que se recogen simultáneamente a partir de una célula o partícula, a partir de una medición, representados sobre el eje x, frente a cualquier otra medición representada en el eje y. Las partículas de látex son distinguibles en A en la Figura 11 A, y en B en la figura 11 B.

La FIG. 12 A muestra los datos del histograma de leucocitos para el canal de extinción, que muestra claramente tres poblaciones, A son los linfocitos, B son los monocitos y C son los granulocitos. La Figura 12 B muestra la misma muestra del paciente, excepto por que esta serie de datos incorpora partículas de látex. De nuevo, A son los linfocitos, B son los monocitos, y C son los granulocitos. Las partículas de látex están indicadas por D, y se distinguen fácilmente de los leucocitos. Las Figuras 12 C y 12 E muestran la misma muestra del paciente para el parámetro de baja dispersión anterógrada 12 C, y dispersión de ángulo recto 12 E, sin partículas de látex añadidas.
50 Las Figuras 12 D y 12 F muestran la misma muestra del paciente para los parámetros de baja dispersión anterógrada 12 D, y dispersión de ángulo recto 12 F, con partículas de látex añadidas.

Las FIGS. 13 A y 13 B muestran los mismos datos de leucocitos y látex de las 12 B, 12 D y 12 F, pero en forma de representación gráfica de la dispersión.
60

La FIG. 14 muestra los datos del histograma de eritrocitos y el reticulocitos para la dispersión de ángulo recto, Figura 14 A, y de la extinción, Figura 14 B, obtenidos del sistema.

La FIG. 15 muestra los datos en representación gráfica de dispersión de eritrocitos y reticulocitos obtenidos de la misma muestra que la representada en las figuras 14 A y 14 B. Aquí, cuando se representan uno frente a otro, la extinción (eje y) y la dispersión de ángulo recto (eje x) muestran la separación de los reticulocitos de la población
65

principal de eritrocitos maduros. El valor de 1,72% de reticulocitos está en excelente acuerdo con el procedimiento de referencia del manual de 1,60%.

La FIG. 16 muestra los datos del histograma diferencial de leucocitos obtenidos a partir de la dispersión de ángulo recto, Figura 16 A, y de la duración de vuelo, o ancho del pulso, figura 16 B, del sistema.

La FIG. 17 muestra los datos en representación gráfica de dispersión diferencial de leucocitos obtenidos a partir de la misma muestra que los representados en la figura 16 A y en la figura 16 B. Aquí, cuando se representan uno frente a otro, la extinción (eje y) y la dispersión de ángulo recto (eje x) muestran la separación de varias partes del diferencial de leucocitos. El área indicada por A representa los linfocitos, el área indicada por B representa los monocitos, el área indicada por C representa los neutrófilos (un subconjunto de granulocitos), y el área indicada por D representa los eosinófilos (otro subconjunto de granulocitos). Las células de eosinófilos presentes en D suponen el 20,63% del total, lo que está en excelente acuerdo con el procedimiento de referencia del manual de 21,70% de eosinófilos.

La FIG. 18 muestra una exploración espectrofotométrica de la disolución de colorante de reticulocitos, que sería representativa de 61, sin la presencia de sangre.

La FIG. 19 A muestra una exploración espectrofotométrica del lisado de una disolución de sangre completa, que se lee a 540 nm para un procedimiento de referencia de hemoglobina (cianoheemoglobina). La Figura 19 B muestra una exploración espectrofotométrica del lisado de una disolución de sangre completa, que cuando se lee a 540 nm para una hemoglobina indica la oxihemoglobina, y a 580 representa la desoxihemoglobina.

La FIG. 20 muestra una exploración espectrofotométrica de una disolución diluida de sangre de completa.

La Figura 21 muestra una exploración espectrofotométrica del lisado de una disolución de sangre completa y colorante de reticulocitos;

La Figura 22 muestra una exploración espectrofotométrica de una disolución diluida de sangre de completa y una disolución de colorante de reticulocitos;

La Figura 23 muestra la salida del analizador de espectro de un láser de diodo que opera en monomodal, Figura 23A, y el mismo láser operando con una alta modulación de frecuencia, Figura 23B. Los picos de la Figura 23A muestran altos niveles de ruido a muchas frecuencias diferentes. Aunque la línea de base para esto es excelente, los picos de ruido alta frecuencia provocan problemas significativos cuando se intenta implementar una medición de la extinción y un sistema recolector de la dispersión sin lente. El efecto neto es el recuento de un evento falso y una inadecuada cuantificación de la altura de pulso o área. El espectro del láser modulado de alta frecuencia de la Figura 23B no es tan bajo como el nivel de la línea base, pero no tiene puntas altas. Esto ayuda a permitir una cuantificación precisa de la extinción, y la implementación de un sistema recolector sin lente para los otros canales;

La Figura 24 muestra una representación del ruido (raíz cuadrática media) frente a la temperatura para un diodo láser dirigido a potencia constante, o monomodal, y el mismo dispositivo de rigido con una modulación de alta frecuencia. Esto muestra que un láser monomodal que está dirigido a una potencia constante puede conseguir unos niveles de ruido iguales o inferiores a los láseres modulados de alta frecuencia en algunos intervalos de temperatura. Por lo tanto, la modulación a alta frecuencia o un láser controlado por la temperatura es capaz de permitir una cuantificación precisa de la extinción, y la implementación de un sistema recolector sin lente para los otros canales. Debido a que el coste del control de la temperatura es mucho mayor que el coste de oscilar (modular) un láser, la forma de realización preferida es una modulación de alta frecuencia;

La Figura 25 es un diagrama en bloque de la electrónica del sistema;

La Figura 26 es un diagrama en bloque de la electrónica de procesamiento de la señal.

Aunque se hace referencia a muchos componentes de un sistema de citometría de flujo, debe apreciarse que la presente invención se limita a un procedimiento según se define en las reivindicaciones anexas.

El procedimiento usa un sistema hematológico basado en citometría de flujo. Dichos sistema es capaz de determinar al menos un hemograma completo, un diferencial de leucocitos en cinco partes y un recuento de reticulocitos. El sistema tiene un alto nivel de fiabilidad, y utiliza volúmenes muy bajos de reactivos de procedimiento. El sistema es muy barato de construir, y además es utilizable sin la necesidad de niveles significativos de entrenamiento del operador. El sistema está particularmente bien adaptado para su uso en entornos en los que hay una necesidad de un instrumento que pueda analizar un gran número de muestras sanguíneas rápidamente y de forma barata, y que proporcione un análisis sanguíneo completo para cada muestra. Dichos entornos incluirían, por ejemplo, clínicas médicas, consultas médicas y consultas veterinarias.

El sistema hematológico basado en citometría de flujo combina un sistema único de detección óptico sin lentes con

el uso de tubos consumibles de la invención que contienen partículas de referencia que se usan para la estandarización óptica y para comprobar si el instrumento está realizando correctamente las diluciones. El sistema también emplea un láser de diodo con una cierta forma del rayo que es crítica para el éxito de la operación del sistema. El uso de un láser de diodo para el análisis de biopartículas en sistemas basados en citometría de flujo se ha evitado hasta el momento debido a la propensión de estos sistemas a mostrar fenómenos ruidosos periódicos. Aunque no forma parte de la presente invención, los presentes inventores han descubierto que dichos problemas pueden superarse mediante el uso de una técnica de modulación de alta frecuencia, discutida con mayor detalle a continuación. La combinación de estos elementos crea un sistema que tiene un coste mucho menor y una fiabilidad mayor que los sistemas hematológicos basados en citometría de flujo existentes, y que puede medir al menos un hemograma completo (CBC), un recuento de leucocitos diferencial en cinco partes y un recuento de reticulocitos, sin la necesidad de mediciones de fluorescencia o de absorción de luz. Sin embargo, no se descarta que el sistema usado en la presente invención incorpore mediciones de fluorescencia o de absorción de luz para medir uno o más parámetros deseados, según se describe en este documento.

15 TUBO CONSUMIBLE

El primer aspecto que se debe considerar como parte del procedimiento de la presente invención es el tubo consumible. Cada tubo consumible tiene una etiqueta codificada única, como la tiene cualquier otro tubo colocado en el instrumento. Preferiblemente, la etiqueta codificada es una etiqueta con código de barras. El tubo consumible contiene uno o más tipos distintos de partículas que se usan para comprobaciones de cuantificación del recuento, así como para la estandarización óptica. Cada lote de reactivos se distribuye en alícuotas en los tubos consumibles, junto con un número definido de partículas de referencia. Dichas partículas de referencia son conocidas por los expertos en la materia y pueden ser, por ejemplo, granos de polen, células fijadas o partículas de látex.

La clave para seleccionar las partículas adecuadas para el sistema es que las partículas sean distinguibles de las células objetivo de la muestra, en al menos uno de los ejes de las mediciones ópticas. Las partículas de látex tienen un índice de refracción diferente a los componentes celulares, y hay disponibles comercialmente muchos tamaños de partículas de látex. En el caso de las partículas de 4,1 micrómetros, éstas se distinguen de los eritrocitos y de las plaquetas por los canales de extinción (EXT), de dispersión anterógrada de la luz de ángulo pequeño (FSL) y de dispersión en ángulo recto (RAS), pero se superponen con los eritrocitos en los canales de dispersión anterógrada de la luz de ángulo elevado (FSH) y de duración del vuelo (TOF). Funcionalmente, no importa qué eje tiene la mejor separación con la(s) partícula(s) de referencia. Siempre que al menos uno de los cinco canales muestre separación, toda la población de partículas puede ser controlada y analizada completamente por separado de cualquier otro componente celular de la muestra.

A menudo se emplean como partículas de referencia eritrocitos fijados procedentes de varias especies diferentes. Estas células pueden ocultarse completamente en todos los canales durante el análisis de los eritrocitos, y por lo tanto pueden no ser apropiadas para su uso en la detección y el recuento de eritrocitos. Sin embargo, todavía se pueden usar en la detección y el recuento de leucocitos, porque como el proceso de fijación los hace inmunes a los sistemas de lavado, se distinguirán fácilmente en todos los canales durante el análisis de leucocitos. Los eritrocitos fijados procedentes de especies aviares ofrecen la característica añadida de tener un núcleo, lo que ayuda a distinguirlos de los eritrocitos de mamíferos exclusivamente mediante dispersión en ángulo recto.

Las partículas de referencia interna deben usarse a una concentración conocida y deben actuar como un sustituto celular. Este sustituto debe tener unas propiedades tales que el instrumento pueda distinguirlo, en al menos una técnica de medición, de los constituyentes celulares de la muestra. Este sustituto celular actúa como una muestra interna, un estándar interno con el propósito de control de calidad. Esto asegura que las mediciones del instrumento se realizan adecuadamente. La forma de realización preferida de este sustituto es partículas de poliestireno. Sin embargo, podrían usarse otras partículas tales como polen, vidrio, células fijadas o coloides grandes, siempre que se cumplan las condiciones anteriores. El intervalo de tamaño de partícula es preferiblemente desde aproximadamente 1 micrómetro hasta aproximadamente 10 micrómetros, y tienen unas características ópticas que les separa de forma única de las plaquetas, leucocitos y eritrocitos en al menos un eje de medición del instrumento.

Las partículas de poliestireno están disponibles comercialmente en diversos fabricantes, tales como Seradyn y Duke. El tamaño preferido es de 4,0 micrómetros, que se distingue fácilmente de los componentes celulares de la sangre a lo largo de varios ejes de recolección de datos en el instrumento. La elección de este tamaño para las partículas permite determinar fácilmente la concentración de partículas. Los sistemas de reactivos del consumible son sensibles a una medición porcentual de sólidos (volumen de partícula tiempo de concentración de partículas); por lo tanto, cuanto menor sea el volumen elegido mayor será la concentración de partículas, y más amplio el intervalo que puede llevarse a cabo. La forma de realización preferida debe tener una concentración de partículas en el consumible de 10.000 por μl . A este nivel, el número de eventos de partículas de referencia contados estará en el mismo rango que el número de leucocitos contados.

La concentración de las partículas y sus características ópticas se determinan mediante un procedimiento de referencia. Se obtienen las características de las partículas, tales como su recuento por microlitro para cada tipo de partícula, la señal media para una medición óptica para cada tipo de partícula, el coeficiente de variación para una

medición óptica para cada tipo de partícula. El experto en la materia apreciaría que también pueden medirse otros parámetros asociados con cada tipo de partícula y usarse ventajosamente en el sistema de la presente invención, según se desee, y la presente invención no pretende estar limitada en modo alguno por los parámetros específicos enumerados anteriormente.

5

A partir de esta información se genera una etiqueta de código de barras encriptado que referencia una cualquiera o cualquier combinación de al menos los siguientes parámetros:

- 1. Tipo de prueba
- 10 2. Número de lote
- 3. Fecha de caducidad
- 4. Número de serie
- 5. Concentración de la partícula 1 (expresada en términos de número de partículas $\times 10^3 / \mu\text{l}$)
- 6. Concentración de la partícula 2 (expresada en términos de número de partículas $\times 10^3 / \mu\text{l}$)
- 15 7. EXT media de la partícula 1
- 8. EXT media de la partícula 2
- 9. FSL media de la partícula 1
- 10. FSL media de la partícula 2
- 11. FSH media de la partícula 1
- 20 12. FSH media de la partícula 2
- 13. RAS media de la partícula 1
- 14. RAS media de la partícula 2
- 15. TOF medio de la partícula 1
- 16. TOF medio de la partícula 2
- 25 17. CV de EXT media de la partícula 1
- 18. CV de EXT de la partícula 2
- 19. CV de FSL de la partícula 1
- 20. CV de FSL de la partícula 2
- 21. CV de FSH de la partícula 1
- 30 22. CV de FSH de la partícula 2
- 23. CV de RAS de la partícula 1
- 24. CV de RAS de la partícula 2
- 25. CV de TOF de la partícula 1
- 26. CV de TOF de la partícula 2
- 35 27. Densidad óptica del fluido a 488 nm
- 28. Densidad óptica del fluido a 540 nm
- 29. Densidad óptica del fluido a 580 nm
- 30. Densidad óptica del fluido a 635 nm

40 Para cada tipo de partícula usado en el sistema se genera una tabla de valores de referencia, y se almacena en el ordenador conectado con el instrumento. Los valores de la tabla de referencia pueden contener, como parámetros, uno o más de los siguientes:

- 1. Número de partícula
- 45 2. EXT media
- 3. FSL media
- 4. FSH media
- 5. RAS media
- 6. TOF medio
- 50 7. CV de EXT
- 8. CV de FSL
- 9. CV de FSH
- 10. CV de RAS
- 11. CV de TOF

55

Como **ejemplo** asumimos que unas partículas de látex de 4,1 micrómetros se denominan partículas 7. Los siguientes valores de referencia asociados con esas partículas de referencia pueden almacenarse en el ordenador:

- 1. Partícula = 7
- 60 2. EXT media = 520
- 3. FSL media = 430
- 4. FSH media = 824
- 5. RAS media = 941
- 6. TOF medio = 252
- 65 7. CV de EXT = 3,1
- 8. CV de FSL = 2,9

- 9. CV de FSH = 4,2
- 10. CV de RAS = 7,9
- 11. CV de TOF = 2,1

5 Adicionalmente, para cada colorante que se usa en el sistema hay un espectro característico de absorción de luz asociado que también se almacena en una tabla en el ordenador conectado con el sistema. Para cada lote se probará la absorción del fluido colorante en una o más longitudes de onda características de estos espectros, es decir, una longitud de onda a la cual la absorción del colorante está en un punto máximo o mínimo, o que es identificada de forma única con el colorante. Como ejemplo, puede probarse la absorción de un reactivo que
10 contiene un colorante a las siguientes longitudes de onda:

- 1. Densidad óptica del fluido a 488 nm
- 2. Densidad óptica del fluido a 540 nm
- 3. Densidad óptica del fluido a 580 nm
- 15 4. Densidad óptica del fluido a 635 nm

La medición a 635 nm es útil para detectar colorantes azules, que absorben luz a esta longitud de onda. La hemoglobina absorbe fuertemente luz verde, por lo que se usa una medición a 540 nm para medir la concentración de hemoglobina. Las mediciones a 580 nm son útiles para detectar los productos de algunos ensayos de química
20 clínica, que absorben luz amarilla. Finalmente, una medición a 488 nm es útil como calibración verdadera de longitud de onda, dado que ni la hemoglobina ni ninguno de los colorantes de reticulocitos usados habitualmente absorben a esta longitud de onda, y por lo tanto interfieren mínimamente con esta medición.

Como **ejemplo** asumimos que el colorante azul de metileno nuevo se denomina colorante 3, y tiene los siguientes
25 valores de absorción en la tabla de referencia:

- 1. Densidad óptica del fluido a 488 nm = 0,85
- 2. Densidad óptica del fluido a 540 nm = 0,62
- 3. Densidad óptica del fluido a 580 nm = 0,73
- 30 4. Densidad óptica del fluido a 635 nm = 0,20

Ahora asumimos que el cuarto lote de tubos para pruebas de hemograma completo, elaborado en marzo de 2001 (4c01) que caducará en 2 años (2), contiene dos conjuntos diferentes de partículas de referencia. El primer conjunto de partículas de referencia hace referencia a la entrada 7 de la tabla, que se refiere a partículas de 4,1 micrómetros
35 a una concentración de 1.200 partículas por microlitro (0712). El segundo conjunto de partículas de referencia hace referencia a la entrada 25 de la tabla, que se refiere a una partícula celular fijada a una concentración de 32.500 por microlitro (25325), en una disolución de azul de metileno nuevo, que es la entrada de la tabla D (d). Los tubos consumibles que contienen la disolución descrita anteriormente se serializan desde 0 – 50.000. Por lo tanto, se crearían los siguientes códigos de barras:

40 `4c012071225325d00000 hasta 4c012071225325d50000`

Este **ejemplo** de código de barras de referencia es de demostración. Para el experto en la materia sería obvio que puede reducirse significativamente el número de dígitos sin pérdida de información.
45

La colocación de estos códigos de barras en los tubos consumibles proporcionará al sistema la información necesaria para realizar las determinaciones de control de calidad en las muestras individuales para demostrar que las diluciones se realizaron adecuadamente, y que todas las mediciones ópticas fueron precisas.

50 Como **ejemplo** de uso de los datos que en código de barras en determinaciones del control de calidad, asumimos que cuando se realiza una dilución de eritrocitos, el volumen de reactivos del consumible se diluye a la mitad. Por lo tanto, en el ejemplo anterior, el recuento de células fijadas durante este recuento de la porción de eritrocitos debería ser de 16.250 (32.500/2). Si el recuento de células fijadas no está dentro de una banda de tolerancia de aproximadamente 16.250, no aparecerán los resultados del recuento. De forma similar, dado que el sistema espera
55 que haya partículas de látex de 4,1 micrómetros en el tubo consumible, un recuento de 600 (1.200/2) confirmará una dilución correcta. Sin embargo, si se detecta una dilución incorrecta, el sistema puede comparar el valor obtenido para las partículas celulares fijadas con el obtenido para las partículas de látex. Si la desviación relativa con respecto a los valores esperados es la misma para cada medición de partícula, entonces se sospecha de un error de dilución.

60 El sistema también puede referenciar los valores ópticos esperados en las tablas, que son independientes de la dilución. La comparación de los datos de la media y el coeficiente de variación (CV) de las partículas, en comparación con las tablas de referencia, permite una determinación de si se ha producido un error de dilución, y también proporciona una perspectiva sobre las características de alineación óptica, estabilidad de la potencia del láser y corriente de flujo. Como con el ejemplo de dilución, si los datos de dispersión de la luz recuperados no se
65 ajustan con los datos esperados en una tolerancia preestablecida, no aparecerán algunos o todos de los análisis de clasificación celular. De este modo, puede mostrarse un error de precisión al operador que ayudará a tomar las

medidas correctoras adecuadas. Adicionalmente, el sistema puede registrar este rendimiento con el tiempo, y mantener una base de datos del rendimiento del sistema con el tiempo para registrar tendencias del sistema. Basándose en los datos obtenidos, y en las tendencias recientes, pueden generarse automáticamente recomendaciones de técnicas de mantenimiento, recalibrado o solución de problemas.

5

SISTEMA DE DETECCIÓN ÓPTICO SIN LENTE Y POR LÁSER

Para obtener datos razonablemente precisos sobre cualquier sistema hematológico basado en citometría de flujo, las células o partículas individuales deben pasar a través de la zona sensora de una célula de flujo. Para conseguir esto usando contadores celulares de impedancia estándar, habitualmente se diluye la sangre completa en el orden de 1:10.000, debido al gran volumen de la zona sensora de la abertura de la célula de flujo (es decir, 60 micrómetros de ancho por 100 micrómetros de largo). Un sistema hematológico basado en citometría de flujo puede funcionar, sin embargo, con unas concentraciones mayores de sangre completa porque la zona sensora de los instrumentos típicos tiene habitualmente alrededor de 10 micrómetros de ancho (corriente del núcleo) por 20 micrómetros de largo (altura del rayo láser). Consecuentemente, pueden usarse diluciones de sangre completa del orden de 1:500 hasta 1:1.000.

Para el tubo consumible descrito anteriormente, la dilución ideal de sangre completa es de 1:100 para el análisis de eritrocitos, que utiliza menos del 20% del volumen del tubo consumible. Esto deja el 80% o más del volumen del tubo para realizar una dilución de leucocitos, y un lavado final del sistema (cámara de desecho). Para conseguir esto, la zona sensora debe estar adicionalmente comprimida con procedimientos disponibles habitualmente. Esto puede conseguirse de dos formas. La primera es controlar la tasa de flujo de masa hasta unas tasas muy bajas pero constantes (de 0,05 microlitros por segundo), para mantener la corriente del núcleo con un ancho del orden de 7 micrómetros. La segunda es limitar la altura del rayo láser hasta aproximadamente 3 micrómetros.

