

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 920**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2009** **E 09769027 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013** **EP 2291658**

54 Título: **Procedimiento de citometría de flujo para la determinación del número total de leucocitos y del número de trombocitos, así como para la diferenciación de leucocitos en muestras de sangre de aves**

30 Prioridad:

27.06.2008 DE 102008030515

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

12.11.2013

73 Titular/es:

SELIGER, CHRISTIAN (100.0%)
Josefsstrasse 39
55118 Mainz, DE

72 Inventor/es:

KOTHLOW, SONJA;
KASPERS, BERND y
SELIGER, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 428 920 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 de citometría de flujo para la determinación del número total de leucocitos y del número de trombocitos, así como para la diferenciación de leucocitos en muestras de sangre de aves

5

La presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación del número total de leucocitos y del número de trombocitos, así como para la diferenciación de leucocitos en la sangre de aves, utilizando marcadores de pan-leucocitos y trombocitos marcados por fluorescencia y/u otros marcadores de leucocitos, sin una previa separación de eritrocitos.

10

El hemograma de glóbulos rojos y de glóbulos blancos se establece rutinariamente en la medicina humana y de mamíferos con el fin de examinar el estado de salud de individuos y poblaciones. Variaciones en la hemostasis de los leucocitos se representan en el hemograma de glóbulos blanco (leucograma). Éste contiene la determinación del número total de leucocitos, el hemograma diferencial, el cálculo de los números absolutos de las diferentes fracciones de leucocitos por μl de sangre y la valoración morfológica de los leucocitos en el frotis de sangre teñido.

15

El leucograma proporciona al clínico una idea sobre el estado actual del sistema inmunológico de pacientes. Dado que los números de leucocitos en el caso de individuos sanos son relativamente constantes, pero varían probablemente de manera intensa en el caso de la presencia de una enfermedad, el hemograma de glóbulos blancos tiene una función indicadora. Las respuestas de leucocitos no son, por norma general, ciertamente patognómicas (consideradas por sí solas, ya suficientes para un seguro establecimiento de diagnóstico). Sin embargo, pueden proporcionar valiosas informaciones que ayudan a establecer un diagnóstico de sospecha, confirmar un diagnóstico diferencial, vigilar el éxito de una terapia o emitir un pronóstico. Variaciones del hemograma de glóbulos blanco arrastran tras de sí en el día a día clínico, en ocasiones, consecuencias terapéuticas directas, p. ej. en forma de un tratamiento antibiótico. Finalmente, la mayoría de las veces son uno de los primeros indicios de diagnóstico del laboratorio sobre la presencia de infecciones que amenazan la vida.

20

25

La determinación del número total de leucocitos y del hemograma diferencial pertenece a los ensayos de laboratorio llevados a cabo con mayor frecuencia en la medicina humana. En virtud de la elevada precisión, exactitud y rapidez de los aparatos de análisis de hematología automáticos, estos ensayos se llevan a cabo entretanto de manera predominante de forma automatizada en la medicina humana. Solamente las muestras, en cuyo análisis fracase el aparato o en las que éste, en virtud de particularidades, requiera una verificación, se valoran al microscopio.

30

En contraposición a la hematología en mamíferos, la hematología de aves se sigue encontrando todavía en sus comienzos. Se describió la morfología de las células de la sangre de las aves y se desarrollaron técnicas manuales para el recuento de leucocitos. Sin embargo, se impidieron avances decisivos en la hematología de las aves, dado que faltan procesos de ensayo automatizados.

35

Ninguno de los procedimientos automatizados establecidos en la hematología de mamíferos es adecuado para el ensayo de la sangre de aves. Los motivos de ello se encuentran en la particular constitución de las células de la sangre de las aves. En el caso del recuento de leucocitos en aparatos de análisis de hematología, los eritrocitos perturbadores son lisados habitualmente mediante la adición de cloruro de amonio o disoluciones hipotónicas. Sin embargo, los eritrocitos de las aves, al igual que los de todos los vertebrados no pertenecientes a los mamíferos (reptiles, anfibios, peces, etc.) contienen un núcleo, pero sólo se pueden lisar difícilmente y durante la medición no se pueden diferenciar de manera fiable de leucocitos. Además, en el caso de los trombocitos de las aves, a diferencia de las plaquetas sanguíneas de los mamíferos, se trata de células nucleadas del tamaño de los linfocitos, las cuales los aparatos de análisis de hematología no permiten tampoco diferenciar de manera fiable de los leucocitos. En la bibliografía se señala, además, que junto a eritrocitos y trombocitos intactos, los núcleos que se liberan durante una lisis de los eritrocitos conducen también a interferencias. Los procedimientos de recuento de partículas electrónicos habituales y los procedimientos habituales de recuento en cámaras no pueden con ello emplearse para determinar el número total de leucocitos en la sangre de las aves.

40

45

50

Por lo tanto, se desarrollaron numerosos procedimientos manuales para la determinación del número total de leucocitos en la sangre de las aves. Sin embargo, todas estas técnicas requieren mucho tiempo y son imprecisas. El bajo número de células contadas en el caso de los procedimientos de microscopía resulta en un error estadístico elevado. Las dificultades adicionales durante la diferenciación de leucocitos en la sangre de aves conducen a confusiones y hacen que los procedimientos de microscopía sean todavía menos fiables y más propensos a errores.

55

60

Ensayos de adaptar los aparatos disponibles para el recuento y la diferenciación de leucocitos de sangre de aves

discurrieron predominantemente sin éxito. Ciertamente, se informó de resultados satisfactorios en el caso del empleo del aparato de análisis de hematología Cell-Dyn 3500 de la razón social Abbott Laboratories para examinar la sangre de papagayos, gorriones, aves acuáticas y aves corredoras (Fudge, Abstract in Main Conference Proceedings de la Association of Avian Veterinarians 1995). El compendio finaliza con la nota de que los datos de precisión preliminares dados en la presentación, que deben ser publicados, serían discutidos. Hasta el momento presente, no se ha podido encontrar, no obstante, publicación del autor alguna que contuviera informaciones sobre este tema. En un libro editado por el mismo, cinco años más tarde, escribe que la tecnología de la citometría de flujo requeriría todavía de mejoras. Abordando los problemas, declara que para las distintas especies de aves, en virtud de su diferente morfología de los leucocitos, serían necesarios distintos ajustes de los aparatos. Además, se reconocen dificultades en la diferenciación entre trombocitos y linfocitos.

Otra autora informa incluso que con el aparato Cell-Dyn-3500 no era posible una buena diferenciación de los leucocitos en linfocitos y granulocitos (Comparación de métodos de ensayo hematológicos en aves, Diss. Vet. Med. Univ. Viena Reauz, E. 1996). Únicamente, en la medición del hematocrito y del número total de leucocitos se habría alcanzado un resultado satisfactorio. En su trabajo, Reauz ha examinado sangre de aves con todavía otro aparato automático de hematología (MS9, Melet Schloesing. Francia). En este caso, para los parámetros hematocrito, número de eritrocitos, número total de leucocitos, linfocitos, monocitos y granulocitos se habrían alcanzado valores que coincidirían bien con los resultados determinados con los métodos convencionales. No pudieron, sin embargo, encontrarse publicaciones que fueran más allá sobre el empleo de este aparato para el examen de sangre de aves.