25

Esto se consiguió mediante el uso de un sistema emisor en línea del láser de diodo, según se describe en la patente de EE.UU. pendiente de tramitación N° 6.612.719. El aparato contiene un láser semiconductor que produce una salida de luz que está orientada en un primer y un segundo ejes perpendiculares entre sí y los dos ejes perpendiculares a la dirección de propagación de la luz. El aparato también incluye un sistema óptico que está dispuesto de una forma tal que enfoque la salida del láser hacia el primer y segundo ejes en la primera y segunda parte focal, que están separadas aparte en la dirección de propagación de la luz láser. En un plano que intersecta cada uno de los puntos focales se forma la luz, en una línea con un ancho en un eje y una longitud en el otro eje.

Los citómetros de flujo y los sistemas hematológicos basados en citometría de flujo clásicos recogen la luz que es dispersada por las células a diversos ángulos. Estos sistemas convencionales utilizan una lente recolectora que refleja la corriente del núcleo, recoge toda la luz dispersada por el componente celular de una muestra y después la hace pasar a través de una abertura que determina el ángulo de recolección. Esta luz filtrada se dirige entonces a un fotodetector, que recoge el cono completo de luz dispersada a los ángulos deseados. Si se desea más de un ángulo anterógrado de recolección de la luz, se usan divisores del haz y espejos para separar los distintos conos de luz. Para la recolección de la dispersión en ángulo recto, comercialmente se usa una lente para reflejar la corriente de flujo, con objeto de mantener bajos los niveles de luz de fondo.

En la metodología del diseño sin lentes, los detectores, sin ninguna lente anexa ni otros elementos ópticos, se fijan en el espacio para recoger las señales apropiadas inducidas por las células al atravesar el rayo láser. Estas señales incluyen la extinción (EXT) ($0^\circ - \sim 0,5^\circ$); la dispersión anterógrada de ángulo pequeño (FSL) ($\sim 1^\circ - \sim 3^\circ$); la dispersión anterógrada de ángulo elevado (FSH) ($\sim 4^\circ - \sim 9^\circ$); y la dispersión en ángulo recto (RAS) ($\sim 50^\circ - \sim 130^\circ$). Con objeto de recoger tres medidas diferentes de ángulo pequeño a partir de la trayectoria del rayo láser, la óptica de modelado del rayo láser forma dos focos de la luz del láser de diodo. Véase la patente de EE.UU. pendiente de tramitación N° 6.612.719. El primer foco es el plano con el que la luz láser intersecta las corrientes del núcleo de las células / partículas. Este foco es perpendicular al plano de movimiento de las células, y la luz se dispersa debido al paso de las células ortogonalmente a través del delgado centro (plano focal) de un rayo ancho.

Como resultado de tener un rayo con una altura mínima (es decir, una dimensión mínima en la dirección de la partícula a través de la célula de flujo), puede analizarse un gran número de células a elevadas concentraciones sin la interferencia de eventos coincidentes. Esto minimiza los volúmenes de líquido y la necesidad de manipular grandes volúmenes de líquido. Adicionalmente, esta disposición produce una elevada distribución de la potencia de la luz en las células en este primer foco, por lo que puede medirse la dispersión en ángulo recto (RAS) usando un detector mucho más barato que el que se emplea en los sistemas convencionales. En particular, un fotodiodo puede reemplazar el uso de un tubo foto multiplicador. La distribución horizontal de la potencia permite que la corriente de flujo fluctúe en ese eje sin una deriva apreciable, y además minimiza la dispersión de la luz procedente de los bordes de la célula de flujo al mantener la distribución de potencia de la luz paralela al canal de la célula de flujo.

El segundo foco está en el plano en el que se colocan los detectores. Aquí, la porción ancha del rayo procedente de la célula de flujo se reduce a un mínimo (es decir, se focaliza), y la luz que ha pasado a través del primer foco se ha expandido formando una línea larga de luz con una cierta altura. Dentro de esta larga línea de luz se coloca un detector de fotodiodo en el punto en el que el nivel de luz es mayor. Este es el detector de extinción (EXT), que mide

toda la luz axial que se ha perdido (la suma de la luz absorbida y la luz dispersada) según la célula cruza el rayo láser. Esta medición contiene una gran cantidad de información, pero esta información sólo puede extraerse cuando hay una elevada proporción entre la señal y el ruido (*signal to noise*, S/N). Los láseres de gas empleados convencionalmente en los sistemas hematológicos basados en citómetros de flujo producen unas señales fuertes, pero los altos niveles de ruido asociados con estos láseres han minimizado su utilidad para las medidas de la EXT. Esto puede compensarse utilizando tubos de plasma más largos, ya que cuanto más largo es el tubo de plasma, menor es el nivel de ruido, y por lo tanto mayor es la proporción S/N. Los láseres de diodo tienen inherentemente unos niveles de ruido menores que los láseres de gas, pero muestran unos altos niveles periódicos de ruido. Estos estallidos intermitentes de ruido se denominan "salto modal". Unos cambios sutiles en la temperatura o la corriente eléctrica provocan que el diodo láser cambie bruscamente de un estado monomodal a otro estado monomodal. Cuando se es tan produciendo saltos modales, la proporción S/N de la medición de extinción es muy baja, haciéndola inútil para la medición de partículas pequeñas o para distinguir diferencias sutiles en las más grandes.

Para eliminar los saltos modales puede implementarse un control cuidadoso de la temperatura y un control preciso la corriente. Si se realiza esto, cada diodo de láser debe caracterizarse individualmente para encontrar un área tranquila de temperatura/corriente en la que no se produzcan saltos modales. Debe realizarse un laborioso esfuerzo para caracterizar cada diodo de láser individual para encontrar la configuración ideal de temperatura y corriente. Además, según envejece el láser, el área tranquila de temperatura/corriente cambia, y reconfigura los controles de temperatura y corriente. Adicionalmente, incluso si se determina la temperatura apropiada, cuando se enciende por primera vez un láser de diodo, genera su propio calor. El equilibrio en la temperatura del láser de diodo puede tardar hasta 30 minutos en establecerse. Este tiempo de equilibrio y disminuye la vida útil del láser. Finalmente, la implementación del control de la temperatura limita gravemente las temperaturas operativas a las que puede usarse una unidad, y añade un coste y un tamaño significativos a un diodo de láser relativamente barato y pequeño.

Para obtener una medición precisa de la extinción usando un láser de fotodiodo, puede emplearse una modulación de alta frecuencia. La modulación de alta frecuencia elimina los saltos modales manteniendo el láser en un estado multimodal. Cuando cambia la temperatura o la corriente, el modo primario del diodo cambia, pero dado que el láser de diodo está funcionando en muchos modos con los que comenzar, estos cambios no producen ninguna punta de ruido. Adicionalmente, la frecuencia de modulación puede elegirse para que sea mucho más mayor que las secuencias de interés para los eventos celulares, de forma que la modulación sea invisible para el sistema.

La modulación de alta frecuencia resuelve los problemas relacionados con el uso del control de la temperatura y la corriente a la hora de abordar los saltos modales. Un sistema de modulación de alta frecuencia es estable durante segundos, por lo que no hay necesidad de controlar la temperatura generada por el láser de diodo tras su activación. Por lo tanto, la vida útil del láser se prolonga. Adicionalmente, al contrario que los sistemas de enfriamiento de temperatura, los sistemas de modulación de alta frecuencia son estables a lo largo de un amplio intervalo de temperaturas operativas. Con la modulación de alta frecuencia, no hay necesidad de encontrar el área tranquila de temperatura para corriente, y no hay necesidad de reconfigurar el equipo según envejece el láser. Por lo tanto, se evita el coste del trabajo realizado para hallar y mantener un área tranquila de temperatura/corriente para el láser de diodo.

La modulación de alta frecuencia se impone en un láser de diodo de la siguiente forma. Un láser de diodo que funciona en un modo de longitud de onda continua (*continuous wavelength*, CW) tiene un fotodiodo integrado que se usa para la retroalimentación, de forma que la potencia no varíe con la temperatura. Este circuito cambia la corriente entrante en el diodo de láser, de forma que la potencia de la luz se mantiene constante. En una forma de realización, el punto de establecimiento de la CW del controlador del láser se configura de forma que produzca la mitad de la potencia de salida nominal del láser. A continuación, un circuito de modulación que usa un oscilador de cristal para producir una corriente eléctrica con una salida de onda sinusal, se "suma" con la corriente de CW. Como resultado, la potencia de salida del láser toma una forma de onda sinusal, con una potencia máxima próxima al nivel de potencia nominal del láser en el pico de la onda sinusal, y una potencia de prácticamente cero en el mínimo de la onda sinusal.

Dado que el rayo láser converge en un foco en el plano del detector, puede recoger la dispersión de luz de ángulo pequeño (FSL) a pequeñas distancias lineales del eje del rayo convergente sin la necesidad de lentes, como se requiere en los sistemas convencionales. La FSL puede usarse para medir tamaños de partículas. La FSL se mide colocando un fotodetector de FSL tan próximo al fotodetector de EXT como sea físicamente posible. Esto puede realizarse con fotodiodos aislados o con una matriz de fotodiodos que tenga un tamaño adecuado para las dos medidas independientes (EXT & FSL).

La información relativa al índice de refracción y la complejidad interna de las partículas se obtiene usando ángulos mayores de dispersión anterógrada de la luz (FSH). Esta medición de la dispersión se realiza generalmente en la región de aproximadamente $4^\circ - 9^\circ$, medida desde el eje del láser. Esta medición puede realizarse sin el uso de lentes, bien posicionando un fotodiodo aislado para recoger esa área de dispersión de luz, o bien usando una matriz de fotodiodos con componentes activos que se corresponden con la geometría apropiada. En una forma de realización se crea una matriz de fotodiodos que es eficaz para medir la EXT, la FSL y la FSH, todas en la misma matriz.

En el sistema de la presente invención, el fotodetector está preferiblemente en forma de una fotomatrix en un único circuito integrado, con los detectores separados y orientados para recoger la luz dispersada en los ángulos apropiados. Esta configuración permite realizar tres o más mediciones independientes, sin el requisito de ninguna lente de recolección o de reflejo. Mientras que se ha descrito la matriz fotodetectora para la recolección de EXT, FSL y FSH, dicha matriz podría extenderse hasta unos ángulos de recolección tan elevados como de $\sim 40^\circ$. Por encima de este valor, el canal de flujo cuadrático interferiría con las mediciones.

Para asegurar la alineación de todos los diodos en los ángulos apropiados, y para recoger sólo ángulos puros de interés, puede colocarse una máscara que actúe como filtro de luz sobre los diodos individuales o sobre la matriz de fotodiodos. Esta máscara tiene preferiblemente aberturas con forma curva, para conservar los ángulos verdaderos de la luz dispersada al cubrir las esquinas de cualquier fotodiodo cuadrado o rectangular que se usen. Una máscara creada de forma precisa con la geometría apropiada que se fija sobre los fotodiodos reduce el requerimiento de alineación óptica de lo conjunto de diodos múltiples a la alineación de únicamente el diodo detector de EXT, simplificando así su construcción y calibrado. Este conjunto de fotodiodos enmascarado se posiciona preferiblemente de forma que el sensor de extinción tenga el máximo nivel de luz incidente, es decir, en el segundo foco del rayo de luz láser.

La posición del fotodiodo de dispersión de ángulo recto (RAS) es esencial para preservar una elevada apertura numérica, que sólo puede conseguirse sin el uso de una lente. Por lo tanto, el fotodiodo se fija cerca de la célula de flujo, paralelo al plano del láser. Toda la luz que sea dispersada ortogonalmente por la célula o partícula hacia un lado de la célula de flujo intersecta el fotodiodo RAS. Esto proporciona unos ángulos de aceptación ortogonal de $\sim 50^\circ$ - 130° , o una apertura numérica (NA) de 0,9.

Este fotodiodo RAS de alta apertura numérica ocupa toda una cara lateral de la célula de flujo, de forma que no pueden realizarse otras medidas en esta cara de la célula de flujo. Sin embargo, la cara opuesta del detector RAS todavía está disponible, y puede usarse para obtener otras medidas. Por ejemplo, esta cara de la célula de flujo puede usarse para generar datos de fluorescencia estándar en el citómetro de flujo, empleando detectores capaces de detectar la luz fluorescente emitida. Esta cara también puede contener uno o más de los siguientes: una lente de recolección (de baja apertura numérica) que reflejara la corriente de flujo en el centro de la célula de flujo; divisores del haz y filtros de interferencia, para separar varios ejes de información fluorescente; lentes reflejantes para focalizar la luz hacia el detector; y tubos fotomultiplicadores para detectar bajos niveles de emisiones fluorescentes.

El uso de un sistema detector de luz sin lentes elimina la necesidad de elementos ópticos asociados, tales como lentes, stops y espejos. El sistema de detección de luz resultante es significativamente más pequeño, más ligero, más barato y más fiable que los sistemas de detección de luz convencionales, que se basan en dichos elementos ópticos para dirigir rayos de luz dentro del instrumento.

Un inconveniente de usar sistemas de recolección de luz sin lentes es que la luz parásita llega fácilmente a los detectores. Las lentes se usan convencionalmente para dirigir la luz que refleja la corriente del núcleo, de forma que sólo aquella que surge de la corriente del núcleo alcanza el detector. Las lentes también se usan para focalizar la luz recogida desde los ángulos de cono completo hacia un punto en el que se coloca un pequeño fotodetector. El uso de fotodetectores relativamente pequeños minimiza el ruido de corriente residual, que es proporcionar al área del fotodiodo. Sin embargo, dado que un sistema sin lentes mantiene un nivel constante de luz de la luz de fondo en todos los detectores del sistema, no se puede conseguir una línea de base del ruido de la corriente residual. La constante luz de fondo sobre los fotodiodos genera una fotocorriente constante en la electrónica de procesado de las señales. Esta fotocorriente constante es electrónicamente análoga a la corriente continua (*direct current*, o DC), por lo que el sistema sin lentes genera un elevado nivel de DC en cada fotodiodo. Por lo tanto es más difícil eliminar en dicho sistema sin lentes la contribución del nivel de luz de la DC, y es imposible conseguir un mínimo de ruido de corriente residual del fotodetector. Sin embargo es necesario para que la luz de DC no interfiera con las señales generadas por las células con las partículas. Esto se consigue electrónicamente mediante el uso de un servocircuito de retroalimentación, de forma que las porciones de señal deseadas (corriente alterna o componente AC) puedan ser medidas de forma precisa y reproducible, independientemente de los cambios de temperatura, los cambios en la potencia del láser u otros cambios ambientales o electrónicos que puedan afectar al nivel de luz de DC.

Con objeto de mantener las salidas en un valor de línea de base cuando no hay ninguna señal presente, hay un servocircuito local para cada uno de los circuitos de preamplificación asociados con los canales ópticos (EXT, FSL, FSH, RAS). Las corrientes residuales de fotodiodo, las corrientes de polarización de entrada o los voltajes de compensación pueden provocar compensaciones derivadas en las salidas de los circuitos de preamplificación. Hay dos procedimientos de retroalimentación usados en los circuitos de preamplificación. El primer procedimiento consiste en un transistor de efecto de campo de canal P con su puerta conectada a la salida de la segunda etapa. Debido a la mayor corriente residual del sensor EXT, se usa un convertidor de voltaje a corriente de retroalimentación de transistor de efecto de campo para mantener una elevada impedancia en el nodo suma del amplificador operacional de primera etapa. El resistor de retroalimentación produce una corriente proporcional al voltaje de salida de la segunda etapa. El segundo procedimiento de retroalimentación usa un amplificador operacional configurado como un integrador para devolver una proporción de la señal de vuelta al amplificador

operacional de primera etapa para reducir los niveles de compensación a través de los amplificadores operacionales de primera y segunda etapa. Los servobucles locales reducen las señales de baja frecuencia. La ecuación (1) puede usarse para determinar la frecuencia de esquina a la cual el servobucle proporcionará una atenuación (-3 dB).

- 5 Ecuación (1) $f_{.3dB} = R_{diodo} * G2 / (2 \pi R_t R_f C_f)$
 en la que
 R_{diodo} = resistor de retroalimentación a través del amplificador operacional de primera etapa
 $G2$ = ganancia de la segunda etapa
 R_t = resistor de conversión de corriente a voltaje
 10 R_f = servoresistor de entrada
 C_f = servocondensador de integración

MÓDULO DE HGB

- 15 La concentración de hemoglobina es un parámetro hematológico muy habitual que generalmente se mide mediante la absorción de luz a 540 nm. Para conseguir esta medición, generalmente los eritrocitos se lisan en una disolución que contiene 1 parte de sangre completa por 250 partes de disolución. La disolución también contiene generalmente un bajo nivel de sal de cianuro (es decir, KCN). El cianuro reduce toda la hemoglobina (oxi- y desoxi-) a cianohemoglobina, que tiene un máximo de absorción a 540 nm. Esta medición de la absorción se realiza
 20 habitualmente en una cubeta de 1,0 cm² (NCCLS), pero también funcionan otras variantes del estándar con una alta correlación con el procedimiento de referencia.

En los instrumentos hematológicos convencionales, la concentración de hemoglobina se mide generalmente en una disolución por lo demás clara, y está referenciada siempre con respecto a un fluido transparente. La lisis de los
 25 eritrocitos permite medir la concentración de hemoglobina en el mismo canal de fluidos que los leucocitos. Alternativamente, en algunos sistemas el contenido de hemoglobina se mide en un canal por separado.

En el instrumento usado en la presente invención, el contenido en hemoglobina (HGB) se mide de una forma no convencional. El procedimiento de la presente invención implica dos mediciones por separado, que no sólo se
 30 combinan para dar un valor preciso de HGB, sino que también verifica la precisión de la dilución que ha realizado el sistema. La primera medición de HGB se produce después de que se haya diluido 100 veces una parte de la sangre completa con una disolución de tinción de reticulocitos. Esto se denomina "disolución de eritrocitos". Esta disolución de tinción de reticulocitos tiene un espectro de absorción específico asociado a ella. La disolución de eritrocitos se aspira en un bloque colector. Este bloque contiene al menos tres fuentes emisoras de luz, configuradas para iluminar
 35 un agujero cilíndrico, en el que se mantiene la disolución de eritrocitos. Los fotodetectores se colocan en línea con la fuente de luz y el agujero cilíndrico, con reservas para filtros de interferencia. Esta configuración permite la medición de al menos tres longitudes de onda de absorción diferentes. Se usan tres longitudes de onda de absorción diferentes debido a la presencia de un colorante en la disolución de tinción de reticulocitos.

40 Las mediciones iniciales de absorción de la disolución de eritrocitos no proporcionan una medición precisa de la concentración de HGB como otras técnicas convencionales. Sin embargo, el valor de esta medición radica en su uso como un punto de datos para la determinación de la precisión de la dilución de sangre completa. Según continúa el instrumento su ciclo tras realizar la medición inicial de hemoglobina "sin lisis", se realizan las mediciones de eritrocitos totales y volumen celular medio en la porción del citómetro del instrumento. Esto permite el cálculo de lo
 45 siguiente:

- Hematocrito (HCT) = RBC * MCV / 10
- Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (*Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*)
 50 (MCHC) = 100 * (HGB / HCT)
- Hemoglobina Corpuscular Media (*Mean Corpuscular Hemoglobin*) (MCH) = HGB / RBC

Según continúa el ciclo del instrumento se añade más sangre completa a la disolución original, así como un agente
 55 lítico. El agente lítico destruye las membranas celulares de los eritrocitos (lisis), liberando la HGB para que quede libre en disolución. Esto rinde aproximadamente 1 parte de sangre completa por entre 15 y 50 partes de disolución, que se denomina "dilución de leucocitos". La disolución de leucocitos contiene todos los colorantes de la disolución de eritrocitos medida previamente. La concentración original de la disolución colorante se ha diluido ahora en un factor de entre 1:1 y 1:4, con un fluido ópticamente transparente.

60 La disolución de leucocitos se aspira en el bloque colector donde se realizan múltiples medidas de absorción, y se calcula un valor de HGB. A partir de este segundo valor de HGB, pueden recalcularse el HCT, la MCHC y la MCH. Además del valor de HGB, puede medirse la concentración de colorante y compararlo con los valores obtenidos a partir de la disolución de eritrocitos. Si, dentro de una tolerancia definida, las dos mediciones independientes de
 65 HGB (HCT, MCHC, MCH) coinciden, y las proporciones de colorante entre las disoluciones coinciden, el instrumento ha verificado, por medición, que todas sus diluciones se realizaron con precisión.

Los cálculos de la HGB de los leucocitos, debido a la lisis de los eritrocitos, rinden una medición precisa de la concentración de HGB. Los cálculos de HGB de los eritrocitos no son tan precisos como los cálculos de HGB de los leucocitos, debido a que las membranas intactas de los eritrocitos dispersan la luz. Sin embargo, una comparación de las diferencias en las absorbancias que son debidas al colorante de tinción de reticulocitos en cada medición permite comprobar la precisión de las diluciones. Esto es, la muestra que contiene eritrocitos no lisados (la disolución de eritrocitos) tiene un cierto nivel de absorción de luz que se basa en la concentración del colorante en el tubo consumible. Posteriormente en el ciclo, se mide la muestra que contiene eritrocitos lisados (la disolución de leucocitos) para comprobar la absorción de luz debida al pigmento. Dado que las vías hidráulicas para los análisis de eritrocitos y leucocitos son comunes, la precisión de las diluciones puede determinarse sin la necesidad de una disolución de referencia aparte. Se conoce el intervalo aceptable de proporciones en las mediciones de HGB, bien por estar impreso en una etiqueta de código de barras sobre el tubo consumible, o bien a partir de un código en la etiqueta de código de barras del tubo consumible que hace referencia a un valor en una tabla de proporciones almacenada en el ordenador. Como segunda comprobación de la precisión de las diluciones, las mediciones de HGB también deberían coincidir con una cierta tolerancia. De otro modo debería sospecharse de un error de dilución. El único caso en el que el error de dilución no se detectaría es la altamente improbable situación en la que se realizasen errores de dilución idénticos en ambas muestras.

En un ejemplo preferido de la metodología anterior, el código de barras del tubo consumible contiene información de referencia sobre los valores esperados de absorción de colorante para las muestras no diluidas (CAL). El instrumento verifica esta información para cada número de lote en uso.

Tras la primera dilución, la disolución de eritrocitos debería tener un valor de absorción del colorante y un valor de concentración de HGB que entra dentro de un primer conjunto de intervalos esperados. Estos intervalos deberían ser producto de CAL x un primer factor de dilución (D1). Tras la segunda dilución, la disolución de leucocitos debería tener un valor de absorción del colorante y una concentración de HGB que entrasen dentro de un segundo conjunto de intervalos esperados. Estos intervalos deberían ser el producto de CAL x D1 x un segundo factor de dilución (D2). Siempre que ambos conjuntos de mediciones estén en los intervalos aceptables, los resultados de las mediciones se notifican sin los mensajes de error asociados.

30

REACTIVOS

En la determinación de la composición celular de una muestra sanguínea, el instrumento usado en la presente invención emplea al menos dos reactivos de procedimiento primarios y un tercer sistema de reactivos. Estos tres reactivos trabajan conjuntamente para, en primer lugar, contar y clasificar las plaquetas y los eritrocitos, y a continuación, tras una manipulación adicional del reactivo, contar y clasificar los leucocitos. El recuento y la clasificación tienen lugar en dos fases separadas, y en cada una de las dos fases separadas las mezclas de sangre-activos se hacen pasar a través de un citómetro de flujo, y las células de las muestras se identifican y se cuentan.

Un reactivo del procedimiento, denominado reactivo del procedimiento RBC / Retic, se coloca en un tubo de ensayo estándar taponado, denominado "consumible". El consumible contiene lo siguiente:

- azul de metileno nuevo, en un intervalo de concentración de 0,1 a 0,5 gramos por litro. Este componente sirve para teñir el ARN residual de los reticulocitos con un color azul. La concentración preferida es de 0,3 gramos por litro.
- Purafac-A-39-Pric, en un intervalo de concentración desde 0,1 hasta 0,6 gramos por litro. Este componente actúa modificando la forma bicóncava normal de los eritrocitos, al interactuar con la membrana celular y la hemoglobina interna, para formar células esféricas. La concentración preferida es de 0,3 gramos por litro.
- partículas de referencia interna que tienen una concentración conocida, que es nominalmente de 10^4 partículas por μl , pero puede usarse en un intervalo de 10^3 a 10^5 por μl .
- tampones y conservantes. Los tampones y conservantes consisten en bicarbonato sódico (preferiblemente 8,0 gramos por litro, pero puede variar desde 6,0 a 10,0 gramos por litro); cloruro sódico (preferiblemente a 3,1 gramos por litro); Tricina (preferiblemente a 1,8 gramos por litro, pero variando entre 1,0 y 5,0 gramos por litro); EDTA disódico preferiblemente a 1,0 gramos por litro, pero variando entre 0,5 y 3,0 gramos por litro); etilparabeno (0,3 gramos por litro) y metilparabeno (0,2 gramos por litro). El pH de esta disolución debería estar en un intervalo ligeramente básico entre 7,2 y 8,9, con una osmolaridad de entre 275 y 294 miliosmoles, y una conductividad de entre 11,0 y 13,0.

Las partículas de referencia interna deben usarse a una concentración conocida, y deben actuar como un sustituto celular. Este sustituto debe tener unas propiedades tales que el instrumento, en al menos una única técnica de medición, pueda distinguirlo de forma única de los constituyentes celulares de la muestra. Este sustituto celular actúa como una muestra interna, un estándar interno para propósitos de control de calidad. Esto asegura que las

65

mediciones del instrumento se realizan adecuadamente, y que todas las diluciones se han realizado adecuadamente. La forma de realización preferida de este sustituto es partículas de poliestireno. Sin embargo, podrían usarse otras partículas, tales como células fijadas, polen, vidrio o grandes coloides, siempre que se cumplan las condiciones anteriores. El intervalo del tamaño de partícula es preferiblemente desde aproximadamente 1 5 micrómetro hasta aproximadamente 10 micrómetros, y tiene unas características ópticas que lo separan de forma única de las plaquetas, los leucocitos y los eritrocitos en al menos un eje de medición del instrumento.

Las partículas de poliestireno están disponibles comercialmente en diversos fabricantes, tales como Seradyn y Duke. El tamaño preferido es de 4,0 micrómetros, que se distingue fácilmente de los componentes celulares de la sangre a lo largo de varios ejes de recolección de datos en el instrumento. La elección de este tamaño para las partículas permite determinar fácilmente la concentración de partículas. Los sistemas de reactivos del consumible son sensibles a una medición porcentual de sólidos (volumen de partícula tiempo de concentración de partículas); por lo tanto, cuanto menor sea el volumen elegido, mayor será la concentración de partículas, y más amplio el intervalo de concentraciones de partículas que puede utilizarse. La forma de realización preferida debe tener una concentración de partículas en el consumible de 10.000 por μl . A este nivel, el número de eventos de poliestireno contados estará en el mismo rango que el número de leucocitos contados.

El segundo reactivo de procedimientos se denomina "lisado". El lisado actúa destruyendo los eritrocitos pero dejando intactos los leucocitos. De esta manera, pueden analizarse los leucocitos sin la interferencia de un gran número de eritrocitos. Este reactivo puede envasarse en un tubo de ensayo estándar taponado, preferiblemente en una forma que permita su uso con hasta 50 pruebas de consumibles por separado.

El lisado contiene preferiblemente:

- 25 • Saponina, que puede usarse a unas concentraciones de entre 6,0 y 20,0 gramos por litro. La concentración preferida es de 18 gramos por litro.
- Tampones y conservantes, que consisten en sulfato sódico (preferiblemente a 12,0 gramos por litro, pero eficaz en un intervalo de 10,0 a 16,0 gramos por litro); EDTA disódico (preferiblemente a 1,0 gramos por litro, pero eficaz en un intervalo de 0,5 a 3,0 gramos por litro); pro-clin 300 (preferiblemente a una concentración de 0,5 ml por litro); y germabox (preferiblemente a 1,0 ml por litro). Este pH de este reactivo debería estar en un intervalo de entre 4,2 y 5,2, con una osmolaridad de entre 235 y 285 miliosmoles, y una conductividad de entre 14 y 16.

35 El reactivo del sistema actúa principalmente como un diluyente de la sangre completa, como una disolución envolvente y como un reactivo de lavado. El reactivo del sistema también se denomina "disolución envolvente". La disolución envolvente realiza varias funciones, tales como reactivo de dilución de la sangre completa, reactivo envolvente para análisis citométricos de flujo, reactivo de lavado para las vías hidráulicas del instrumento y coadyuvante lítico para el reactivo lítico para eliminar los eritrocitos. El envolvente se envasa preferiblemente en un 40 recipiente que soportará lo suficiente para usarse en 50 pruebas de consumible distintas por separado.

El envolvente contiene lo siguiente:

- 45 • Disolución salina tamponada con fosfato (preferiblemente con una osmolaridad de 25 miliosmoles, pero que puede usarse en un intervalo desde 5 hasta 50 miliosmoles).
- Tensioactivo para coadyuvar tanto en la limpieza de los componentes internos del sistema como para evitar que se adhieran burbujas de aire a las superficies húmedas internas. El tensioactivo preferido es Plurafac-A-39, que puede usarse en un intervalo de 0,1 gramos por litro a 0,3 gramos por litro, y preferiblemente a una concentración de aproximadamente 0,1 gramos por litro. Además de Plurafac, podrían usarse otros tensioactivos no iónicos como tales.
- 50 • Conservantes

55 Para crear automáticamente las diluciones de sangre completa con los reactivos del procedimiento descrito, se usa un sistema hidráulico y diversos mecanismos. El usuario presenta al instrumento un tubo consumible marcado con un código de barras, así como la muestra de sangre completa adecuadamente anticoagulada. El instrumento lee la información necesaria a partir del código de barras, y automáticamente alicuota una pequeña cantidad de sangre completa en el tubo consumible, junto con un volumen de disolución envolvente. Esto crea idealmente una dilución 60 total de 1 parte de sangre por 100 partes de disolución (reactivo y envolvente RBC / retic), pero la dilución puede variar desde 1:50 hasta 1:5.000.

Entonces se introduce en el instrumento un volumen conocido de esta disolución desde el tubo consumible, y se mueve a una posición cercana a la entrada de la célula de flujo óptico. Entonces se hace pasar la disolución, a una 65 tasa de flujo de masa lenta de menos de 0,25 microlitros por segundo mediante focalización hidrodinámica, a través de un sistema de detección óptico en el que se mide la dispersión de luz y la absorción de luz para los eritrocitos,

plaquetas y micropartículas individuales, así como la absorción de luz por parte de un colorante de la disolución.

Una vez completado el análisis de eritrocitos/plaquetas, el instrumento alicuota una segunda cantidad mayor de sangre completa en el tubo consumible, junto con una alicuota de lisado y las cantidades apropiadas de disolución
5 envolvente, para formar una dilución de preferiblemente una parte de sangre por veinte partes de disolución. Esta disolución puede variar desde 1:10 hasta 1:100. La intención es proporcionar una disolución que pueda lisar los eritrocitos, pero mantener intactos los leucocitos de la muestra de sangre completa durante un periodo de al menos un minuto.

10 Entonces se empuja un volumen conocido de esta segunda disolución en el instrumento desde el tubo consumible y se mueve hasta una posición cercana a la entrada de la célula de flujo óptico. Entonces se hace pasar la disolución, a una tasa de flujo de masa moderada de aproximadamente un microlitro por segundo usando focalización hidrodinámica, a través de un sistema de detección óptico en el que se mide la dispersión de luz y la absorción de luz para los leucocitos, micropartículas y colorantes individuales.

15 La siguiente descripción describe el sistema usado en la presente invención en relación con las figuras anexas. El experto en la materia comprenderá que pueden realizarse algunas modificaciones en la invención según se describe a continuación sin desviarse del ámbito de las reivindicaciones anexas.

20 El usuario abre una puerta del sistema, cuando está en estado READY, que expone dos ranuras de tubo abiertas (ranura A de la figura 7 y ranura B de la figura 7). En estas ranuras vacías el usuario coloca un tubo consumible (60), y una muestra de sangre completa que contiene un anticoagulante (es decir, EDTA, Citrato y Heparina). Entonces el usuario cierra la puerta. El sistema verifica la presencia y la identidad de los dos tubos añadidos, y mueve el carro portador de viales (70) de forma que el consumible se posicione bajo el mezclador (80). El motor 82 posiciona el
25 mezclador de forma que esté en contacto con la parte superior del tubo consumible (60). Centrifugándolo en una dirección, y después revertiendo la dirección, mezcla el tubo. Durante el proceso de centrifugado se lee el código de barras, que contiene la información de calibración del lote. Después de mezclar adecuadamente el tubo consumible para homogeneizar las partículas, el carro 70 posiciona la muestra de sangre completa bajo la mezcladora, y de una forma similar mezcla el tubo de sangre completa para asegurar la homogeneidad de la muestra.

30 El carro posiciona entonces el tubo de sangre completa debajo de la aguja hidráulica 11 y de la aguja neumática 12. Moviendo el motor 81, las agujas perforan el septo del tubo de sangre completa, y continúan penetrando en el tubo hasta que ambas agujas entran en contacto con la superficie de la sangre. Esto asegura que el orificio de la aguja hidráulica 11 esté completamente sumergido, pero que el orificio de la aguja de purga 12 no lo esté.

35 Abriendo la válvula 3, y moviendo la jeringa 6 succiona la sangre dentro de la punta de la aguja 11. Idealmente, se aspirarán 5 microlitros de sangre completa para esta porción. Entonces se cierra la válvula 3. Entonces se retiran las agujas de la muestra de sangre completa del paciente. Según se retiran las agujas a través del septo, las agujas son limpiadas casi completamente por el septo. Ahora el carro 70 posiciona el tubo consumible 60 bajo las agujas. Como
40 antes, moviendo el motor 81, las agujas 11 y 12 perforan el septo del tubo consumible 60, y penetran en el tubo hasta que ambas agujas entran en contacto con la superficie del reactivo.

Entonces se abren las válvulas 5 y 3, mientras que la jeringa 7, que está llena con el diluyente del sistema, comienza a dispensar. Esto empuja la sangre desde la punta de la aguja 11 y un volumen de fluido envolvente hacia dentro del
45 consumible, que ahora está representado por 61. Durante la dispensación, el motor 81 ha movido las agujas 11 y 12 hacia arriba para evitar que el orificio de la aguja 12 entre en contacto con la disolución. Esta disolución es ahora bastante homogénea, pero para asegurar la homogeneidad se cierran las válvulas 3 y 5, y se extraen las agujas de 61, que entonces se mueve a la posición de mezcla debajo de 80, y se mezcla mediante centrifugación, según se describió anteriormente. Durante este proceso se abren la válvula 3 y la válvula 5, y la jeringa 7 crea un espacio de
50 aire en la punta de la aguja.

A continuación el tubo consumible 61 se coloca debajo de las agujas 11 y la aguja 12. Moviendo el motor 81, las agujas 11 y 12 perforan el septo del tubo consumible 60, y penetran en el tubo hasta que ambas agujas entran en contacto con la superficie de la disolución. Entonces la jeringa 7 aspira un volumen conocido de disolución en la
55 punta de la aguja. Entonces las agujas 11 y 12 se retiran de la disolución, pero no se extraen del tubo consumible 61, mediante el motor 81. Esto crea un condensado de la sangre completa diluida en la aguja 11. La jeringa 7 succiona este condensado a través del módulo de HGB 10, donde se evalúa su absorción a cuatro longitudes de onda de luz separadas. Dichos datos espectrales están representados en la figura 22. El volumen de condensado también puede evaluarse aquí evaluando los valores de absorción de los canales detectores, que cambian según
60 pasan a su través los espacios de aire de cada lado del condensado.

La jeringa 7 continúa succionando el condensado hasta pasar la válvula 3, y lo posiciona cerca de la válvula 5. La válvula 3 se cierra mientras que la válvula 2 se abre, punto en el cual la jeringa 7 revierte su dirección y empuja el condensado a través de la válvula 2, hasta la punta del conjunto de la célula de flujo 20.

65 Entonces la válvula 2 se cierra, y la válvula 4 se abre, lo que permite rellenar las jeringas 6 y 7 desde el depósito de

diluyente del sistema 8. Entonces la válvula 5 se cierra, la válvula 1 se abre, y las jeringas 6 y 7 dispensan muy lentamente. La disolución envolvente de la jeringa 7 se dispensa a través de 21, y el condensado de sangre completa diluida es empujado por la jeringa 6 a través de 20. Esto forma una corriente de núcleo confinada en una envoltura de sangre completa diluida en 25, que transporta la corriente al embudo de la célula de flujo 22, donde las células son interrogadas por las fuentes de luz que emiten desde el conjunto óptico 41. Esta corriente de fluido pasa completamente a través de la célula de flujo 22, y dentro de los tubos de 23, que están fijados en la célula de flujo 22 mediante un tapón de célula de flujo 24. Este camino conduce al desecho del sistema 9.

Mientras la corriente del fluido está pasando a través de la célula de flujo 22, el conjunto óptico 41 ilumina individualmente las células de la sangre completa diluida. Las células pasan a través de un punto focal óptico 34 del láser 30, que maximiza la potencia incidente sobre las células. Este estrecho foco es generado por la lente 33. La luz efectuada por el paso de las células a través del punto 34 cambia la cantidades de luz que inciden sobre los fotodiodos 42, 43, 44 y 45. Estos cambios son capturados por la electrónica de procesamiento de señales de la figura 26, y almacenados a través de la electrónica del sistema de la figura 25. Algunos ejemplos de los datos recogidos de esta forma se muestran en las FIGS. 10 A - 10 D.

La Fig. 10 A muestra datos que han sido recogidos para la señal de baja dispersión anterógrada (FSL), a partir del detector 45. La 10 B muestra datos que han sido recogidos para la señal de extinción o de pérdida de luz axial (EXT), a partir del detector 44. La Fig. 10 C muestra datos que han sido recogidos para la señal de dispersión en ángulo recto (RAS), o detector 42. La Fig. 10 D muestra los datos del ancho de pulso que se han recogido a partir de la señal de baja dispersión anterógrada (FSL), o detector 45, pero mide la duración del vuelo, o el tiempo que la célula está frente al rayo láser. Para las figuras 10 A, 10 B, 10 C y 10 D, los picos mostrados por A representan eventos de plaquetas, los picos mostrados por B representan eventos de partículas de látex, y los picos mostrados por C representan eventos de eritrocitos. Estos mismos datos se muestran en forma de una representación gráfica de la dispersión en las figuras 11 A y 11 B. Para la figura 11 A, los puntos del cuadrado A representan los eventos de las partículas de látex, y en 11 B, el círculo B representa eventos de partículas de látex. Los datos de la representación gráfica de la dispersión podrían estar representados por cualquier par de los hasta cuatro detectores, y la duración del vuelo.

Si los reactivos usados para crear esta dilución usan un colorante de tinción de ARN, tal como azul de metileno nuevo, los datos pueden ser analizados adicionalmente mirando únicamente las porciones de eritrocitos, C, en las Figuras 10 A - 10 D para evaluar los reticulocitos. Los histogramas de dichos análisis se muestran en las figuras 14 A y 14 B, y se muestra una representación gráfica de la dispersión en la Figura 15. La Figura 15 muestra una población calculada del 1,72%, que son reticulocitos. Esto se compara favorablemente con un procedimiento de referencia del manual 1,60% de recuento de reticulocitos.

Después de contar y clasificar satisfactoriamente los eritrocitos, reticulocitos, plaquetas y látex, las agujas 11 y 12 son retiradas del consumible 61. El carro 70 mueve la muestra de sangre completa de forma que se posicione debajo de las agujas 11 y 12. Moviendo el motor 81, las agujas perforan el septo del tubo de sangre completa, y continúan penetrando en el tubo hasta que ambas agujas 11 y 12 entran en contacto con la superficie de la sangre. Esto asegura que el orificio de la aguja hidráulica 11 esté completamente sumergido, pero que el orificio de la aguja de purga 12 no lo esté. Abriendo la válvula 3, y moviendo la jeringa 6, se hace que la sangre sea succionada dentro de la punta de la aguja 11. Idealmente, se aspirarán 100 microlitros para esta porción. Entonces se cierra la válvula 3. Entonces se retiran las agujas 11 y 12 de la muestra de sangre completa del paciente. Según se retiran las agujas 11 y 12 a través del septo, las agujas son limpiadas casi completamente por el septo. Ahora el carro 70 posiciona el tubo consumible 61 bajo las agujas 11 y 12. Moviendo el motor 81, las agujas 11 y 12 perforan el septo del tubo consumible 61, y penetran en el tubo hasta que ambas agujas 11 y 12 entran en contacto con la superficie de la disolución.

Se abren las válvulas 5 y 3, mientras que la jeringa 7, que está llena con el diluyente del sistema, comienza a dispensar. Esto empuja los 100 microlitros de sangre a través de la punta de la aguja 11. Un volumen de fluido envolvente sigue a la sangre completa hacia dentro del consumible, que ahora está representado por 62. Durante la dispensación, el motor 81 ha movido las agujas hacia arriba para evitar que el orificio de la aguja 12 entre en contacto con la disolución. Ahora se extraen las agujas 11 y 12 del tubo consumible 62, y el carro 70 se mueve a las posiciones de la ranura C de la figura 7, que contiene un tubo de reactivo de lisado, debajo de las agujas 11 y 12. Moviendo el motor 81, las agujas 11 y 12 perforan el septo del tubo de lisado, y continúan penetrando en el tubo hasta que ambas agujas 11 y 12 entran en contacto con la superficie del lisado. Abriendo la válvula 3, y moviendo la jeringa 6 succiona el lisado dentro de la punta del aguja 11. Idealmente, se aspirarán 100 microlitros de lisado para esta porción, que a continuación está seguido por un poco de aire. Retirando la aguja 11 de la disolución, y moviendo después la jeringa 6, se crea este hueco de aire. Entonces se cierra la válvula 3. Entonces se retiran las agujas 11 y 12 del tubo de lisado. Según se retiran las agujas a través del septo, las agujas son limpiadas casi completamente por el septo. El carro 70 posiciona el tubo consumible 62 bajo las agujas 11 y 12. Entonces se abren las válvulas 5 y 3 mientras que la jeringa 7, que está llena con el diluyente del sistema, comienza a dispensar. Esto empuja los 100 microlitros de lisado a través de la punta de la aguja 11. Un volumen de fluido envolvente sigue a esto en el consumible, que ahora está representado por 63. Durante la dispensación, el motor 81 ha movido las agujas hacia arriba, de forma que se evite que el orificio del aguja 12 entre en contacto con la disolución.

La disolución del tubo consumible 63 es bastante homogénea, pero para asegurar la homogeneidad se cierran las válvulas 3 y 5, y se extraen las agujas de 63, que entonces se mueve a la posición de mezcla debajo de 80, y se mezcla mediante centrifugación, según se describió anteriormente. Durante este proceso se abren las válvulas 3 y 5, y la jeringa 7 crea un espacio de aire en la punta de la aguja.