Un examen ulterior de sangre de gallinas con el aparato Cell-Dyn 3500 informa de valores de granulocitos que presentan una exactitud "aceptable". A pesar del empleo del software especial VET 2.3 ofrecido por el fabricante, con ajustes especiales para el examen de la sangre de aves, los números de linfocitos habrían sido, sin embargo, totalmente imprecisos, toda vez que en el caso de mediciones múltiples de las mismas muestras habría que registrar diferencias, en parte considerables, entre los resultados de la medición. Por lo tanto, el autor tiene pocas esperanzas de que el examen automatizado de sangre de aves pudiera funcionar de manera similarmente bien como en el caso de los mamíferos.

La tecnología de Capa Leucocitaria Cuantitativa, empleada primeramente en la medicina humana, posibilita también en el caso de diferentes animales domésticos una determinación aproximada rápida del número total de leucocitos, así como el establecimiento de un hemograma diferencial. Seidl sometió a ensayo el procedimiento en muestras de sangre de psitácidas. El único parámetro que pudo determinarse de manera fiable en la sangre de aves era, sin embargo, el hematocrito. Como causa de los resultados no satisfactorios en el caso de los otros parámetros, no se indica la separación exacta de las bandas de células individuales.

A la vista de las dificultades, hasta ahora no resueltas, en el examen automatizado de la sangre de aves, se continúa recurriendo hasta ahora en la medicina de aves, por lo tanto, ampliamente a procedimientos microscópicos laboriosos y no fiables, o se renuncia por completo a estos importantes ensayos hematológicos.

Por lo tanto, existe una demanda adicional de investigación de desarrollar un procedimiento automatizado que supere estos problemas. Un procedimiento de este tipo daría alas para la investigación de la hematología de aves.

Desde hace tiempo, existe una necesidad de examinar números mayores de muestras de sangre de aves de corral la cual, en virtud de la ausencia de un método automatizado para establecer un hemograma de glóbulos blancos en las aves, no ha podido ser hasta ahora satisfecha.

En ensayos científicos, la determinación de la relación entre granulocitos heterófilos y linfocitos se aprovecha muchas veces como medida de la carga por estrés de gallinas. Además, la determinación de la relación granulocitos heterófilos/linfocitos encuentra ya aplicación en la crianza de razas de gallinas resistentes al estrés o bien a las enfermedades. También en el marco del desarrollo y del examen de vacunas para aves de corral existe la necesidad de establecer hemogramas de glóbulos blancos. Así, en el caso de aves de corral se presentan diferentes enfermedades víricas inmunosupresoras que provocan enormes perjuicios económicos. En el marco de estudios para la seguridad de vacunas vivas contra enfermedades de este tipo ya se señaló un interés por parte de diferentes fabricantes de vacunas frente a instalaciones de investigación universitarias de establecer mayores números de hemogramas de glóbulos blancos en el caso de gallinas. Finalmente, la directriz UE 2001/82/EG (párrafo C 5) para los procesos de admisión de vacunas para animales en los Estados miembros exige: "en la medida en que el medicamento inmunológico para animales pudiera tener un efecto negativo sobre la reacción inmune del animal vacunado o de sus descendientes, se han de llevar a cabo ensayos adecuados sobre las funciones inmunológicas". La importancia que se otorga en toda Europa al complejo de las enfermedades inmunosupresoras en el caso de aves de corral lo demuestra también la Acción COST 839 financiada por la UE "Immunosuppressive Viral Diseases in Poultry".

En la investigación biológica celular se ha establecido con la citometría de flujo una técnica extremadamente productiva para la diferenciación y el recuento de las más diversas células presentes en suspensión.

5 La técnica se emplea ya en el diagnóstico rutinario en medicina humana. Un ejemplo clásico de ello es el recuento de células T CD4-positivas en el marco del diagnóstico del SIDA y para controles de seguimiento en pacientes de VIH. Aplicaciones similares a la citometría de flujo son el recuento de monocitos y de células hematopoyéticas.

10 A pesar de que desde hace años se conoce el problema y existía la necesidad, no está documentado el que con ayuda de la citometría de flujo pudiera desarrollarse un procedimiento automatizado adecuado en la práctica, que permitiera una determinación del número total de leucocitos así como el establecimiento de un hemograma diferencial en el caso de gallinas u otras aves.

15 Ciertamente, ya se publicó un procedimiento de citometría de flujo para la determinación del número de linfocitos en la sangre de codornices, el cual se basa en el uso de los colorantes yoduro de 3,3'-dipentiloxacarbocianina (DiOC₅(3)) o yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DiOC₆(3)) (Moritomo et al., J. Vet. Med. Sci. 64 (2002), 1149-1151; Uchiyama et al., J. Vet. Med. Sci. 67 (2005), 441-444). Sin embargo, esta técnica no se ha impuesto hasta el momento actual ni en la investigación ni en el diagnóstico rutinario. Algunas investigaciones demuestran que con esta técnica a menudo no se consigue, en el análisis de la sangre de gallinas, una diferenciación fiable de las diferentes poblaciones de células.

20 Otras técnicas de citometría de flujo son empleadas también en la ciencia por diferentes grupos de trabajo que investigan el sistema inmunológico de la gallina, para la identificación y el recuento de diferentes fracciones de leucocitos.

25 En trabajos de investigación con respecto a la inmunología de gallinas, se antepone por norma general el aislamiento de los leucocitos con ayuda de técnicas de centrifugación especiales con el fin de separarlas de eritrocitos no lisables perturbadores (véase, p. ej., Bohls et al., Dev. Comp. Immunol.). Muestras preparadas de esta manera no permiten, sin embargo, una cuantificación absoluta de las células en cuestión, referida al volumen de la sangre. Además, preparados de células de este tipo, producidos habitualmente con ayuda de la centrifugación de "baja velocidad" o por el "gradiente de densidad de Ficoll" no contienen o sólo contienen muy pocos granulocitos, dado que éstos son separados junto con los eritrocitos.

35 En la bibliografía se describe un método para el recuento por citometría de flujo de sub-poblaciones de leucocitos en muestras de sangre entera de gallinas (Burgess y Davison, J. Immunol. Meth. 227 (1999), 169-176). La técnica se basa esencialmente en el procedimiento empleado por ejemplo en medicina humana en el diagnóstico del SIDA y la vigilancia de la terapia del SIDA de forma rutinaria para la cuantificación de células T colaboradoras CD4-positivas. En este caso, se emplean anticuerpos monoclonales directamente acoplados con colorantes de fluorescencia. Con el fin de obtener una concentración de células que pueda ser todavía elaborada por el citómetro de flujo, la muestra de sangre se diluye intensamente antes de la medición. En consecuencia, debe aumentarse en un múltiplo el tiempo de medición con el fin de poder determinar, a pesar de ello, un número suficiente de leucocitos, ya que en el caso de la mayoría predominante de las células presentes en la muestra se trata de eritrocitos. Adicionalmente, se añaden partículas fluorescentes en una concentración conocida, con el fin de poder determinar números absolutos de células.