El tubo consumible 63 se coloca debajo de las agujas 11 y 12. Moviendo el motor 81, las agujas 11 y 12 perforan el septo del tubo consumible 63, y penetran en el tubo hasta que ambas agujas 11 y 12 entran en contacto con la superficie de la disolución. Entonces la jeringa 7 aspira un volumen conocido de disolución en la punta de la aguja 11. Entonces las agujas 11 y 12 se retiran de la disolución, pero no se extraen completamente del tubo consumible 61, mediante el motor 81. Esto crea un condensado del lisado de sangre completa en la aguja 11. La jeringa 7 succiona este condensado del lisado de sangre completa a través del módulo de HGB 10, donde se evalúa su absorción a cuatro longitudes de onda de luz separadas. En este caso los eritrocitos han sido lisados, liberando la hemoglobina de las células. Los datos de absorción pueden mostrarse en la figura 19 A si se usó cianuro en el agente de lisado, en la figura 19 B si sólo se usó un agente lítico, y en la figura 21 si la lisis celular se produjo en presencia de una tinción de reticulocitos. El volumen de condensado también puede evaluarse aquí evaluando los valores de absorción de los canales detectores, que cambian según pasan a su través los espacios de aire de cada lado del condensado.

La jeringa 7 continúa succionando el condensado hasta pasar la válvula 3, y cerca de la válvula 5. La válvula 3 se cierra y la válvula 2 se abre, punto en el cual la jeringa 7 revierte su dirección y empuja el condensado través de la válvula 2, hasta la punta del conjunto de la célula de flujo 20.

Entonces la válvula 2 se cierra, y la válvula 4 se abre, lo que permite rellenar las jeringas 6 y 7 desde el depósito de diluyente del sistema 8. Entonces la válvula 5 se cierra, la válvula 1 se abre, y las jeringas 6 y 7 dispensan muy lentamente. La disolución envolvente de la jeringa 7 se dispensa a través de 21, y el condensado de sangre completa lisada es empujado por la jeringa 6 a través de 20. Esto forma una corriente de núcleo confinada en una envoltura de sangre completa lisada en 25, que transporta la corriente al embudo de la célula de flujo 22, donde las células son interrogadas por las fuentes de luz que emiten desde el conjunto óptico 41. Esta corriente de fluido pasa completamente a través de la célula de flujo 22, y dentro de los tubos de 23, que están fijados en la célula de flujo 22 mediante un tapón de célula de flujo 24. Este camino conduce al desecho del sistema 9.

Mientras la corriente del fluido está pasando a través de la célula de flujo 22, el conjunto óptico 41 ilumina individualmente las células de la sangre completa diluida. Las células pasan a través de un punto focal óptico 34 del láser 30, que maximiza la potencia incidente sobre las células. Este estrecho foco es generado por la lente 33. La luz efectuada por el paso de las células a través del punto 34 cambia la cantidades de luz que inciden sobre los fotodiodos 42, 43, 44 y 45. Estos cambios son capturados por la electrónica de procesamiento de señales de la figura 26, y almacenados a través de la electrónica del sistema de la figura 25. Algunos ejemplos de los datos recogidos de esta forma se muestran en las FIGS. 12 A -12 F.

La Fig. 12 A muestra datos que han sido recogidos para la señal de extinción o de pérdida de luz axial (EXT), a partir del detector 44; sin partículas de látex presentes, la 12 B muestra la misma muestra con látex presente. La 12 C muestra los datos que han sido recogidos para la señal de baja dispersión anterógrada, a partir del detector 45 sin látex presente, y la 12 D muestra la misma muestra con látex presente. La fig. 12 E muestra datos que han sido recogidos para la señal de dispersión en ángulo recto (RAS), o detector 42 sin látex presente, y la figura 12 F muestra la misma muestra con látex presente.

Para las figuras 12 A, 12 B, 12 C, 12 D, 12 E y 12 F, el pico mostrado por A representa eventos de linfocitos, el pico mostrado por B representa eventos de monocitos, y el pico mostrado por C representa eventos de granulocitos, y el pico mostrado por D representa eventos de látex. Estos mismos datos se muestran en forma de una representación gráfica de la dispersión en las figuras 13 A y 13 B. Para la figura 11 A, los puntos del círculo D representan los eventos de las partículas de látex, y en 11 B, el círculo D también representa los eventos de partículas de látex. Los datos de la representación gráfica de la dispersión podrían estar representados por cualquier par de los hasta cuatro detectores, y la duración del vuelo.

Para las muestras que contienen eosinófilos en la población de granulocitos, la separación de la subpoblación se consigue en el canal de dispersión en ángulo recto del detector 42. La Figura 16 A muestra el histograma de los datos en los que A representa linfocitos, B monocitos, C neutrófilos y D eosinófilos. La Figura 17 muestra los mismos datos que la Figura 16, en forma de representación gráfica de la dispersión. Las poblaciones rodeadas con un círculo de A representan linfocitos, B monocitos, C neutrófilos y D eosinófilos. Los datos de la representación gráfica de la dispersión podrían estar representados por cualquier par de los hasta cuatro detectores, y la duración del vuelo, pero para distinguir los eosinófilos es necesaria la dispersión en ángulo recto.

Una vez que los leucocitos han sido contados y clasificados, la jeringa 7 se carga con fluido procedente el depósito de reactivos 8, mediante la apertura de la válvula 4. La válvula 4 se cierra, 3 y 5 se abre, lo que permite que la jeringa 7 limpie las líneas de muestras retrodescargando fluido en el tubo consumible 63 a través de la aguja 11. La

aguja 12 actúa purgando el tubo a través del filtro 13 a la atmósfera. Esto rinde un tubo consumible que tiene la configuración mostrada en 64. El carro 70 se mueve ahora a su posición inicial, donde el usuario puede abrir la puerta del sistema y retirar los tubos de las ranuras A y B de la figura 7. El tubo consumible es ahora un tubo de desecho, y se desecha.

5

Otros modos operativos, junto con las mismas líneas según se describió anteriormente, podrían permitir realizar inmunoensayos mediante técnicas de aglutinación de látex. Aquí el consumible contendría látex que está recubierto con un anticuerpo, de forma que las partículas se agruparían entre sí en la presencia de un analito apropiado. Esta mezcla de látex se analizaría a través del canal óptico descrito en la Figura 4, y los datos serían evaluados para

10

buscar agrupamientos de partículas dobles o tripletes. Cuanto mayor sea la concentración de estos agrupamientos, mayor será la concentración del analito de interés.

La presente invención no pretende tener limitado su ámbito por las formas de realización específicas descritas en este documento, sino que está limitada por el ámbito de las presentes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para analizar una muestra sanguínea o una muestra de un derivado sanguíneo usando un sistema hematológico basado en citometría de flujo que comprende un sistema de detección óptico, comprendiendo el procedimiento:
- proporcionar un tubo consumible cerrado (60) teniendo en un extremo del mismo un septo que es perforable por una aguja, conteniendo dicho tubo:
- 10 un número conocido de partículas de referencia, teniendo cada una de dichas partículas de referencia un diámetro predeterminado y siendo distinguibles de las células objetivo de la muestra sanguínea o de la muestra del derivado sanguíneo basándose en al menos una medición óptica de una medición de extinción, una medición de dispersión anterógrada de la luz de ángulo pequeño, una medición de la dispersión de ángulo recto, una medición de la dispersión de la luz de ángulo elevado y una medición de la duración de vuelo; y
- 15 al menos un reactivo para permitir la determinación de la composición celular de la muestra sanguínea o muestra de derivado sanguíneo, comprendiendo el al menos un reactivo al menos un colorante;
- 20 perforar el septo con una aguja (11) y alicuotar una primera porción de sangre completa y un volumen conocido de disolución envolvente en el tubo consumible cerrado (60) a través de la aguja (11), formando la primera porción de sangre completa, el volumen conocido de disolución envolvente, las partículas de referencia y el al menos un reactivo, una primera disolución;
- 25 succionar un volumen conocido de la primera disolución desde el tubo consumible cerrado (60) en el sistema de detección óptico a través de la aguja (11);
- 30 usar el sistema de detección óptico para medir la dispersión de la luz y la absorción de la luz por parte de eritrocitos, plaquetas y partículas de referencia individuales dentro del volumen conocido de la primera disolución, y para medir la absorción de luz del al menos un colorante dentro del volumen conocido de la primera disolución;
- 35 alicuotar una segunda porción de sangre y un volumen de disolución envolvente en el tubo consumible cerrado (60) a través de la aguja (11);
- 40 alicuotar una alícuota de lisado en el tubo consumible (60) a través de la aguja (11), formando el contenido del tubo consumible cerrado (60) y el lisado, una segunda disolución;
- 45 succionar un volumen conocido de la segunda disolución en el sistema de detección óptico a través de la aguja (11);
- usar el sistema de detección óptico para medir la dispersión de la luz y la absorción de la luz por parte de los leucocitos, las partículas de referencia y el al menos un colorante individuales dentro del volumen conocido de la segunda disolución.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho diámetro de cada una de dichas partículas de referencia está entre 1 micrómetro y 10 micrómetros.
3. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que, cuando la muestra sanguínea o la muestra del derivado sanguíneo está en dicho tubo consumible cerrado (60), dicho número conocido de partículas de referencia está entre aproximadamente 10^3 y aproximadamente 10^5 por μl de una disolución formada por dicho reactivo y dicha muestra sanguínea o muestra de derivado sanguíneo.
4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas partículas de referencia se eligen del grupo formado por partículas de látex, células fijadas, polen, vidrio y coloides grandes.
5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho reactivo es eficaz para permitir que dicho sistema hematológico basado en citometría de flujo cuente al menos uno de eritrocitos y reticulocitos en una muestra sanguínea o muestra de derivados sanguíneos.
6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho reactivo incluye un reactante capaz de teñir el ácido ribonucleico [ARN] en reticulocitos.
7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicho reactante capaz de teñir el ácido ribonucleico [ARN] en reticulocitos es azul de metileno nuevo.

8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que, cuando la muestra sanguínea o la muestra del derivado sanguíneo está en dicho tubo consumible cerrado (60), dicho azul de metileno nuevo está presente a una concentración de entre aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 0,5 gramos por litro de una disolución formada por dicho reactivo y dicha muestra sanguínea o muestra del derivado sanguíneo.
- 5
9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho reactivo incluye un reactante capaz de modificar la forma de los eritrocitos, pero que por lo demás deja los eritrocitos prácticamente intactos.
- 10
10. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicho reactante capaz de modificar la forma de los eritrocitos, pero que por lo demás deja los eritrocitos prácticamente intactos, es Plurafac-A-39-Pric.
11. El procedimiento según la reivindicación 10, en el que, cuando la muestra sanguínea o la muestra de derivado sanguíneo está en dicho tubo consumible cerrado (60), dicho Plurafac-A-39-Pric está presente a una concentración de entre 0,1 y 0,6 gramos por litro de una disolución formada por dicho reactivo y dicha muestra sanguínea o muestra de derivado sanguíneo.
- 15
12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho reactivo incluye azul de metileno nuevo y dicho Plurafac-A-39-Pric.
- 20
13. El procedimiento según la reivindicación 12, en el que, cuando la muestra sanguínea o la muestra de derivado sanguíneo está en dicho tubo consumible cerrado (60), dicho azul de metileno nuevo está presente a una concentración de entre 0,1 y 0,5 gramos por litro de una disolución formada por dicho reactivo y dicha muestra sanguínea o muestra del derivado sanguíneo, y dicho Plurafac-A-39-Pric está presente a una concentración de entre 0,1 y 0,6 gramos por litro de una disolución formada por dicho reactivo y dicha muestra sanguínea o muestra de derivado sanguíneo.
- 25
14. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho reactivo incluye:
- 30
- a) azul de metileno nuevo, a una concentración de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,5 gramos por litro;
- b) Plurafac-A-39-Pric, a una concentración de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,6 gramos por litro;
- 35
- c) bicarbonato sódico, a una concentración de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 10,0 gramos por litro;
- d) cloruro sódico, a una concentración de entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 5,0 gramos por litro;
- 40
- e) Tricina, a una concentración de entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 5,0 gramos por litro;
- f) EDTA disódico, a una concentración de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 3,0 gramos por litro;
- 45
- g) etilparabeno a una concentración de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,5 gramos por litro; y
- 50
- h) metilparabeno a una concentración de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,3 gramos por litro,
- en el que cada una de dichas concentraciones es la concentración por litro de una disolución formada por dicha muestra sanguínea o muestra de derivado sanguíneo y dicho reactivo, cuando dicha muestra sanguínea o muestra de derivado sanguíneo está en dicho tubo consumible cerrado (60).
- 55
15. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho reactivo es eficaz para permitir la medición de al menos uno de recuento de leucocitos, diferencial de leucocitos en cinco partes y niveles de hemoglobina.
- 60
16. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho reactivo incluye saponina, a una concentración de entre 6,0 y 20,0 gramos por litro de la disolución formada por dicho reactivo y dicha muestra sanguínea o muestra del derivado sanguíneo cuando dicha muestra sanguínea o muestra de derivado sanguíneo está en dicho tubo consumible cerrado (60).
- 65
17. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente:

- 5
- a) sulfato sódico, a una concentración de entre 10,0 y 16,0 gramos por litro;
 - b) EDTA disódico, a una concentración de entre 0,5 y 3,0 gramos por litro;
 - c) un conservante ProClin 300, a una concentración de entre 0,1 y 1,0 gramos por litro; y
 - d) un conservante germabox II, a una concentración de entre 0,5 y 3,0 ml por litro,
- 10 en el que cada una de dichas concentraciones es la concentración por litro de una disolución formada por dicha muestra sanguínea o muestra de derivado sanguíneo y dicho reactivo, cuando dicha muestra sanguínea o muestra de derivado sanguíneo está en dicho tubo consumible cerrado (60).
- 15 18. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas partículas son partículas de látex.
19. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho diámetro de cada una de dichas partículas es de $4,0 \pm 0,5$ micrómetros.
- 20 20. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que, cuando dicha muestra sanguínea o muestra de derivado sanguíneo está en dicho tubo consumible cerrado (60), dicho número conocido de partículas es de 10.000 ± 1.000 por μl de una disolución formada por dicho reactivo y dicha muestra sanguínea o muestra de derivado sanguíneo.