45 Burgess et al. reconocieron ciertamente que con la técnica por ellos descrita se podían identificar y cuantificar poblaciones específicas de PBLs (linfocitos de la sangre periférica – siglas en alemán). Sin embargo, no encuentra indicio alguno de que el procedimiento pudiera aprovecharse para la determinación del número total de leucocitos ni para establecer un hemograma diferencial completo.

50 Conforme a la presente invención, mediante el empleo combinado de un marcador de pan-leucocitos y de un marcador de trombocitos se posibilita, también en el caso de la tinción directa de sangre entera, una delimitación segura de las poblaciones de eritrocitos, trombocitos y leucocitos.

55 Un objeto de la invención es, por consiguiente, un procedimiento para la determinación del número total de leucocitos en la sangre de aves o gallináceas, que comprende las etapas:

- (a) habilitación de una muestra de sangre no coagulada;
- (b) eventualmente, fijación de la muestra,
- (c) dilución de la muestra,
- (d) puesta en contacto de la muestra diluida con un marcador de pan-leucocitos y un marcador de trombocitos,
- 60 (e) medición de la muestra en un citómetro de flujo sin etapas de lavado ni purificación previas y
- (f) determinación cuantitativa de la población de leucocitos así como de la población de trombocitos en la muestra

conforme a la reivindicación 1.

En las reivindicaciones 2-6 se describen realizaciones preferidas. Realizaciones en la parte descriptiva que no se refieren a la determinación del número total de leucocitos en la sangre de aves o gallináceas, únicamente se mencionan como ejemplos de referencia.

El procedimiento permite la determinación del número total de leucocitos y del número de trombocitos así como el establecimiento de hemogramas diferenciales (diferenciación de leucocitos) en la gallina. La técnica es transferible, en el caso de la disponibilidad de las sustancias marcadoras correspondientes (anticuerpos monoclonales), a todas las otras especies de aves cuya sangre no pueda ser tampoco analizada, en virtud de eritrocitos nucleados así como de grandes trombocitos, con los procedimientos habituales, difundidos en medicina humana y de mamíferos.

El procedimiento descrito en esta memoria descriptiva ofrece, también en el examen de la sangre de especies, cuyos eritrocitos anucleados se pueden lisar bien, p. ej. en el caso del hombre y de otros mamíferos, ventajas frente a los métodos habituales en estos sectores. Ciertamente, ya se publicaron procedimientos de citometría de flujo para el establecimiento de un hemograma diferencial en el caso del hombre y del ratón. Sin embargo éstos incluyen, a diferencia del método descrito en esta memoria, por norma general, una lisis de los eritrocitos. En el caso de los procesos de lisis establecidos se destruye también una parte de los leucocitos, de manera que los resultados del recuento de células llevado a cabo a continuación, ya no se corresponden con la realidad. Además, en el caso de la sangre de mamíferos sucede también que eritrocitos nucleados o precursores de eritrocitos nucleados no pueden ser desprendidos por los procesos de lisis empleados de manera rutinaria, y perturban a continuación el recuento. Ciertamente, se describió la técnica sin-lisis sin-lavado para el recuento de células T CD4⁺ y de células CD34⁺. Sin embargo, hasta ahora, para ninguna de las especies se ha publicado un procedimiento que contenga una determinación del número total de leucocitos, número de trombocitos o bien el establecimiento de homogramas diferenciales con un marcador de pan-leucocitos y/o un marcador de trombocitos sin etapas de lavado ni purificación, en particular sin la lisis de eritrocitos.

En virtud de las ventajas descritas, la técnica descrita alberga el potencial de ser empleada como proceso de referencia para las más diversas especies.

En una forma de realización particularmente preferida, el procedimiento comprende una combinación de las siguientes etapas:

- a) realización en un único recipiente de reacción (tubo único),
- b) realización del proceso sin lisis de poblaciones de células, p. ej. eritrocitos (sin lisis),
- c) realización del proceso sin etapas de lavado en la muestra (sin lavado)
- d) determinación del número total de leucocitos y
- e) diferenciación de leucocitos y
- f) determinación del número de trombocitos.

La variante descrita aquí con detalle del nuevo procedimiento para el establecimiento del hemograma en gallináceas, en particular en el caso de la gallina, posibilita el establecimiento de un hemograma diferencial con un citómetro de flujo con sólo un láser y 3 canales de fluorescencia tal como, p. ej., el aparato FACScan de Becton Dickinson. Este aparato permite, por consiguiente, el aprovechamiento de aparatos más antiguos o bien más económicos.

La etapa (a) del procedimiento de acuerdo con la invención comprende la habilitación de una muestra de sangre no coagulada, en particular de una muestra de sangre entera. La muestra puede obtenerse de manera habitual a partir del organismo a examinar. En caso necesario, la muestra es tratada con un reactivo de anticoagulación adecuado. Un reactivo preferido es EDTA o una sal del mismo. En este caso, se encontró que, en particular en el caso de aves adultas hembras tales como, por ejemplo, la gallina madura, son necesarias concentraciones de EDTA superiores para un efecto de anticoagulación suficiente. Por lo tanto, preferiblemente se utilizan ≥ 4 mg/ml de EDTA, de manera particularmente preferida 4-7 mg/ml de EDTA para la anticoagulación.

La etapa (b) del procedimiento de acuerdo con la invención comprende la fijación de la muestra. Esta etapa es sólo facultativa y puede suprimirse en el caso de un tratamiento y medición próximos en el tiempo de la muestra. La fijación de la muestra puede tener lugar con reactivos habituales, p. ej. paraformaldehído, formaldehído o agentes de fijación adquiribles en el comercio.

La etapa (c) del procedimiento comprende la dilución de la muestra, la cual se lleva a cabo favorablemente en esencia sin lisis de los eritrocitos. Para la dilución se utiliza habitualmente un tampón adecuado. La dilución puede tener lugar, por ejemplo, en una relación de 1:1 (una parte en volumen de muestra a una parte en volumen de

tampón) hasta 1:1000, de manera particularmente preferida de 1:10 a 1:100, por ejemplo de aproximadamente 1:50.

5 Conforme a la etapa (d), la muestra diluida se pone en contacto con un marcador de pan-leucocitos y un marcador de trombocitos. En este caso, se trata habitualmente de anticuerpos marcados directamente, p. ej. marcados con colorantes de fluorescencia que están dirigidos contra antígenos de las superficies de las células que son característicos para los leucocitos o bien trombocitos. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales. Se prefieren anticuerpos monoclonales.

10 Ejemplos de anticuerpos que son adecuados como marcadores de pan-leucocitos son los anticuerpos anti-CD45 (clon 16-6, clon LT40) y K55. Ejemplos de anticuerpos que son adecuados como marcadores de trombocitos son K1, anti-CD41/D61 y anti-CD51/CD61.

15 La puesta en contacto de la muestra con los marcadores tiene lugar bajo condiciones en las que los marcadores se pueden unir a las células respectivas.

20 A continuación, la muestra se mide, conforme a la etapa (e), en un citómetro de flujo. El procedimiento de acuerdo con la invención se distingue porque la muestra se examina por citometría de flujo sin previas etapas de lavado ni de purificación, p. ej. separación de eritrocitos o bien lisis de eritrocitos. En este caso, conforme a la etapa (f) tiene lugar una determinación cuantitativa de la población de leucocitos, es decir, la determinación del número total de leucocitos así como, eventualmente, de la población de trombocitos en la muestra. Una determinación cuantitativa de las células puede conseguirse mediante el empleo de perlas de cuantificación que se añaden a la muestra en un número predeterminado, y/o a través de calibración del caudal y/o a través del uso de un citómetro de flujo con la posibilidad de un recuento volumétrico real. Los datos se evalúan por medio de un software adecuado y se determinan las diferentes poblaciones de células, determinándose los números de células absolutos y los relativos.