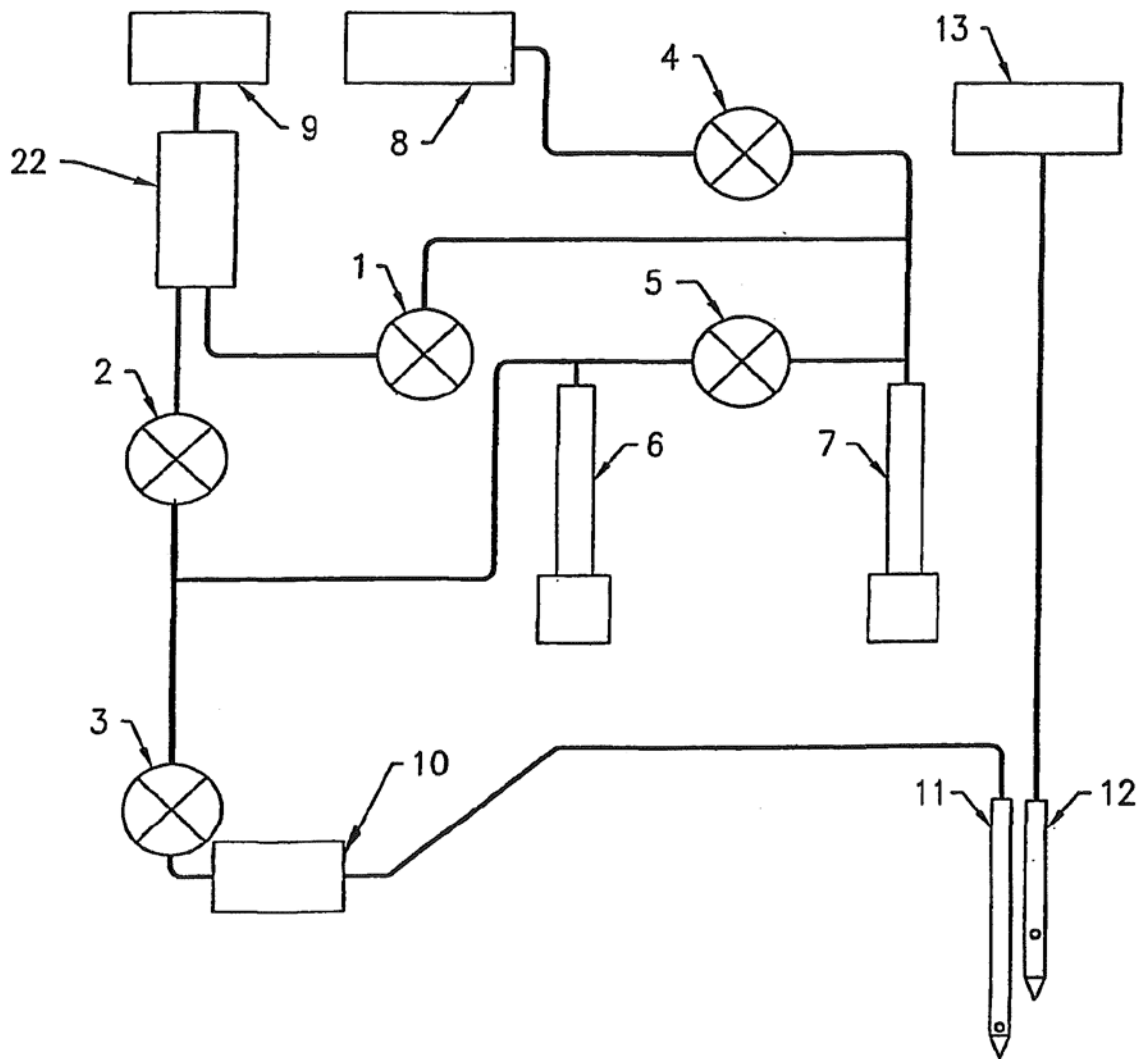


Fig. 1

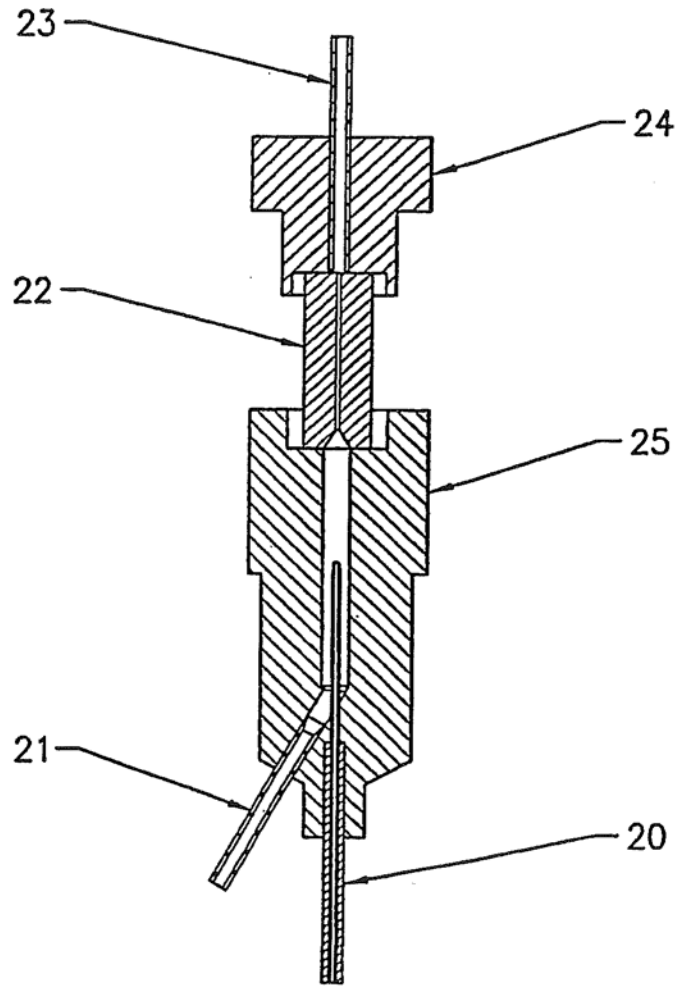


Fig. 2

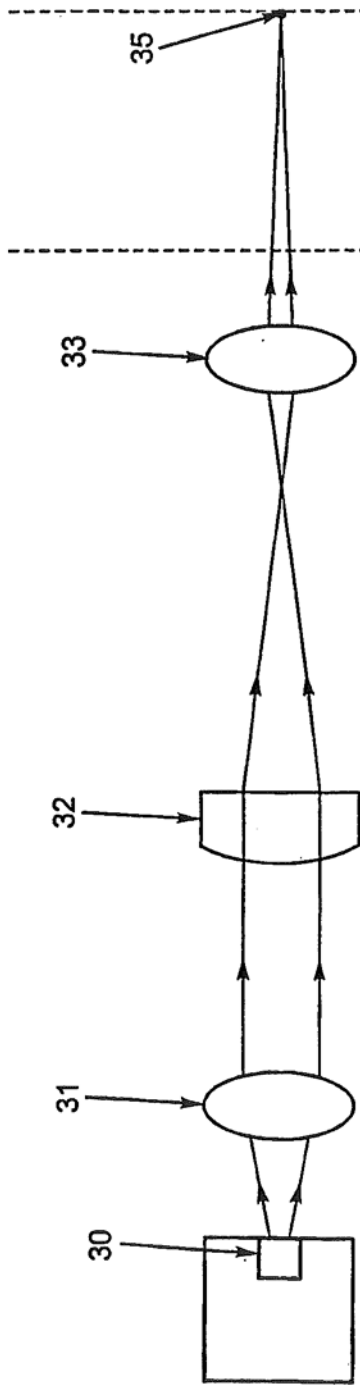


Fig. 3A

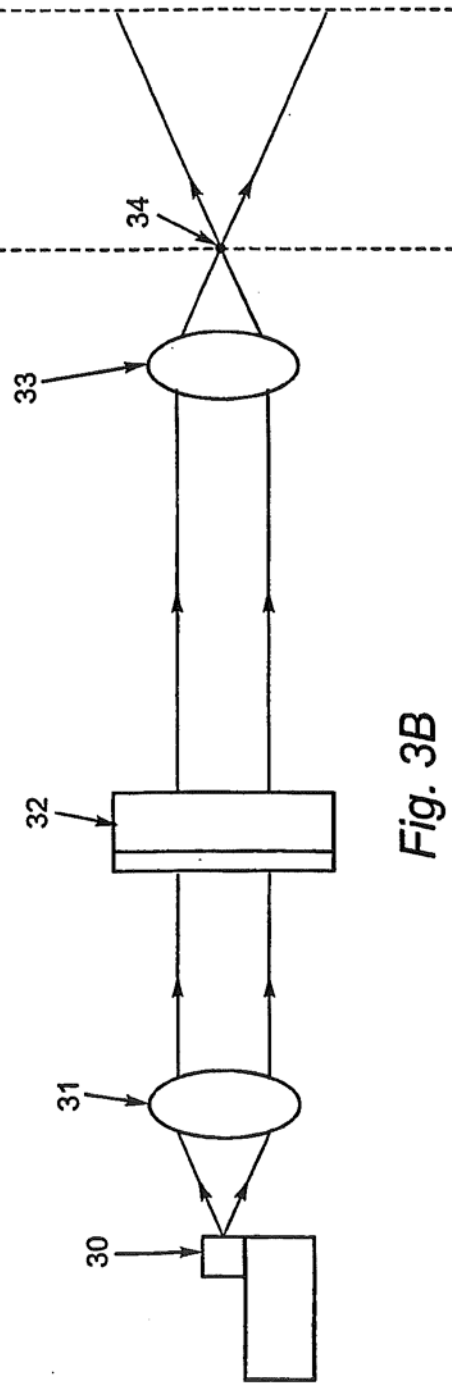


Fig. 3B

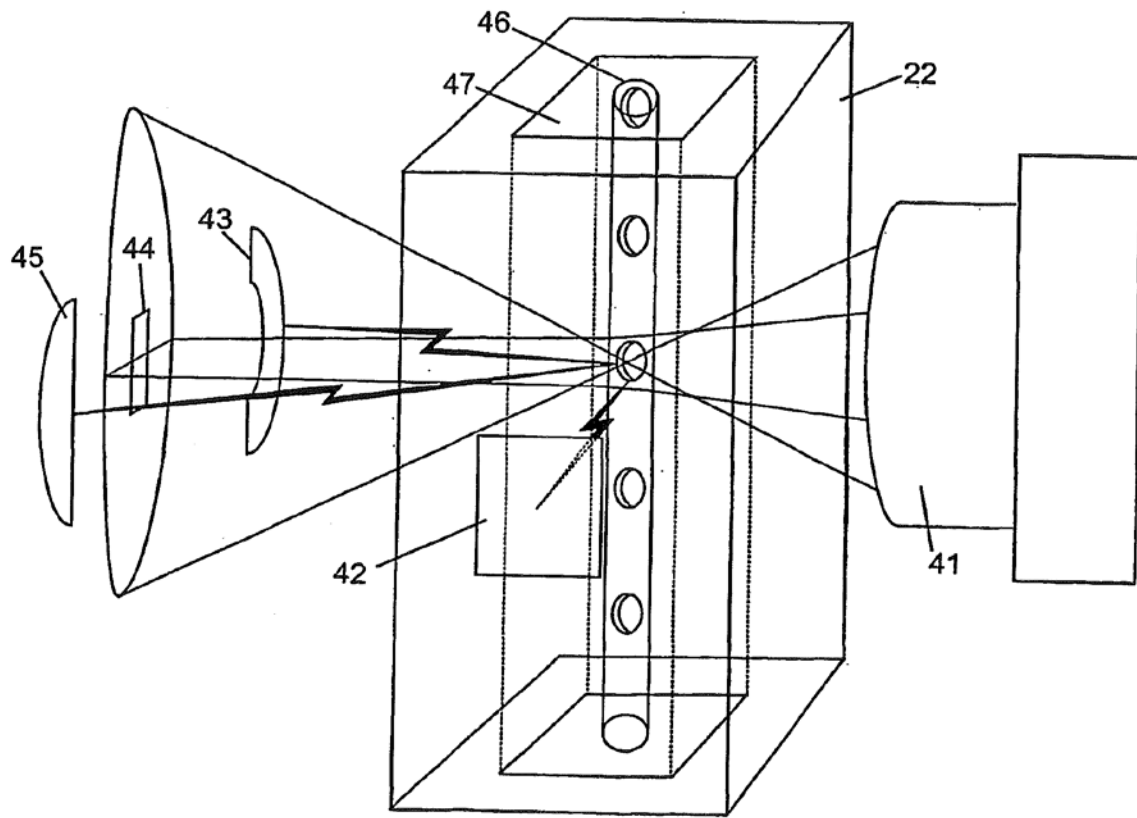


Fig. 4

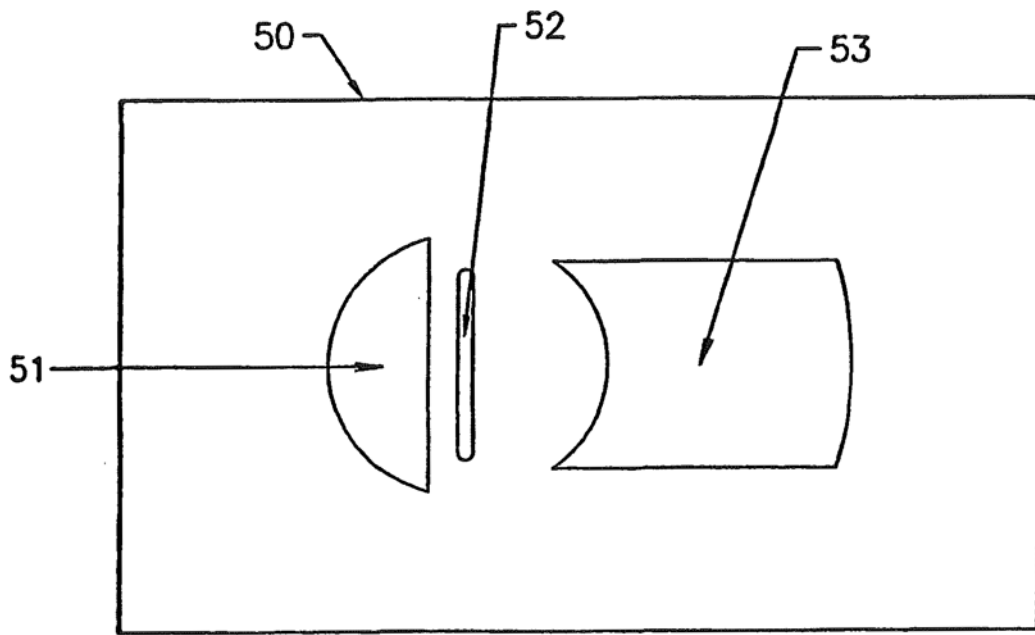


Fig. 5

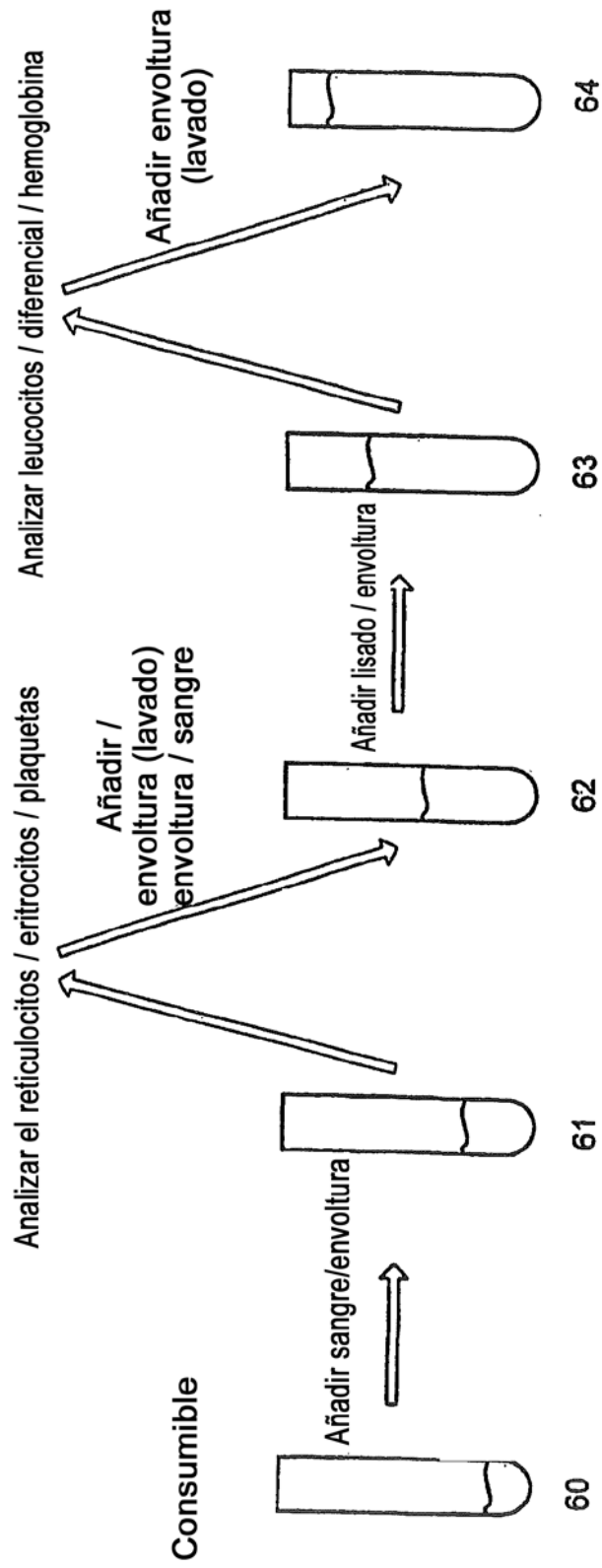


Fig. 6

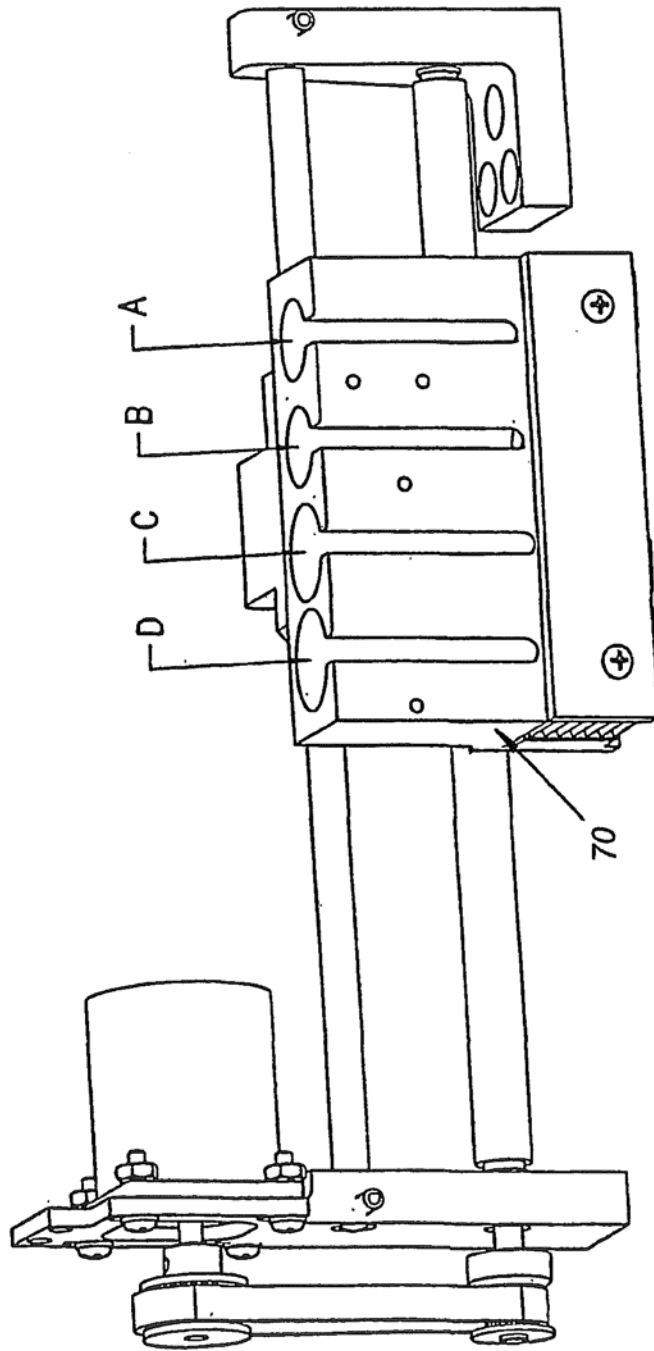


Fig. 7

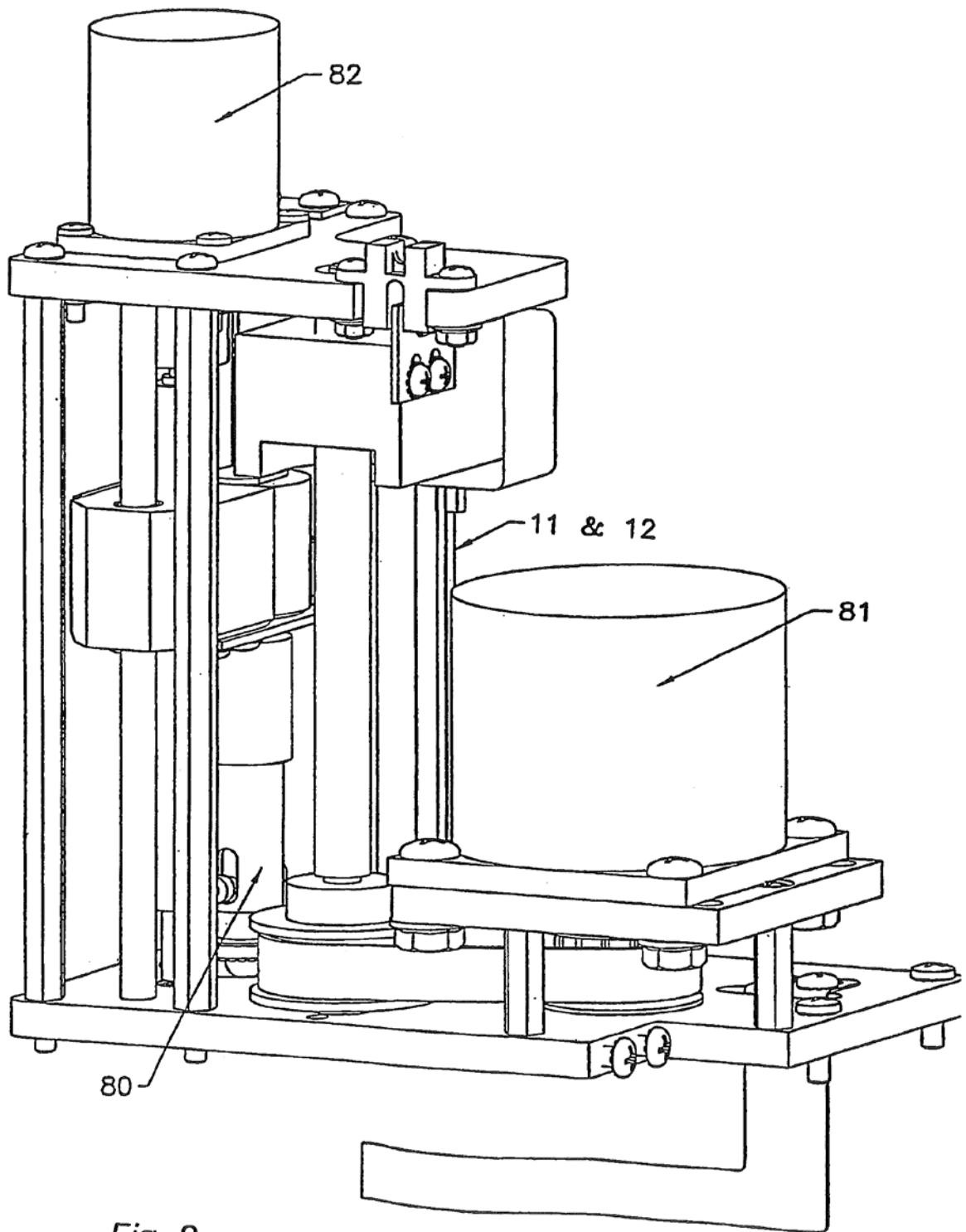


Fig. 8

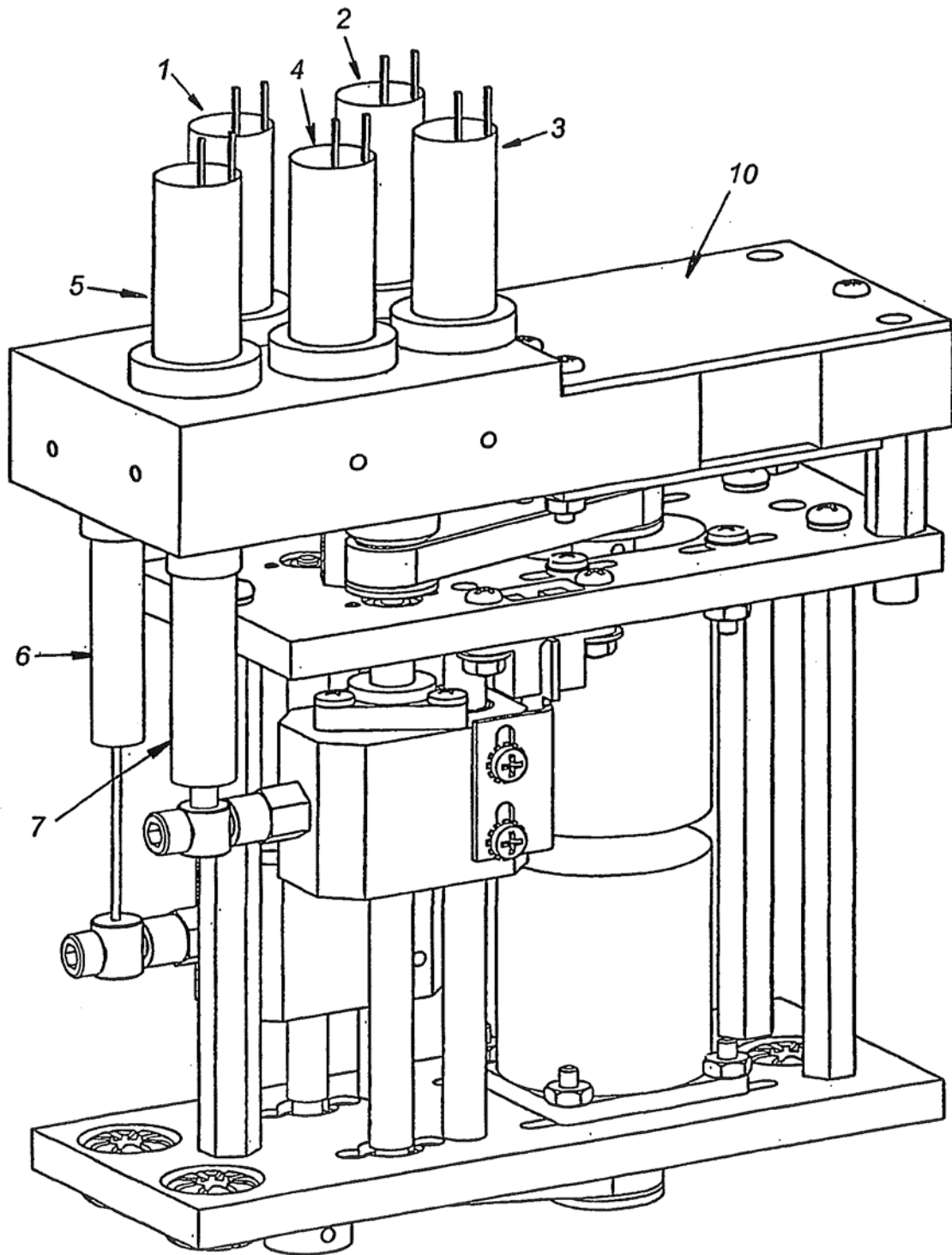


Fig. 9

FIG. 10A.

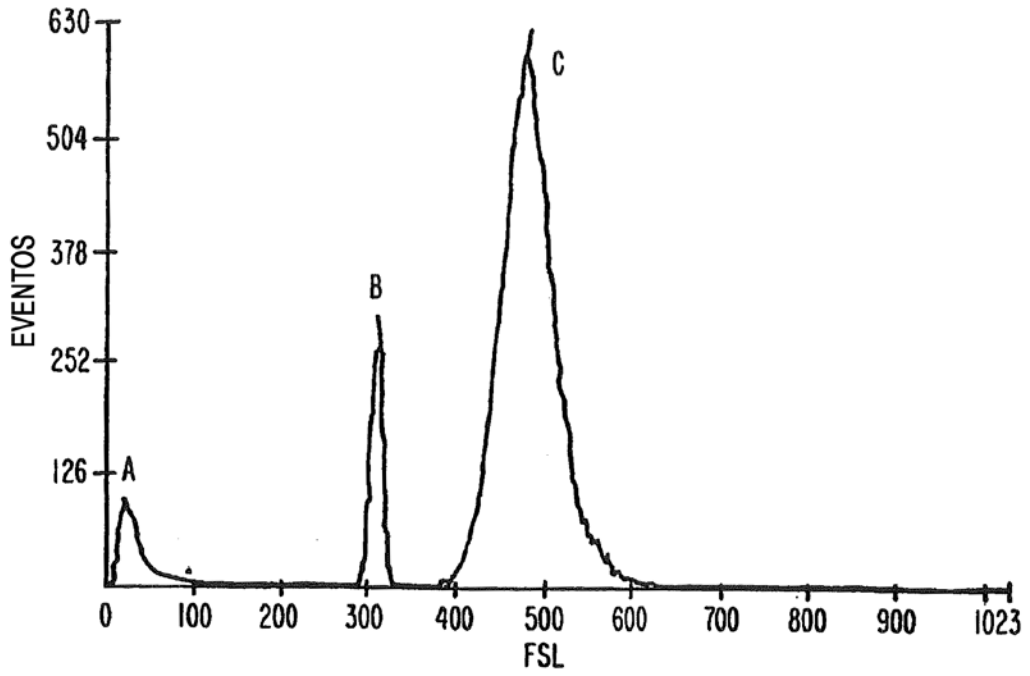


FIG. 10B

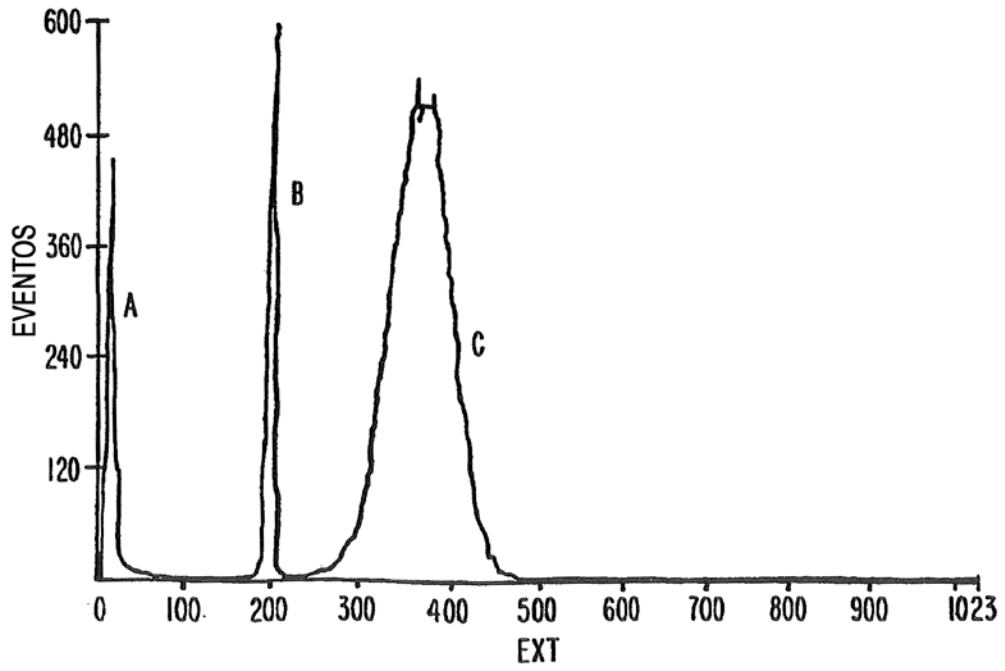


FIG. 10C.

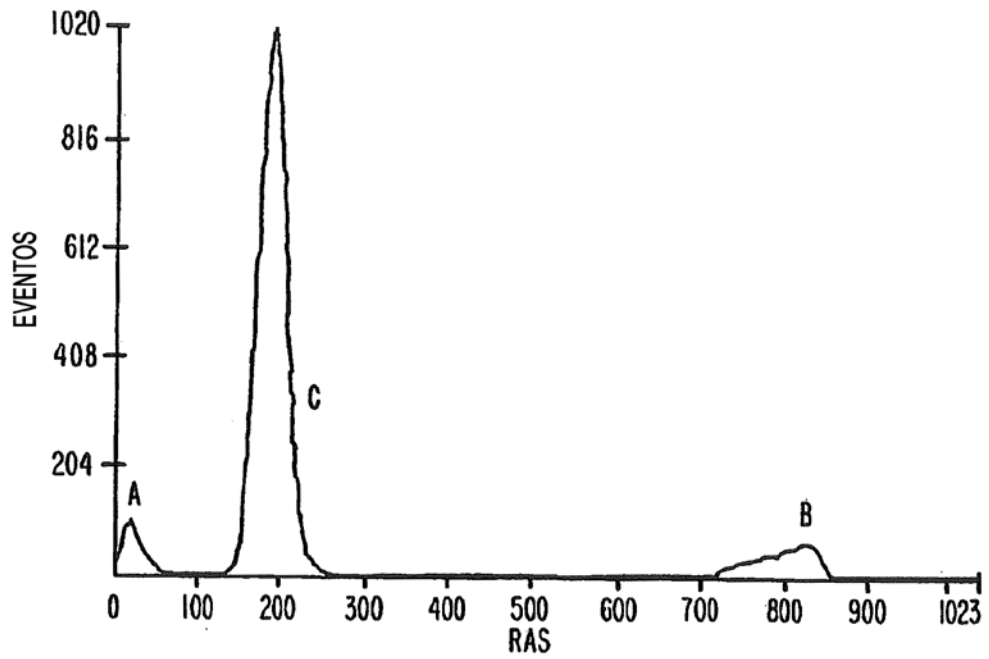


FIG. 10D.

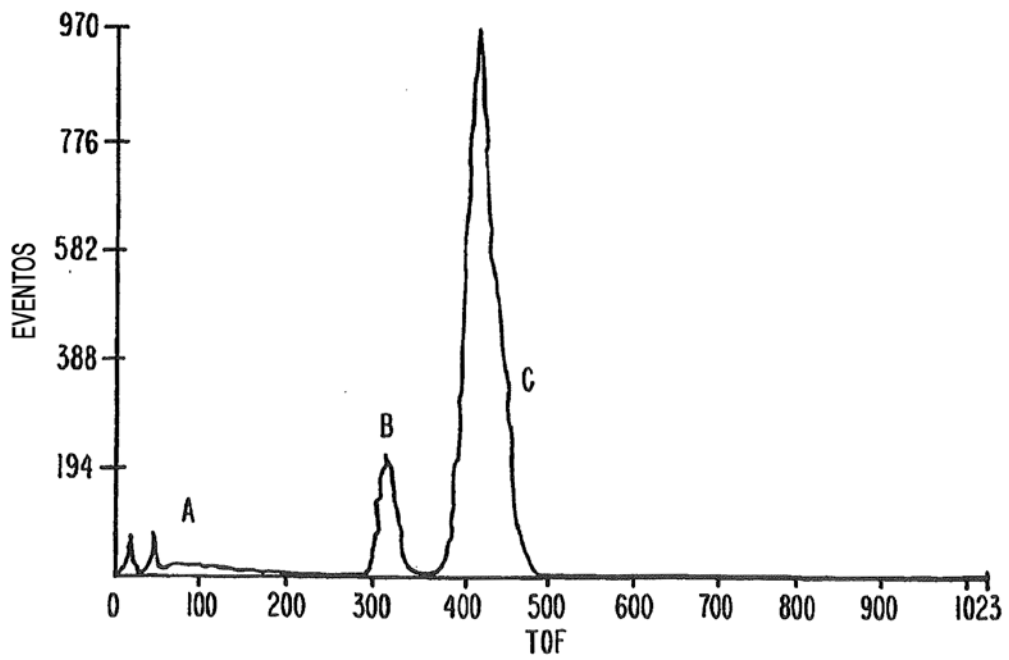


Fig.11A

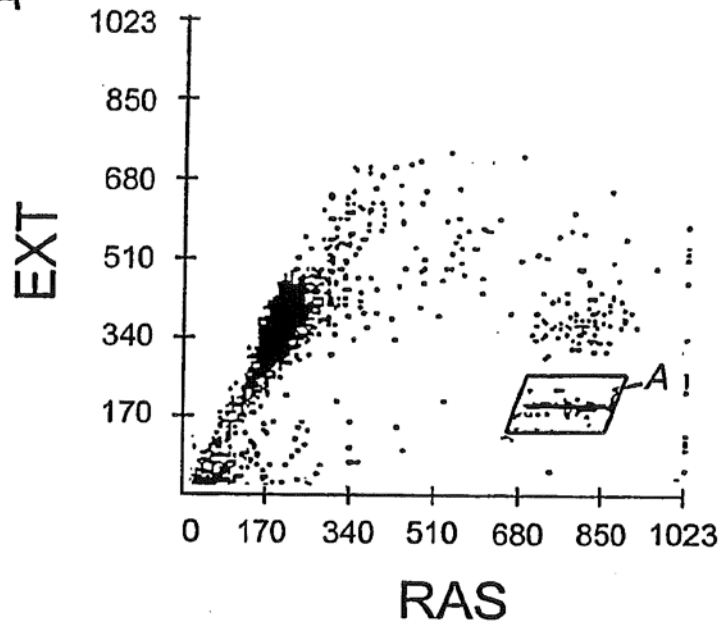


Fig.11B

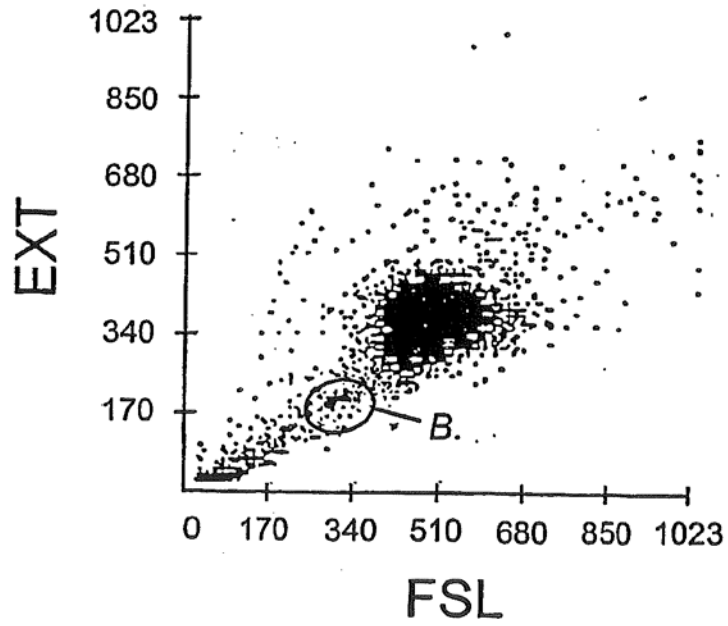


FIG. 12A.

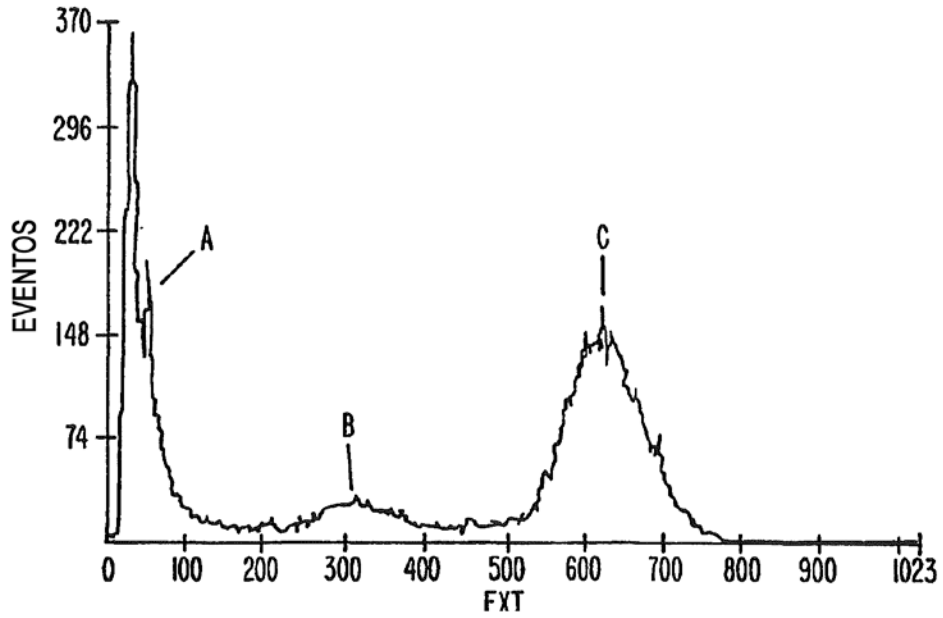


FIG. 12B.

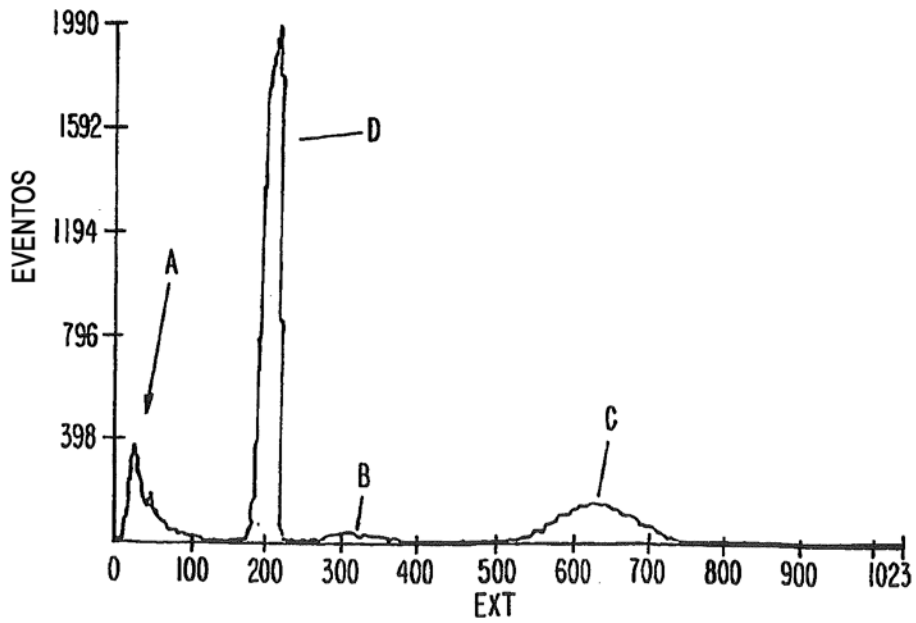


FIG. 12C.

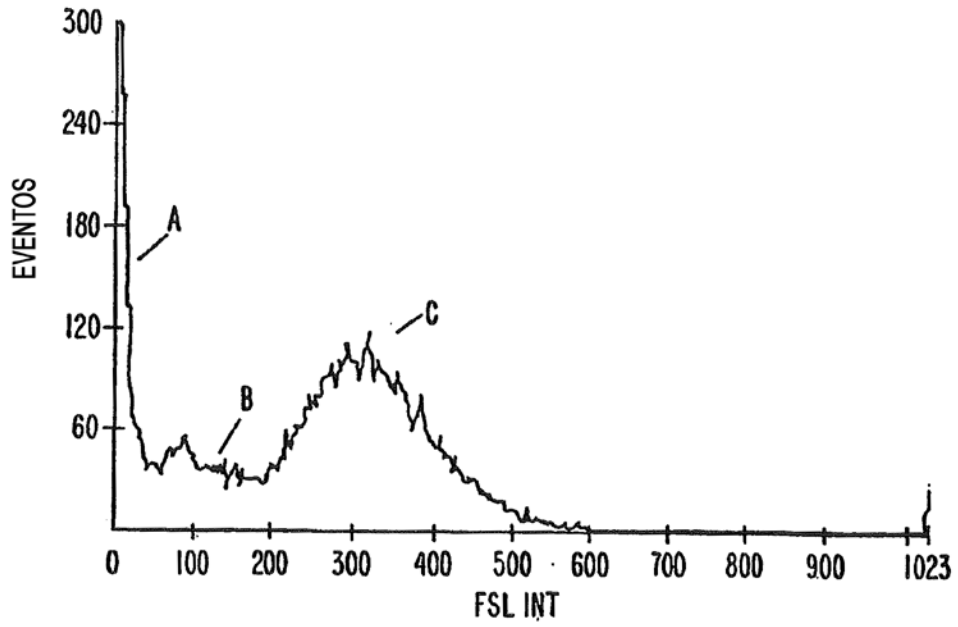


FIG. 12D.

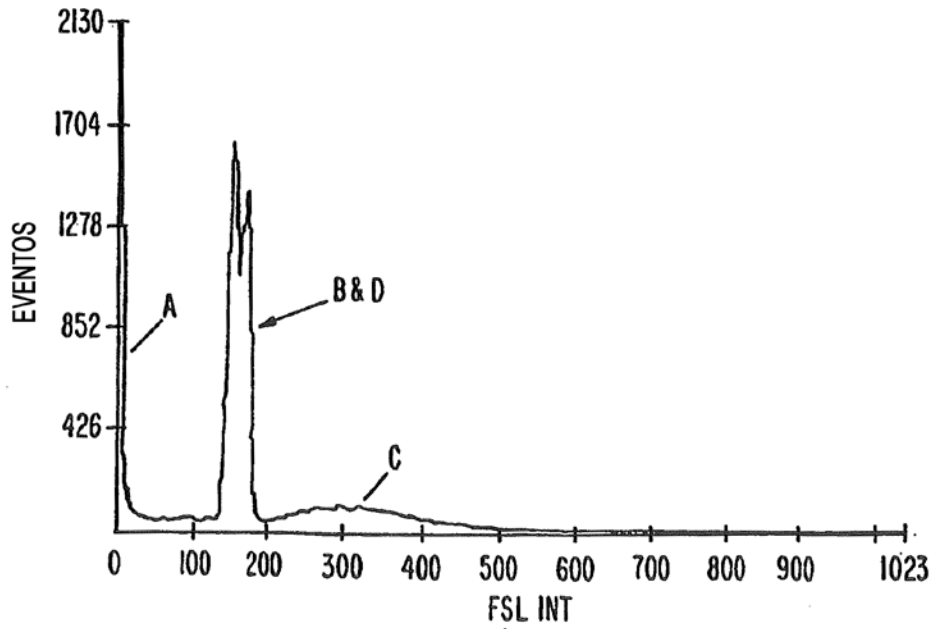


FIG. 12E.

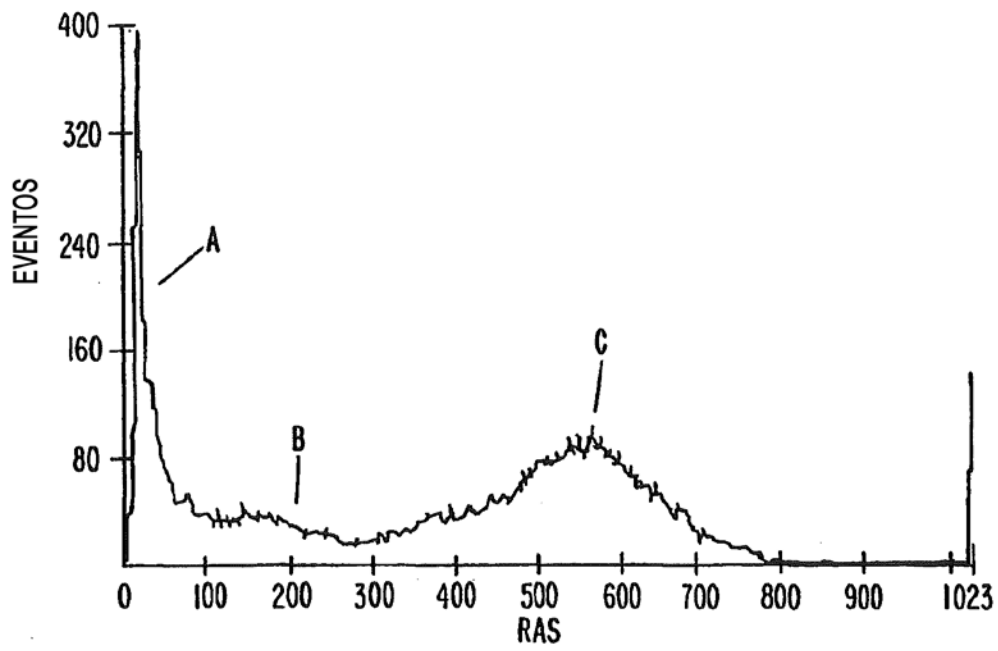


FIG. 12F.