25 Preferiblemente, la determinación comprende el uso de un marcador de pan-leucocitos y de un marcador de leucocitos con diferentes marcajes de fluorescencia, con lo cual se hace posible una diferenciación de trombocitos y leucocitos en presencia de eritrocitos. Además, se lleva a cabo favorablemente un análisis de dispersión/difracción frontal (FCS – siglas en inglés) y lateral (SSC – siglas en inglés) de las células, pudiendo identificarse los monocitos y también los granulocitos heterófilos como poblaciones inequívocamente delimitables en la representación de todos los leucocitos.

30 Mediante el procedimiento de acuerdo con la invención se hace posible, en el caso de una tinción directa de muestras de sangre entera, una delimitación segura de las poblaciones de leucocitos, trombocitos y eritrocitos.

La diferenciación ulterior de las diferentes fracciones de leucocitos puede tener lugar tan pronto como éstos se diferencian entre sí en al menos un parámetro determinado por citometría de flujo.

40 Con el procedimiento se pueden identificar y cuantificar básicamente todas las células para las cuales esté disponible un marcador específico o una combinación de marcadores específica. Si sólo está presente un marcador no específico, la población de células respectiva se puede representar eventualmente en combinación con las otras propiedades, tamaño de las células (FSC-H) y granularidad (SSC-H). Así, p. ej., los granulocitos así como todos los leucocitos son positivos para el marcador α CD45. Debido a su fuerte granularidad (SSC-H) se pueden diferenciar, sin embargo, de éstos.

Ya la combinación de un marcador de trombocitos y de un marcador de pan-leucocitos permite una diferenciación más amplia en eritrocitos, trombocitos, leucocitos, linfocitos, monocitos y granulocitos heterófilos.

50 La constitución modular de la técnica permite, sin embargo, una diferenciación ulterior y más fiable mediante el empleo de marcadores de leucocitos adicionales.

55 Ejemplos de sub-poblaciones de leucocitos que pueden ser determinadas mediante el procedimiento de acuerdo con la invención son células T colaboradoras, células T citotóxicas, células T $\gamma\delta$, células NK, granulocitos basófilos, granulocitos eosinófilos, granulocitos heterófilos, células B o combinaciones de dos o más de las poblaciones mencionadas.

Como extraordinariamente adecuada para el establecimiento del hematograma en el caso de la gallina se ha manifestado la combinación de los siguientes anticuerpos recogida en la Tabla 1:

60

Tabla 1

Antígeno diana	Clon	Fluorocromo	Células teñidas
CD45	16-6 comercialmente adquirible de Serotec (División de MorphoSys)	PerCP	leucocitos, trombocitos
	K1	RPE	trombocitos, monocitos
	KUL01	RPE	monocitos
CD4	CT4	FITC	células T colaboradoras
CD8 α	CT8	FITC	células T citotóxicas
TCR $\gamma\delta$	TCR1	FITC	linfocitos T $\gamma\delta$
BU1	AV20	FITC	I.Linfocitos B

El procedimiento de acuerdo con la invención es adecuado para aplicaciones en medicina humana y veterinaria. En particular, el procedimiento se adecúa para la determinación de un hemograma de glóbulos blancos en el caso de aves, preferiblemente en gallináceas y, de manera particularmente preferida, en gallinas.

Además, el procedimiento de acuerdo con la invención debe explicarse mediante los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1: Obtención de muestras de sangre

Con el fin de hacer incoagulables a las muestras de sangre pueden emplearse diferentes anticoagulantes. El uso de anticoagulantes líquidos posibilita una mezcladura a fondo más rápida con la sangre, pero conduce a una dilución de la muestra.

EDTA, p. ej. en forma de K₂EDTA o Na₂EDTA, se considera también como el anticoagulante de elección para el examen hematológico de aves. Permite una tinción irreprochable de las células y no conduce a ningún apelmazamiento de leucocitos. En el caso de utilizar tubitos que contienen EDTA en forma liofilizada, no se produce dilución alguna de la muestra y, como consecuencia, tampoco falsificación alguna de los números de células absolutos. Concentraciones de EDTA entre 1,0 y 2,0 mg de EDTA/ml de sangre se consideran aconsejables en el caso de mamíferos y aves. No se aconsejan concentraciones mayores, dado que éstas pueden conducir a una contracción de los eritrocitos. En el caso de concentraciones de EDTA superiores a 3,75 mg/ml se observó una fuerte tinción de color azul del frotis de sangre y variaciones de los leucocitos.

En algunos ensayos se comprobó que la sangre de gallinas ponedoras adultas, la cual es tomada en vasos preparados con EDTA y producidos para la medicina humana, coagula a menudo. Preferiblemente, por lo tanto, se utilizan concentraciones mayores de EDTA entre 4 y 7 mg/ml.

Para ello se ofrece el siguiente modo de proceder:

1,5 ml de sangre se toman a través de una cánula con una jeringa de 2,0 ml. Después, la sangre se transfiere inmediatamente a un tubito de extracción de sangre en el que se ha hecho el vacío (p. ej. Vacutainer® 7,2 mg de K₂EDTA vacío 4,0 ml). Para ello, la cubierta de caucho vulcanizado del tubito se perfora con la cánula que se encuentra todavía sobre la jeringa. De este modo, la sangre es aspirada en el tubito por el propio vacío.

Alternativamente, se ofrece la modificación de tubitos en la medicina humana adquiribles en el comercio. Para ello, en un tubito de 4,0 ml se incorporan, p. ej. con una jeringa sobre la cual está dispuesta una cánula, 2,5 ml de aire. Durante la extracción de sangre debe entonces tenerse en cuenta únicamente que deben tomarse al menos 1,5 ml de sangre. Durante la transferencia de la muestra de sangre al tubito de vacío, el volumen reducido procura entonces el llenado correcto del tubito.

Mediante inversión, la sangre es mezclada con el anticoagulante con el fin de evitar la formación de coágulos. A continuación, las muestras se disponen en un mezclador de rodillo oscilante, a ser posible hasta el posterior tratamiento a temperatura ambiente, con el fin de garantizar una mezcladura a fondo continua y moderada.

El procedimiento por citometría de flujo aquí descrito es compatible con la fijación previa de la sangre de gallina. Se pueden emplear sustancias fijadoras tales como paraformaldehído, formaldehído o agentes de fijación adquiribles en el comercio para la conservación de muestras de sangre para ensayos de citometría de flujo tales como TransFix (UKNEQAS), Cyto-Chex BCT (Streck Laboratories), Streck Cell Preservative (Streck Laboratories), Cellsave (Immunocon) o ThromboFix (Beckmann Coulter). En algunos estudios se pudieron analizar todavía de manera fiable al cabo de 3 días muestras de sangre de gallinas después de fijación con TransFix (UKNEQAS). Por consiguiente, el procedimiento permite un examen central o bien el envío de muestras a un laboratorio de examen.

En el caso de la fijación con TransFix® (UKNEQAS) se puede proceder de la siguiente manera: se invierte el tubo para la extracción de sangre con la muestra de sangre contenida en el mismo, con el fin de re-suspender por completo a las células. Después se transfieren 400 µl de sangre EDTA del tubo de extracción de sangre a un recipiente de reacción de 0,5 ml. Después de ello, se añaden 80 µl de TransFix® a la sangre en el recipiente de reacción de 0,5 ml. Finalmente, el recipiente de reacción se cierra cuidadosamente, y la muestra se mezcla con cuidado. El almacenamiento hasta la medición tiene lugar a la temperatura ambiente.

La Figura 20 muestra una representación esquemática de una forma de realización para la fijación de acuerdo con la invención de muestras de sangre de gallinas.

Ejemplo 2: Dilución y tinción de muestras

Para cada uno de los anticuerpos empleados se determina la concentración óptima en un experimento de titulación. De esta manera, se reduce el zumbido de fondo inespecífico, de modo que se puede renunciar por completo a etapas de lavado.

Habitualmente, para una tinción se emplea 1 µl de sangre. Para ello, la sangre se diluye primero en la relación 1/50 en un tampón adecuado y luego se disponen 50 µl de esta mezcla previa. Las concentraciones de las disoluciones de anticuerpos empleadas se eligen de manera que la concentración óptima se alcance sólo en un volumen total a base de disolución de anticuerpo y muestra previamente diluida. Los anticuerpos directamente conjugados se pueden añadir a la muestra de sangre diluida en forma de una mezcla previa (método Instant). Alternativamente – en particular en el caso de emplear diferentes tinciones – los anticuerpos pueden añadirse, sin embargo, también individualmente a la muestra. Con el fin de reducir las pérdidas por adherencia de células (entre otros, trombocitos, monocitos, granulocitos) la tinción de muestras no fijadas se lleva a cabo preferiblemente en tubitos de polipropileno.

Con el fin de separar albúmina de suero bovino (BSA – siglas en alemán) que perturba las mediciones a largo plazo por citometría de flujo, ésta se filtra previamente en el caso de utilizar un tampón con contenido en BSA.

Antes del comienzo de la tinción se puede preparar de manera reciente una disolución que contenga los distintos anticuerpos monoclonales directamente conjugados. Con el fin de poder emplear cada uno de los anticuerpos en la concentración óptima y, al mismo tiempo, derrochar la menor cantidad posible de reactivos, se prepara primeramente de cada uno de los anticuerpos una disolución patrón previamente diluida. A base de partes iguales de todas las disoluciones patrón se mezcla entonces la disolución empleada para la tinción. Las concentraciones de anticuerpo de las disoluciones patrón y de la disolución mixta se calculan de modo durante la posterior tinción en la mezcla a base de muestra y disolución mixta, las concentraciones de anticuerpos corresponden a las concentraciones óptimas determinadas en los experimentos de titulación. Alternativamente a la adición por mezcladura inmediatamente antes del experimento, la mezcla de anticuerpos puede ser preparada con antelación y puede ser provista de un agente conservante (p. ej. azida de sodio, pentaclorofenol) y luego ser almacenada de forma refrigerada a lo largo de espacios de tiempo prolongados.

Después de la resuspensión, 20 µl de sangre EDTA fijada se transfieren a un recipiente de reacción de 1,5 ml. Para la preparación de una dilución al 1/50, 980 µl de tampón filtrado en condiciones estériles (temperatura ambiente) se añaden a la sangre en el recipiente de reacción de 1,5 ml. Mediante inversión, la sangre y el tampón se mezclan con cuidado.

Tampón Fluo

5 g	de albúmina de suero bovino (BSA)
50 mg	de azida de sodio (NaN ₃)
hasta 500 ml	de PBS
almacenamiento: 4°C	

Con el fin de posibilitar la cuantificación absoluta de las poblaciones de células identificadas, se procede preferiblemente según el principio de “add-only” (sólo añadir). En la medida de lo posible sólo se añaden al tubo de muestra, tampón y disoluciones, y hasta la medición ya no se retira nada más de los tubitos o bien se transfieren a otros recipientes.

En la medida en que para la cuantificación absoluta se empleen tubos TruCOUNT y el citómetro FACScan (Becton Dickinson), se aconseja el siguiente modo de proceder:

la cantidad requerida de tubos TruCOUNT se recoge inmediatamente antes de la tinción de la bolsa almacenada a la temperatura ambiente. Después se pipetea 20 µl de la mezcla previa de anticuerpos un poco por encima de la

plaquita metálica junto a la pared lateral del tubo TruCOUNT, sin tocar a la perлита. Como paso siguiente, el tubo TruCOUNT se gira aproximadamente 180° en torno a su eje longitudinal. Mediante pipeteado inverso se pipetea 50 µl de la muestra de sangre diluida en el tampón Fluo, asimismo por encima de la plaquita metálica junto a la pared lateral enfrentada del tubo TruCOUNT, sin tocar a la perлита o a la gota ya añadida de la disolución de anticuerpos. A continuación, el tubo TruCOUNT se somete a vórtice cuidadosamente tres veces durante un segundo. La incubación tiene lugar durante un tiempo de aprox. 45 minutos en la oscuridad y a la temperatura ambiente. Después se añaden 300 µl de tampón, y el tubo TruCOUNT se introduce en hielo. El recipiente de hielo se tapa con el fin de proteger hasta la medición a las muestras frente a la incidencia de la luz.

Alternativamente a los tubos TruCOUNT pueden emplearse para la cuantificación absoluta otras perlas (CALTAG Counting Beads von Molecular Probes, Flow-Count Fluospheres de Beckman Coulter, CytoCount de DakoCytomation, CountBright de Molecular Probes, entre otras). La tinción ha de adaptarse entonces en base a los datos del fabricante del producto respectivo. En base a la concentración conocida de las perlas empleadas tiene lugar, durante la evaluación de la medición, la determinación de los números absolutos de células.

El uso de un citómetro de flujo con la posibilidad del recuento volumétrico real (Partec) permite renunciar a las perlas.

Con el fin ahorrar costes, también puede pasar a emplearse, alternativamente, en otros citómetros de flujo la calibración del caudal.

En función del caudal del citómetro de flujo utilizado, así como del contenido en leucocitos presentes en la muestra puede adaptarse el tiempo de medición a la precisión en cada caso requerida del examen. Los ajustes en el citómetro de flujo pueden elegirse en este caso, p. ej., de manera que siempre se mida durante el tiempo necesario hasta que se detecte un número determinado de perlas o de leucocitos en sucesos de una población de leucocitos especial. En el caso de utilizar la calibración del caudal se define preferiblemente un tiempo de medición determinado.

Ejemplo 3: Determinación de sangre de gallinas

En lo que sigue se describe la realización de una determinación del hemograma en el caso de gallinas utilizando un marcador de pan-leucocitos, un marcador de trombocitos así como marcadores para sub-poblaciones específicas de leucocitos.