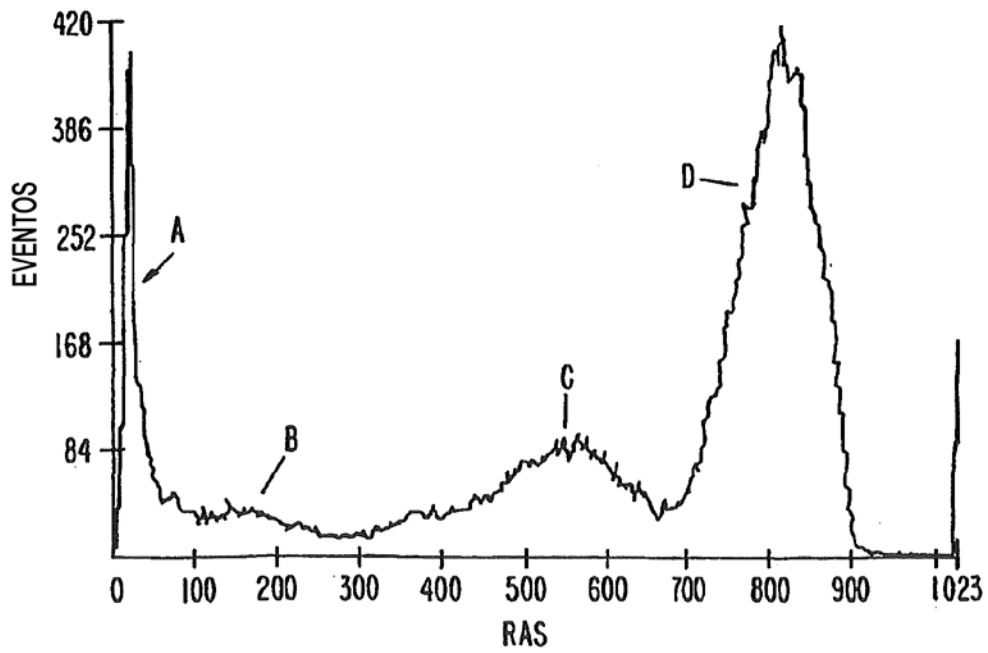


Fig.13A

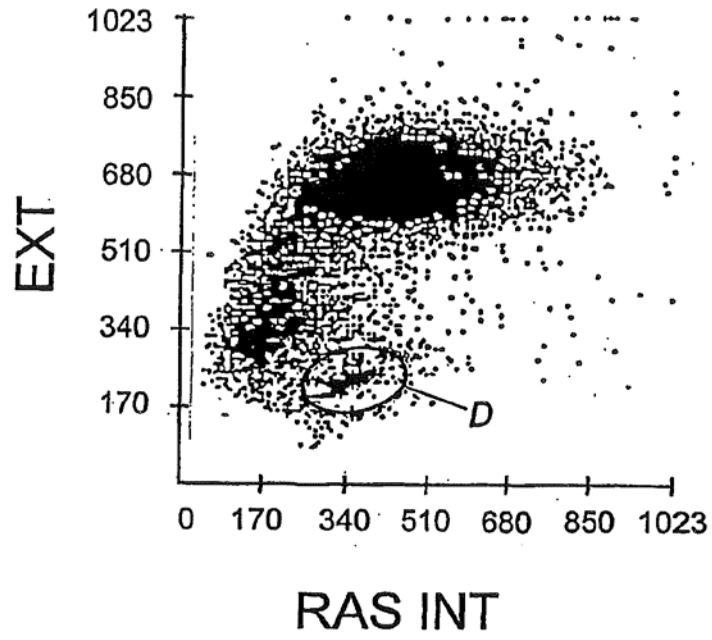


Fig.13B

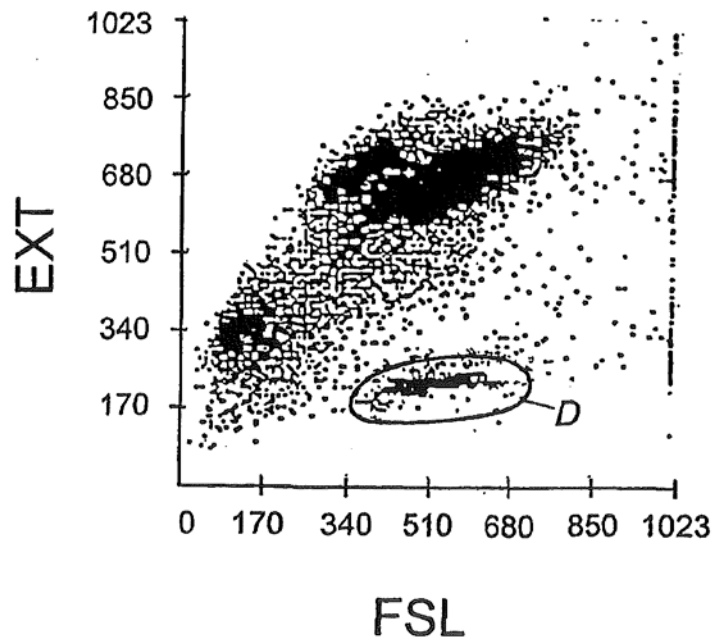


FIG. 14A.

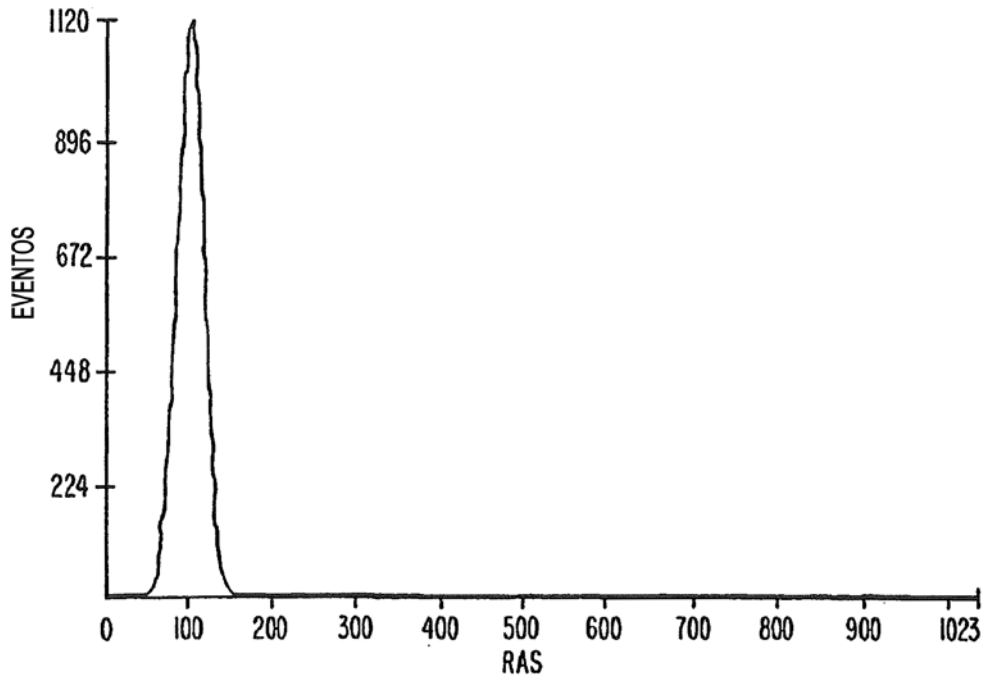
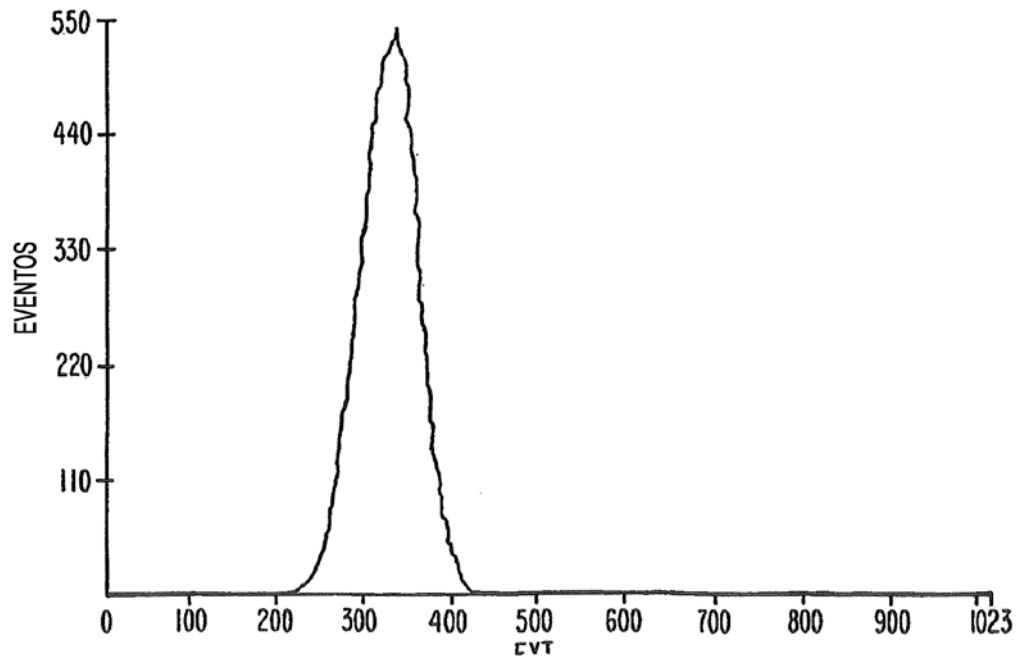


FIG. 14B.



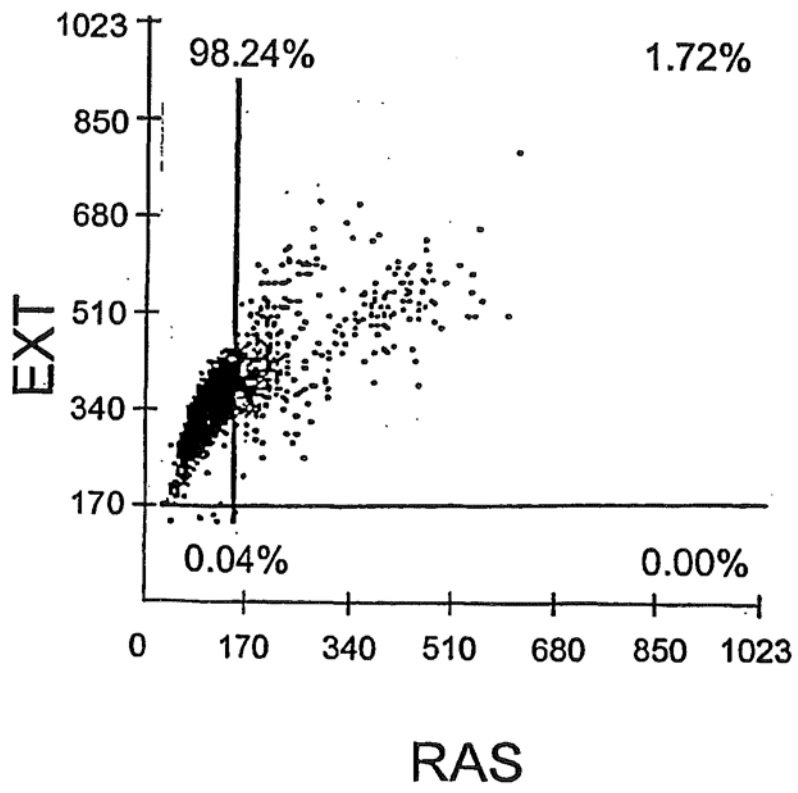


Fig.15

FIG. 16A.

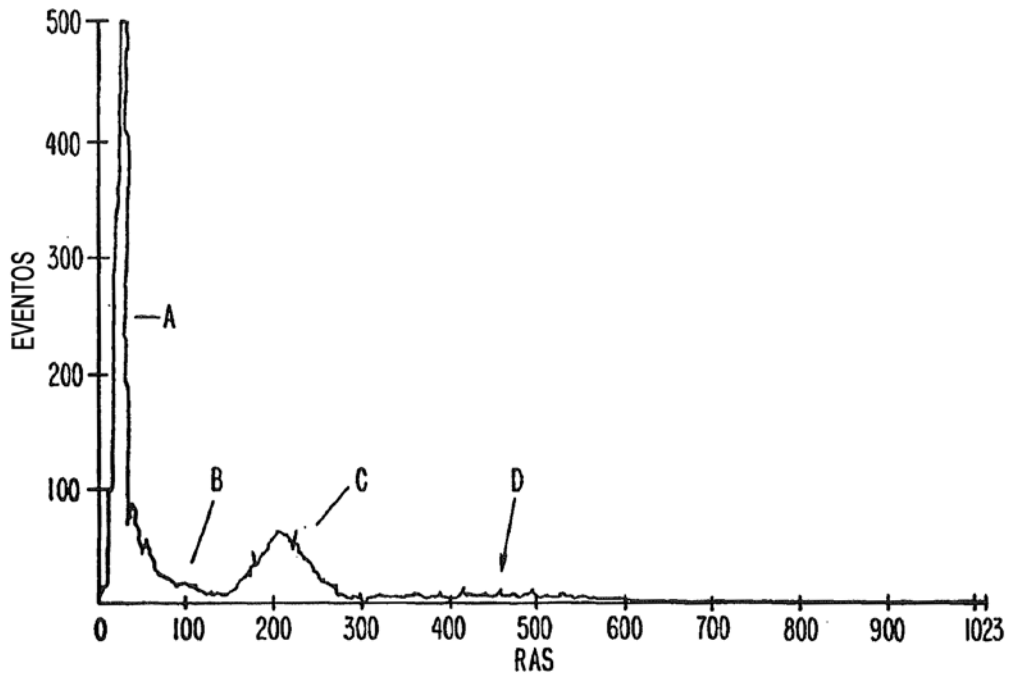
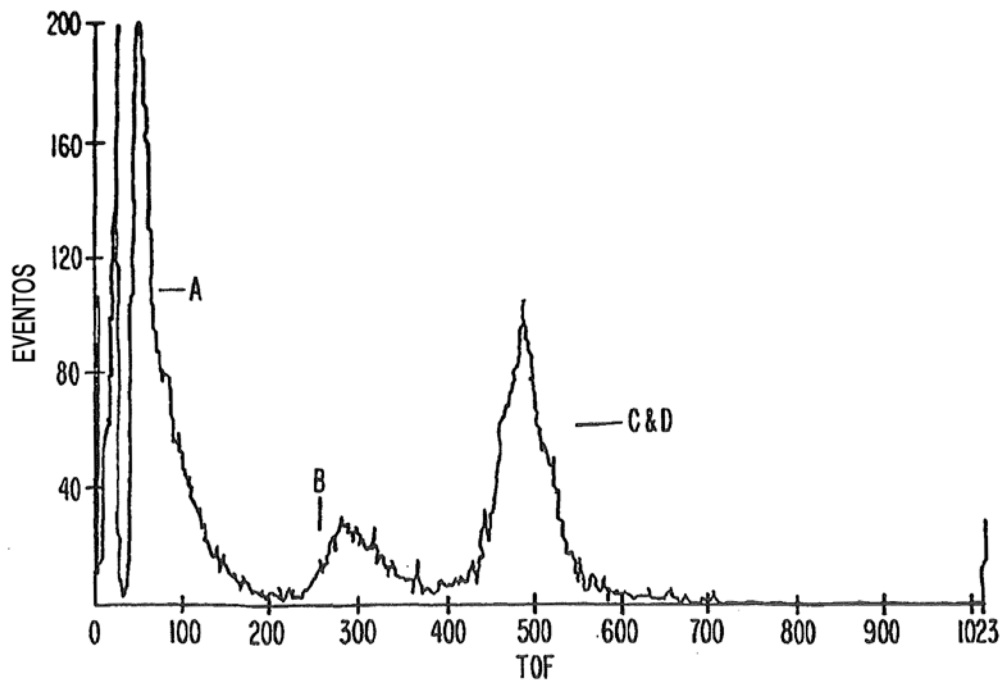


FIG. 16B.



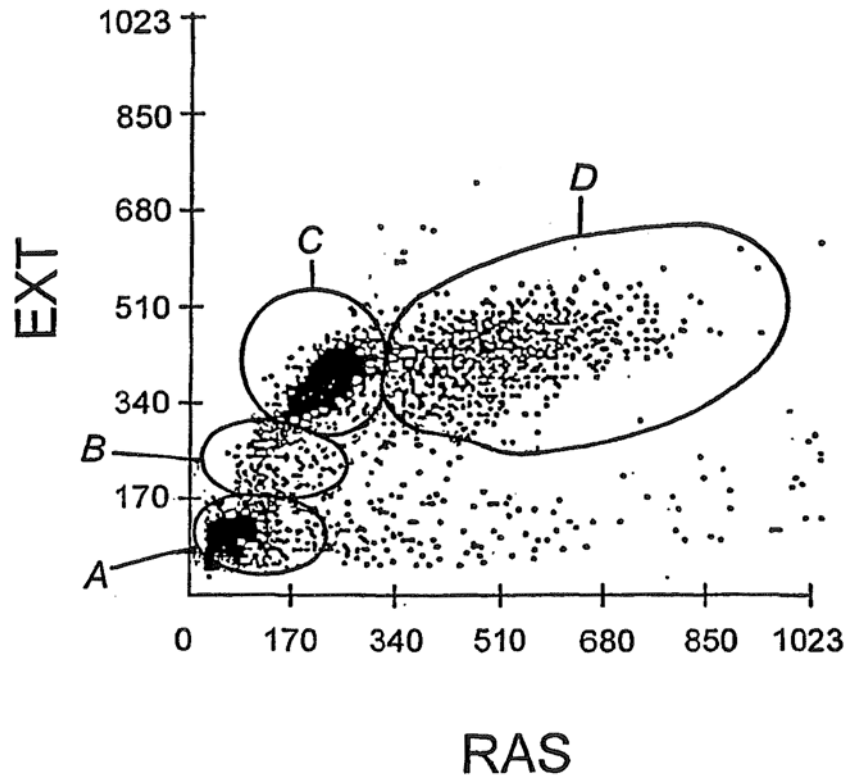


Fig.17

FIG. 18.

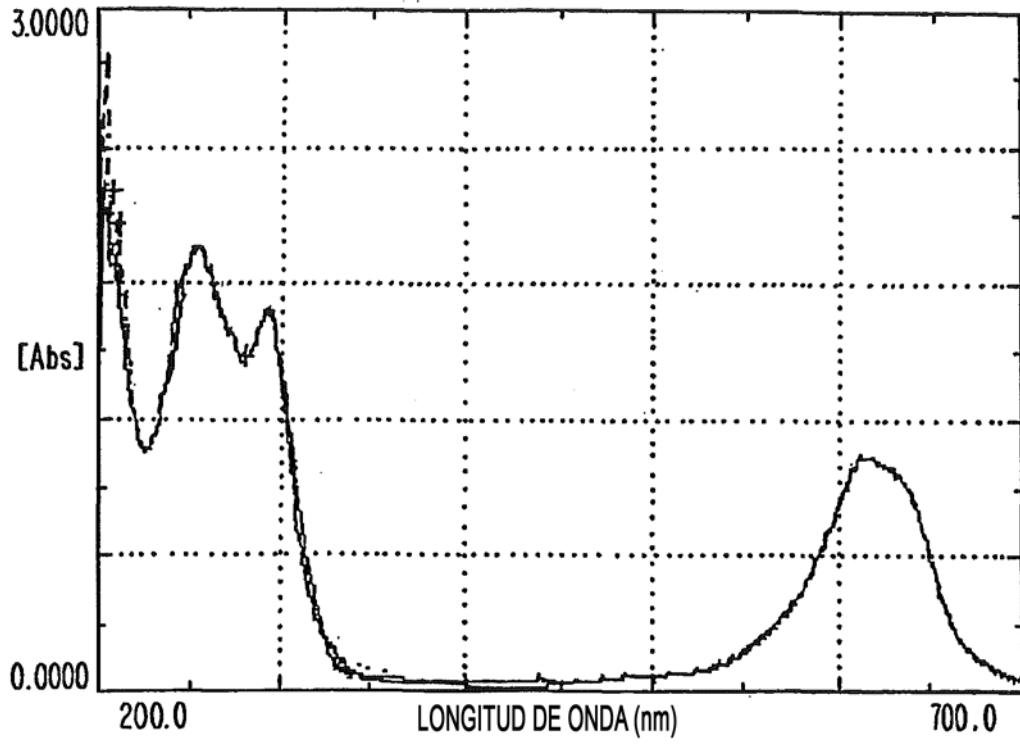


FIG. 19A.

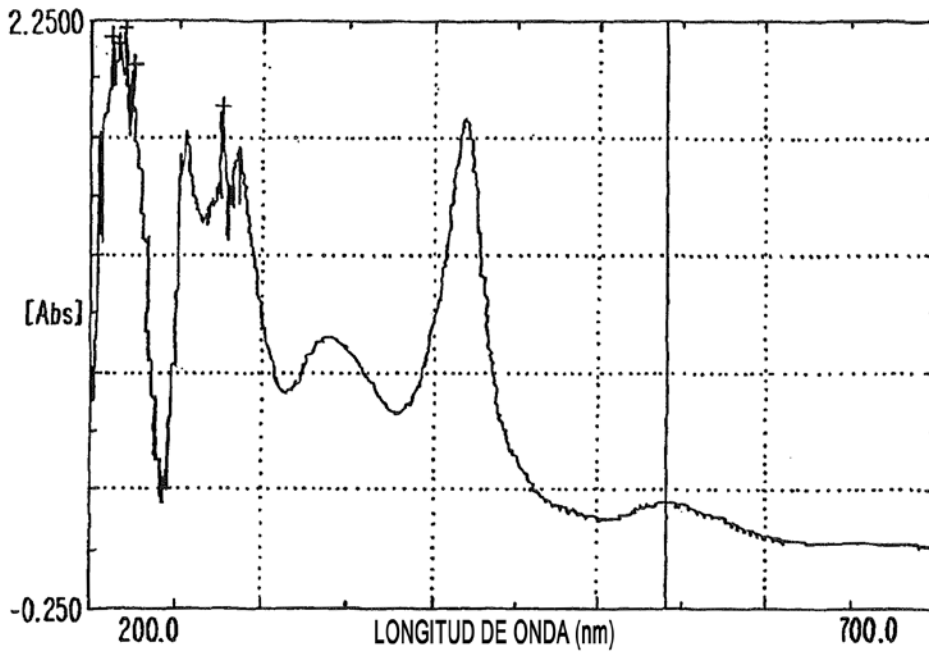


FIG. 19B.