En particular, en el caso de PBLs purificados durante la tinción, mediante la combinación de un αCD45 primario y de un αIgG acoplado a fluorocromo, secundario, pueden diferenciarse las tres poblaciones de eritrocitos, trombocitos y leucocitos. En el caso de la tinción de sangre entera y del uso de conjugados directos puede producirse, sin embargo, en el caso del empleo único de un marcador de pan-leucocitos, solapamientos de la población de trombocitos con los leucocitos y de los eritrocitos con los trombocitos, de modo que las distintas poblaciones no pueden ser delimitadas o bien cuantificadas con seguridad.

Mediante la tinción con CD45-FITC/K1 RPE (Figura 1) se consigue una representación segura de trombocitos (A) y leucocitos (B). En la gráfica de puntos FSC-H/SSC-H ya es posible una diferenciación parcial de los leucocitos (B). En este caso, los granulocitos heterófilos se muestran como una población (D) inequívocamente delimitable. Dado que los monocitos pueden ser teñidos débilmente mediante K1, éstos ya se pueden reconocer en la representación FL1-H/FL2-H como población (C). Aún mejor se distinguen los monocitos como población (E) en la representación de todos los leucocitos (B) en la gráfica de FSC-H/SSC-H.

Utilizando marcadores adicionales para sub-poblaciones de leucocitos, p. ej. anticuerpos contra CD4 para la detección de células T colaboradoras, anticuerpos contra CD8α para la detección de células T citotóxicas, anticuerpos contra el receptor de células T γδ (TCRγδ) para la determinación de células T γδ o anticuerpos contra BU1 para la determinación de células B, pueden diferenciarse inequívocamente mediante el procedimiento de acuerdo con la invención sub-poblaciones de leucocitos.

La Figura 2 muestra la evaluación de una muestra de sangre de gallinas teñida con αCD45PerCP, K1RPE, KUL01RPE, αCD4FITC, αCD8αFITC, BU1FITC y αTCRγδFITC. En la representación FL3-H/FL2-H (a) la población de trombocitos (A) está inequívocamente delimitada. Los monocitos (L) CD45PerCP altamente positivos pasan a situarse mediante la tinción con KUL01RPE extremadamente distantes en la zona FL2-H-positiva. En esta representación se distinguen ya las otras sub-poblaciones de los leucocitos (B). La diferenciación se consigue mejor mediante una transferencia a una gráfica FL3-H/FL1-H (b). Los linfocitos B (D) y linfocitos T (E) se pueden determinar por separado. Con el fin de continuar clasificando a los restantes leucocitos CD45PerCP medio-

positivos, se ofrece la representación FSC-H/SSC-H (c). Aquí se pueden reconocer de nuevo tres sub-poblaciones (H), (I) y (K). En virtud de la comparación con hemogramas establecidos al microscopio, así como de la elevada granularidad de las células, la población (H) pudo identificarse como los granulocitos heterófilos. En el caso de las poblaciones (I) y (K) se trata presumiblemente de los granulocitos eosinófilos y basófilos. La subsiguiente identificación de estas poblaciones de células se efectúa experimentalmente con un clasificador de células.

Un resultado similarmente bueno se puede también conseguir renunciando al empleo del KUL01 para la identificación de los monocitos. La Figura 3 muestra la evaluación de la muestra teñida con los anticuerpos α CD45PerCP, K1RPE, α CD4 FITC, α CD8 α FITC, BU1FITC y α TCR $\gamma\delta$ FITC. Los resultados coinciden esencialmente con los resultados de la tinción llevada a cabo en la misma muestra de sangre y que incluye al anticuerpo KUL01 (Figura 2). La única diferencia esencial consiste en la identificación de los monocitos. Éstos se encuentran en la tinción exenta de KUL01 en la puerta F. Los ajustes de FSC-H/SSC-H más óptimos con respecto a la medición de la Figura 2, permiten además, la identificación de los monocitos (en azul) en virtud de sus características FSC-H/SSC-H (Figura 4).

Para la documentación más completa de las características de las distintas poblaciones de células identificables se estableció una tabla (Figura 5). En ella, están contenidas todas las posibles variantes de gráficas de puntos por permutación de los parámetros FSC-H, SSC-H, FL1-H, FL2-H y FL3-H de la medición ya conocida por la Figura 2. El hecho de que todas las poblaciones hechas reconocibles por diferentes colores aparezcan en cualquier representación posible como nubes de puntos que actúan de forma natural, demuestra que la técnica de tinción aplicada, identifica poblaciones de células realmente existentes que, por una parte, son homogéneas en todos los parámetros y que, por otra parte, se diferencian entre sí al mismo tiempo en uno o varios parámetros.

En el caso de la combinación de anticuerpos representada en este caso, pasan a emplearse diferentes anticuerpos caracterizados con el mismo colorante.

Sin embargo, dado que, p. ej., los linfocitos B se tiñen con mayor intensidad con BU1FITC que lo que lo hacen las células T citotóxicas con α CD8 α FITC, las células T colaboradoras con α CD4 FITC y los linfocitos T $\gamma\delta$ con α TCR $\gamma\delta$ FITC, pueden diferenciarse a pesar de ello de los otros linfocitos (Figura 2, población (D), Figura 3, población (D)). Esto se facilita, además, debido a que los linfocitos B se tiñen con menor intensidad con α CD45 FITC que los otros tipos de células mencionados.

Por otra parte, con el procedimiento pueden representarse como un grupo también varias poblaciones de células con diferentes marcadores, los cuales, sin embargo, están acoplados con el mismo colorante. En el caso de la combinación de anticuerpos aquí mostrada, esto tiene lugar para la suma de los linfocitos T, cuyas sub-poblaciones son marcadas mediante los anticuerpos α CD4, α CD8, α TCR $\gamma\delta$ (Figura 2, población (E), Figura 3, población (E)).

La identificación de las diferentes poblaciones de células en la evaluación gráfica de los datos de medición requiere la aplicación de "estrategias de marcación". La marcación puede realizarse manualmente en la evaluación de los datos de medición con ayuda de un software para el tratamiento de datos de citometría de flujo. Sin embargo, alternativamente, esto también puede tener lugar en forma de un análisis de datos automatizado.

La Figura 6 muestra una estrategia de marcación para muestras de sangre no fijadas antes de la tinción. Esta estrategia fue optimizada de manera que también pudieran analizarse con ella muestras recientemente fijadas (Figura 7). En la representación FL3-H/FL2-H se determinan eritrocitos (A), trombocitos (B), perlas (C) y leucocitos (D) como poblaciones. En caso necesario, los trombocitos (B) se transfieren a una gráfica de puntos FSC-H/FL2-H con el fin de examinar la muestra en cuanto a un contenido incrementado de agregados de trombocitos (población G). Este contenido puede apuntar a una extracción defectuosa de sangre. Los leucocitos (D) se transfieren a dos representaciones diferentes. En la gráfica de puntos FSC-H/SSC-H se determinan los granulocitos heterófilos como población (H). En la gráfica de puntos FSC-H/FL1-H se separan entre sí las poblaciones (I) y (K). La representación de (I) en la gráfica FL3-H/FL1-H permite la diferenciación de linfocitos B (L) y linfocitos T (M). En la gráfica FL3-H/FL2-H pueden determinarse a partir de la población (I) también los agregados de linfocitos-monocitos. A partir de la población (K) se retiran en la gráfica FSC-H/SSC-H los granulocitos. Las células remanentes (N) se pueden subdividir en la gráfica FL3-H/FL2-H en monocitos (O) y leucocitos restantes (P) (granulocitos basófilos, granulocitos eosinófilos). Las perlas (C) se examinan en el histograma de FL3-H en cuanto al porcentaje de agregados (F).

En esencia, muestras recientemente fijadas y medidas en el espacio de una pocas horas pueden evaluarse según el esquema recién descrito. Únicamente la marca N debería disponerse de una manera algo distinta.

Si las muestras se miden al tercer día después de la fijación, el protocolo de marcación debería adaptarse (Figura

8). Dado que los granulocitos heterófilos han desarrollado en este instante una fluorescencia FL1-H, éstos son identificados entonces a partir de la población (I) en la gráfica FSC-H/SSC-H como población (H). A partir de la población (R) remanente pueden determinarse en la gráfica FL3-H/FL1-H linfocitos B (L) y linfocitos T (M). La población (K) se puede dividir, en la gráfica FSC-H/FL2-H, en leucocitos restantes y monocitos. Después de la transferencia de la población (H) a una gráfica FL3-H/FL1-H pueden representarse agregados (Q) a base de granulocitos heterófilos y linfocitos. En la gráfica FL3-H/FL1-H se pueden diferenciar en este caso agregados con linfocitos T (T) y linfocitos B (S).

Alternativamente a la tinción recogida en la Tabla 1, pueden emplearse otros anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales ya mencionados se pueden reemplazar por marcadores equivalentes que estén dirigidos contra los mismos antígenos o que tiñan al menos a las mismas poblaciones.

P.ej.

Clon CT4 por clon 3-298,
K1 por α CD41/CD61 (clon 11C3) o α CD51/61 (clon 23C6).
KUL01 por clones galectina-8.

Otros anticuerpos pueden ser reemplazados incluso por marcadores que representan otras poblaciones:

p. ej., la combinación α TCR $\gamma\delta$, α CD8 y α CD4 puede ser reemplazada por α CD3 con el fin de marcar la suma de los linfocitos T. Como otra alternativa, puede pasar a emplearse una combinación a base TCR $\gamma\delta$, TCR $\alpha\beta$ (V β_1) y TCR $\alpha\beta$ (V β_2). No obstante, ambas alternativas conducen a una tinción algo más débil. Alternativamente, también podría pasar a emplearse la combinación a base de α CD28 (clones 2-4) y TCR $\gamma\delta$. Otros marcadores de linfocitos aprovechables para el procedimiento son clones α CD5 tales como 2-191 así como clones α CD6 tal como S3 y clones α CD11a tal como HUH73A (adquirible de WSU Monoclonal Antibody Center).

En el caso de utilizar un citómetro de flujo con 2 o más láseres, se puede ampliar la tinción. Así, p. ej. en el caso de utilizar un conjugado detectado en el cuarto canal de fluorescencia, puede determinarse por separado una población de células adicional. Mediante el empleo de los más modernos citómetros de flujo pueden emplearse hasta 18 colorantes de fluorescencia diferentes y, con ello, representarse una pluralidad de las más diversas poblaciones de células. En el caso de emplear un aparato de este tipo podrían caracterizarse y cuantificarse con mayor precisión, p. ej., las diferentes poblaciones de linfocitos.

Para algunos de los marcadores disponibles se conoce que éstos reaccionan de manera cruzada con los correspondientes antígenos de otras especies de aves:

Reactividad cruzada con células de pollos de la pradera o bien pavos fue descrita para los clones de α CD8 3-292, 3-298 y EP72, así como para los clones de α CD4 2-35, 7-125 y CT4, así como para K1 y K55. K1 reacciona también con células de ánades y 23C6 detecta incluso células humanas. El clon de α CD11a HUH73A mostró reactividad cruzada con muchas especies diferentes. Con algunos de los anticuerpos ya mencionados debería poder elaborarse, al menos en el caso del pavo, un hemograma de glóbulos blancos. Una determinación del número total de leucocitos y del número total de trombocitos con una diferenciación parcial de leucocitos debería ser posible con ayuda de los clones K1 y 23C6 también en el caso de especies más lejanamente emparentadas, en la medida en que uno de los marcadores de pan-leucocitos conocidos reaccione de manera cruzada o sea preparado de nuevo.

Mediante el empleo combinado de un marcador de pan-leucocitos (p. ej. 16-6, LT40 o K55) y de un marcador de trombocitos (K1, α CD41/CD61, α CD51/61) se posibilita, sin embargo, también en el caso de la tinción directa de sangre entera, una delimitación segura de las poblaciones de eritrocitos, trombocitos y leucocitos.

En comparación con la microscopía (proceso estimativo modificado según Campbell, evaluación de 20 campos de visión en lugar de 5) pudo demostrarse experimentalmente ya la precisión considerablemente elevada del nuevo procedimiento de citometría de flujo. Para ello, de una muestra de sangre de gallina, por el mismo investigador se hizo un recuento microscópico de 10 frotis.

Otra muestra de sangre se dividió en partes alícuotas y se preparó y midió 10 veces según la nueva técnica de citometría de flujo. Los coeficientes de variación (CV) de la nueva técnica se encontraban, como era de esperar, bastante por debajo de los de la microscopía (Tablas 2 y 3). Dado que el ensayo no fue llevado a cabo todavía bajo condiciones óptimas, se ha de partir del hecho de que la precisión del procedimiento puede ser incluso aumentada todavía de manera clara. La Figura 21 muestra una comparación de la precisión de la microscopía y la citometría de flujo.

Tabla 2: Precisión de la estimación de leucocitos al microscopio

Factor HKL 0,87

Trombocitos	Σ leucocitos	Linfocitos	Monocitos	Heterófilos	Basófilos	Eosinófilos	Blastocitos
51333	35883	26047	4377	3487	996	676	0
67083	37333	25200	6048	2725	2464	709	261
64167	42583	28190	8048	3705	1916	724	0
70000	38500	23370	8047	4620	1309	886	270
70000	47250	29626	9970	3922	2552	756	425
74083	29167	19658	4579	2654	1254	875	117
65917	39083	24075	9067	2345	2462	860	274
54833	27417	17245	6196	2440	1042	494	55
54250	30917	18117	6709	3401	1268	1329	93
53667	37333	22027	8699	3845	1568	1120	75

Trombocitos	Σ leucocitos	Linfocitos	Monocitos	Heterófilos	Basófilos	Eosinófilos	Blastocitos
VM 62533	36517	23356	7174	3314	1683	843	157
VE 7821	5770	3925	1796	709	585	225	135
VC 12,5%	15,8%	16,8%	25,0%	21,4%	34,7%	26,7%	85,9%

Tabla 3: Precisión del recuento de leucocitos por citometría de flujo

Trombocitos	Σ leucocitos	Linfocitos	Linfocitos T	Heterófilos	Monocitos	Células B	Basófilos
34741	18916	16291	15724	1482	1017	552	140
35271	18938	16003	15519	1637	1181	470	131
38684	20618	17611	17132	1617	1215	470	184
37164	19746	16667	16163	1598	1327	484	174
36465	19802	16809	16296	1501	1327	513	165
36120	20138	17198	16728	1560	1259	460	131
35423	19867	16830	16370	1477	1458	455	107
37227	20453	17103	16628	1816	1395	455	160
37599	20465	17129	16644	1642	1550	470	160
36278	19819	16551	16037	1569	1598	499	116