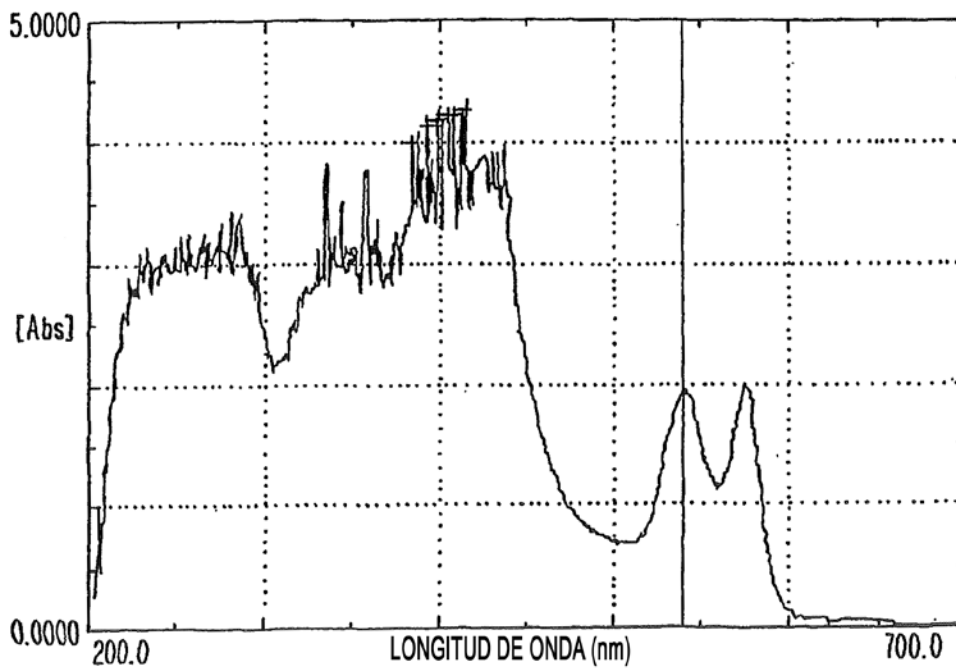


FIG. 20.

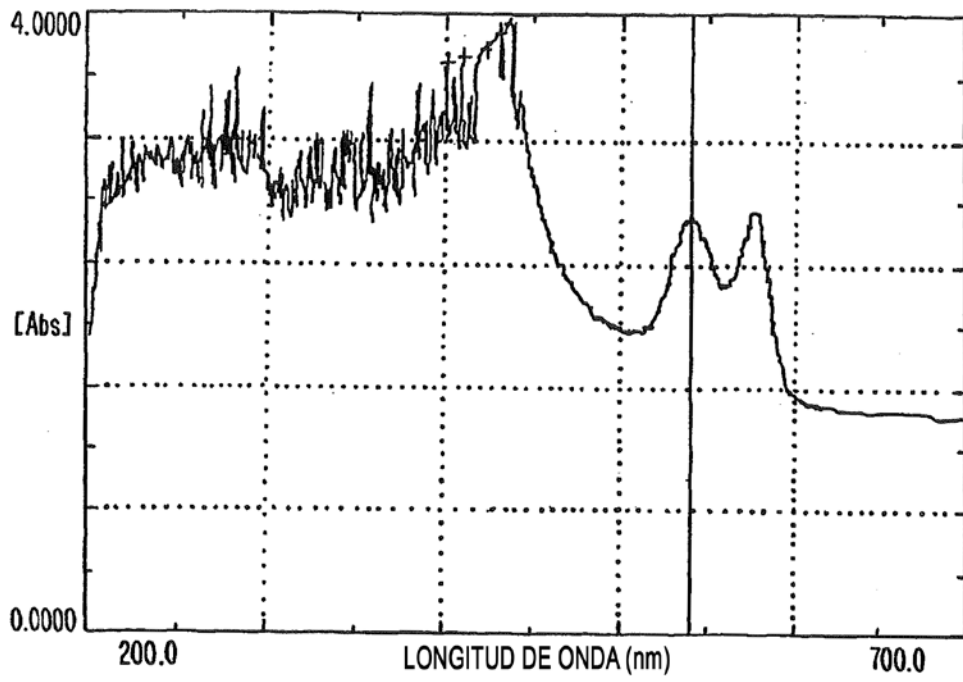


FIG. 21.

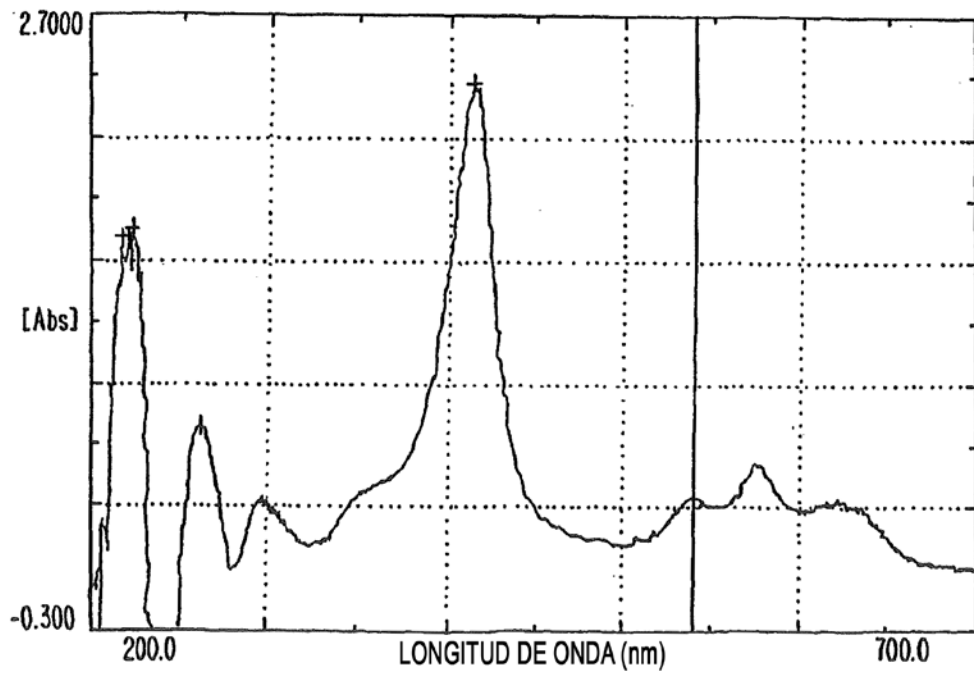


FIG. 22.

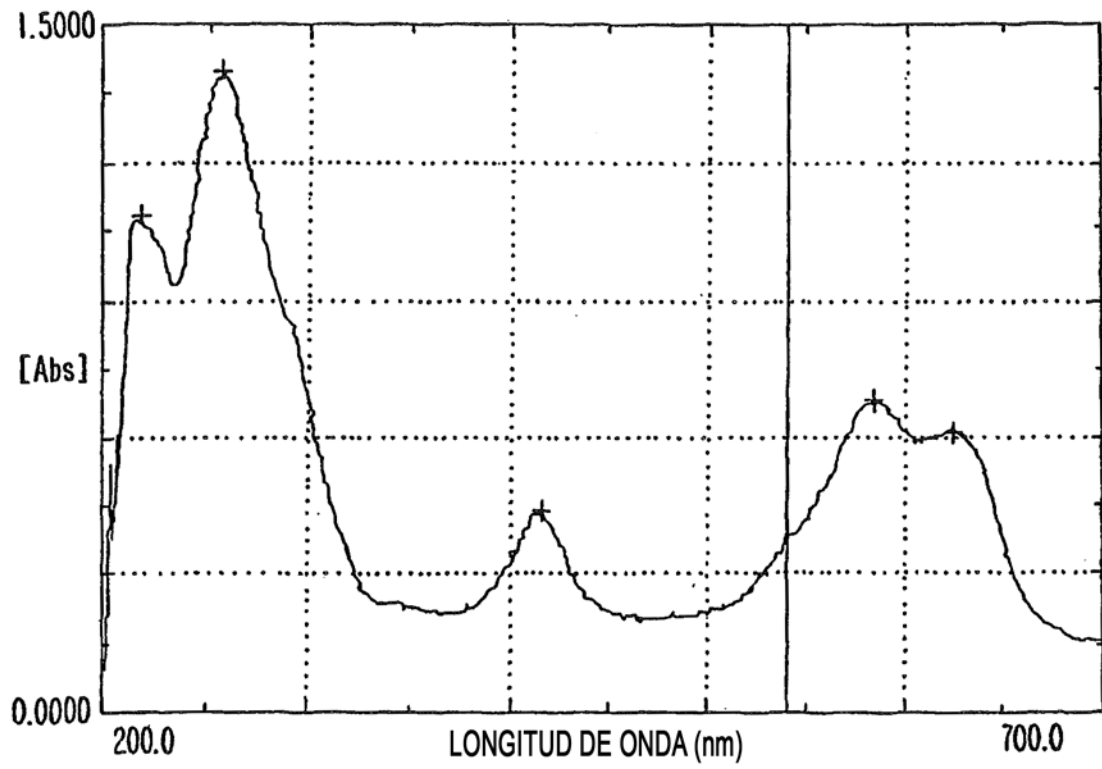


FIG. 23A.

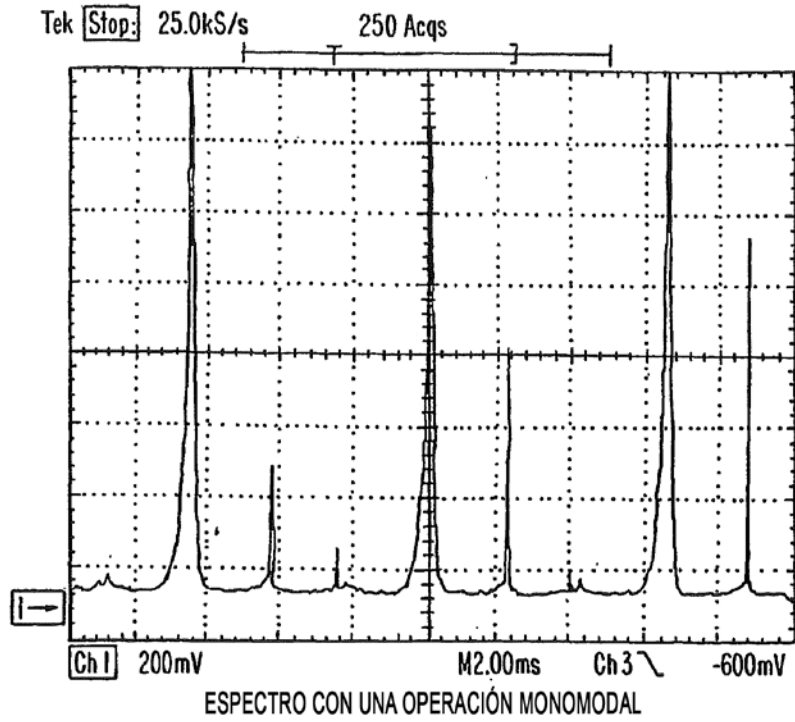


FIG. 23B.

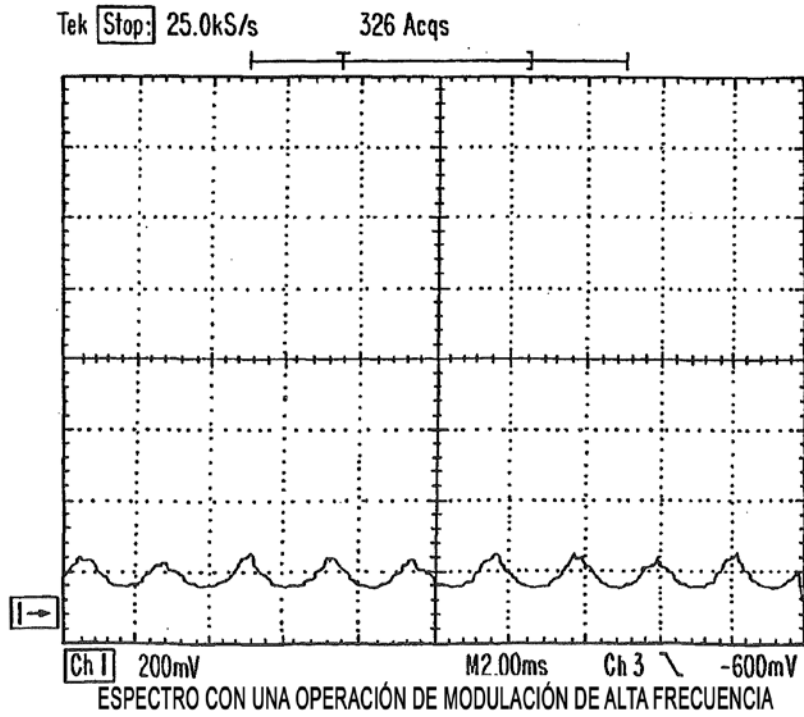
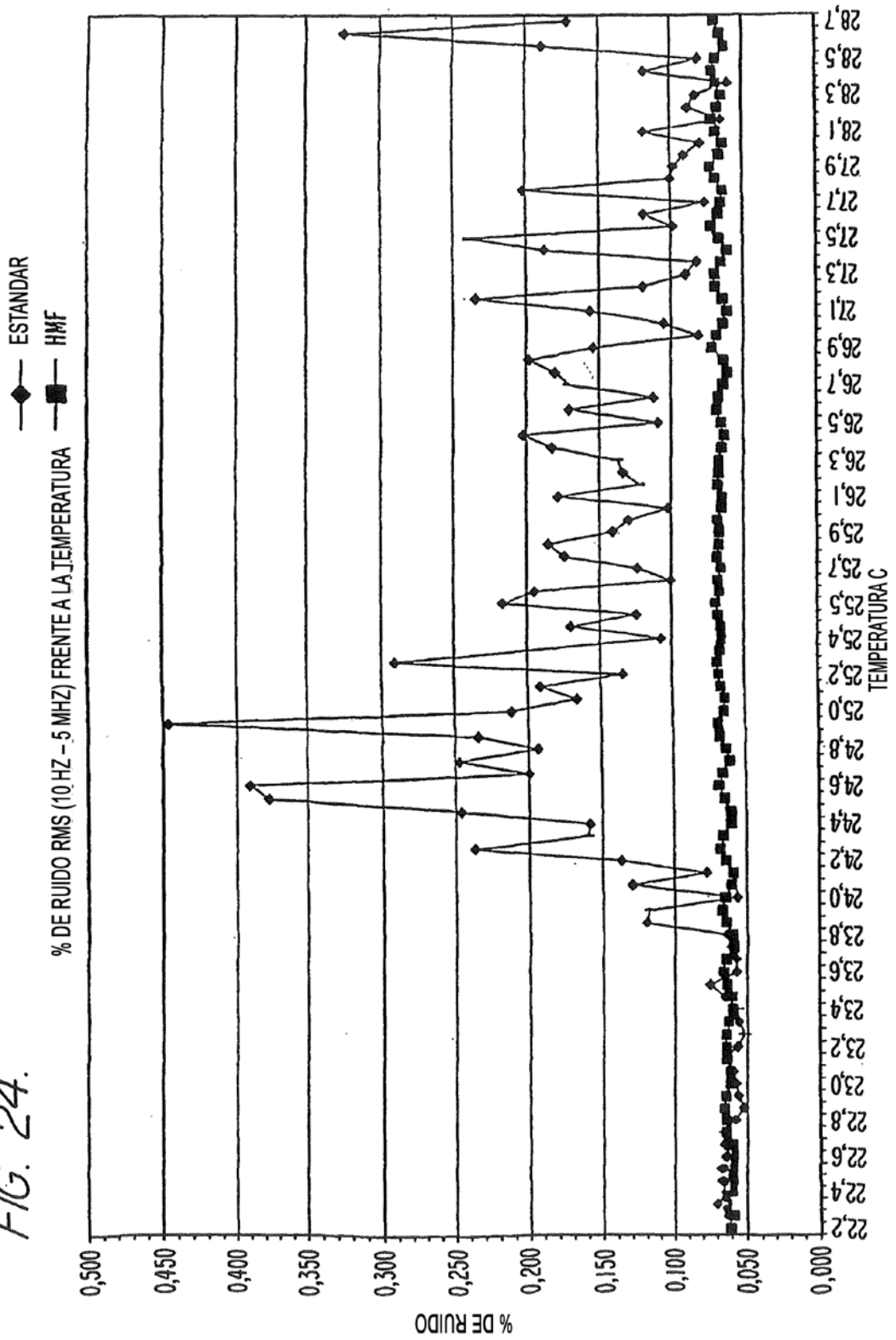


FIG. 24.



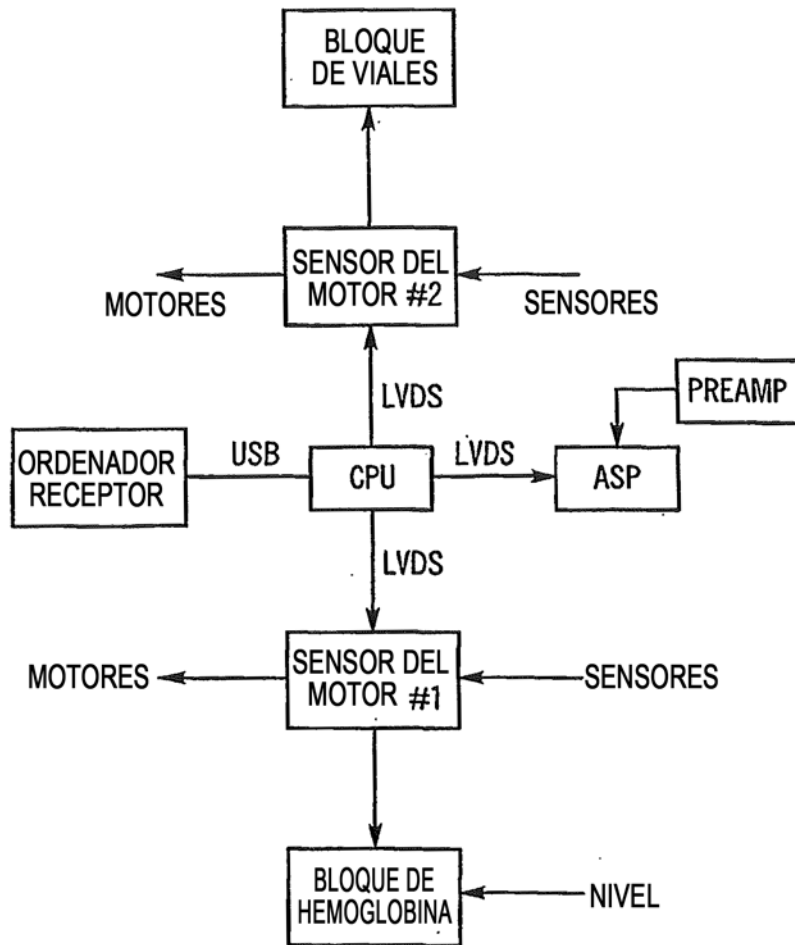


FIG. 25.

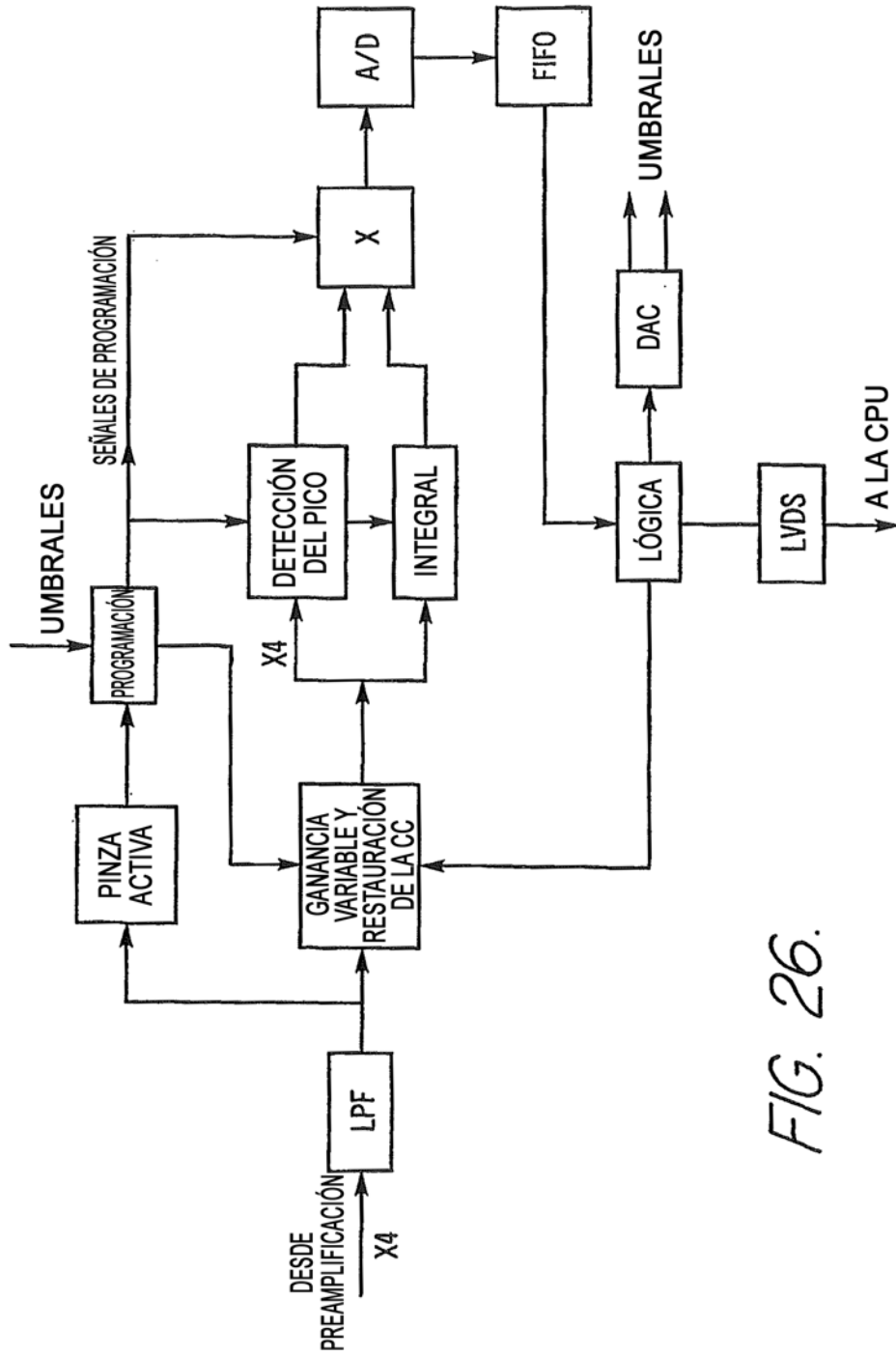


FIG. 26.