Trombocitos	Σ leucocitos	Linfocitos	Linfocitos T	Heterófilos	Monocitos	Células B	Basófilos
VM 36497	19876	16819	16324	1590	1333	483	147
VE 1136	559	446	461	95	167	29	24
VC 3,1%	2,8%	2,7%	2,8%	6,0%	12,5%	6,1%	16,5%

En otro experimento se obtuvieron muestras de sangre de 10 gallinas y se examinaron en una tanda triple. Una parte alícuota de cada una de las muestras se tiñó y analizó ya pocas horas después de la extracción. Otra parte de la muestra se fijó con Transfix. Algunas horas después de la fijación, se tiñó una parte alícuota de la muestra fijada y se analizó por citometría de flujo. Otra tinción con una subsiguiente medición tuvo lugar entonces al tercer día después de la extracción/fijación. Adicionalmente, de cada una de las 10 muestras de sangre se preparó un frotis de sangre y, después de la tinción, se examinó con el procedimiento de estimación según Campbell. En todas las muestras se manifestó en el experimento para todas las poblaciones de células una coincidencia muy buena entre las distintas mediciones por citometría de flujo (no fijada/fijada día 0/fijada día 3) (Figuras 13-19 y 22). Las mayores desviaciones con respecto a los valores determinados con el procedimiento microscópico apuntan a su peor precisión.

Ejemplo 4: Ampliaciones del procedimiento

Mediante el empleo de marcadores contra otras células (granulocitos eosinófilos, células NK, etc.) puede ampliarse la diferenciación de leucocitos. La base de ello lo crea el procedimiento mediante la extensa diferenciación de los leucocitos en la forma aquí ya descrita. En el caso de utilizar un clasificador de células y de aprovechar la tinción arriba descrita pueden aislarse poblaciones de células y aprovecharse para el examen ulterior (p. ej. análisis de expresión de genes), para la aplicación de cultivos de células o para la generación de anticuerpos monoclonales específicos. Dado que, en particular PerCP en el caso de los distintos clasificadores sólo puede ser empleado bajo determinadas condiciones en virtud de la propensión al “fotoblanqueo”, se aconseja en este caso reemplazar el conjugado α CD45-PerCP por un anticuerpo acoplado con otro colorante. Si en el caso de la clasificación de células no es necesaria cuantificación absoluta alguna, se ofrece utilizar un α CD45 marcado con biotina. En unión con éste, puede pasar a emplearse como conjugado de estreptavidina el colorante más adecuado. En virtud de la mayor intensidad de color por parte de la tinción indirecta, es de esperar en este caso una diferenciación de CD45 muy clara que, de nuevo, posibilita un buen resultado de la separación de células.

La técnica descrita en esta memoria puede combinarse también con otros colorantes, p. ej. para la discriminación de vivos/muertos (yoduro de propidio, 7AAD, etc.) o, p. ej., con colorantes afines a la membrana DiOC₅(3). En particular, en el caso de la ausencia de marcadores de pan-leucocitos correspondientes para diferentes especies, podría manifestarse valiosa la combinación de un marcador de trombocitos con DiOC₅(3) para la representación de leucocitos.

En el caso de utilizar un citómetro de flujo moderno tal como el CyAn ADP 7/9 Color (Beckman Coulter) con caudales de hasta 50.000 ev/s se puede acortar considerablemente el tiempo de medición en comparación con el FACScan (3.500 ev/s). Esto mejora la rentabilidad del procedimiento o bien aumenta, al alcanzar mayores números de células por medición, la precisión de la medición individual. Mediante el empleo de un autocargador (en forma de carrusel para tubitos o en el formato de placas de 96 pocillos) se puede mejorar asimismo la rentabilidad del procedimiento. Esto mismo es válido para la renuncia a perlas para la cuantificación absoluta en el caso de utilizar un citómetro de flujo con capacidad de un recuento volumétrico real o bien la aplicación de una calibración del caudal.

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento para la determinación del número total de leucocitos en la sangre de aves o gallináceas, que comprende las etapas:
- 5 (a) habilitación de una muestra de sangre no coagulada,
(b) eventualmente, fijación de la muestra,
(c) dilución de la muestra,
(d) puesta en contacto de la muestra diluida con un marcador de pan-leucocitos y un marcador de trombocitos,
(e) medición de la muestra en un citómetro de flujo sin etapas de lavado ni purificación previas y
10 (f) determinación cuantitativa de la población de leucocitos así como de la población de trombocitos en la muestra.
- 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que se determinan muestras de sangre entera tratadas con ≥ 4 mg/ml de EDTA.
- 15 3.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por que el marcador de pan-leucocitos se elige de los anticuerpos anti-CD45, 16-6, LT40 y K55, y por que el marcador de trombocitos se elige de los anticuerpos K1, anti-CD41/CD61 y anti-CD51/CD61.
- 4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que en la etapa (e) se lleva a cabo, además, un análisis de dispersión/difracción frontal y lateral de las células.
- 20 5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que en la etapa (e) se lleva a cabo, además, una determinación de sub-poblaciones de leucocitos.
- 25 6.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que las sub-poblaciones de leucocitos se eligen de
- monocitos
 - células T colaboradoras
 - células T citotóxicas
 - células T $\gamma\delta$
 - 30 - células B
 - células NK
 - granulocitos basófilos
 - granulocitos eosinófilos
 - granulocitos heterófilos/neutrófilos
 - 35 - células madre
- y combinaciones de los mismos.

Figura 1

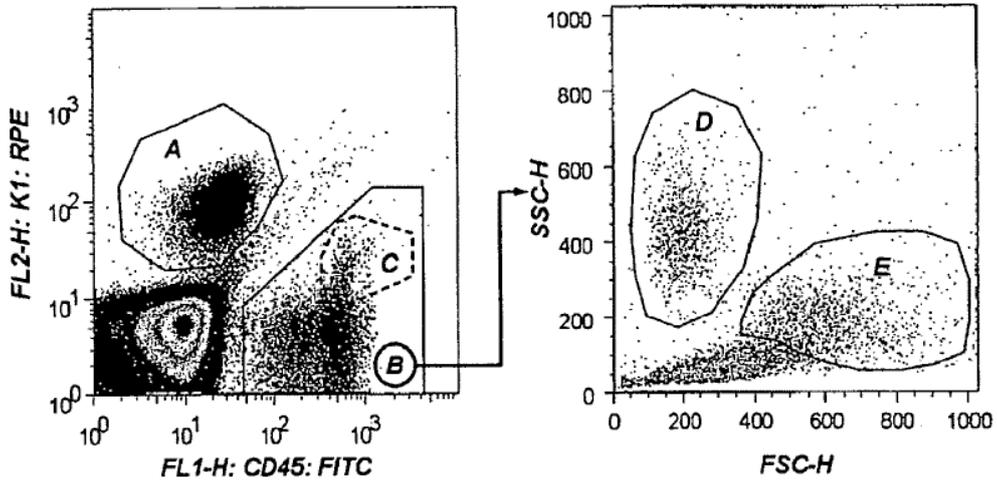


Figura 2

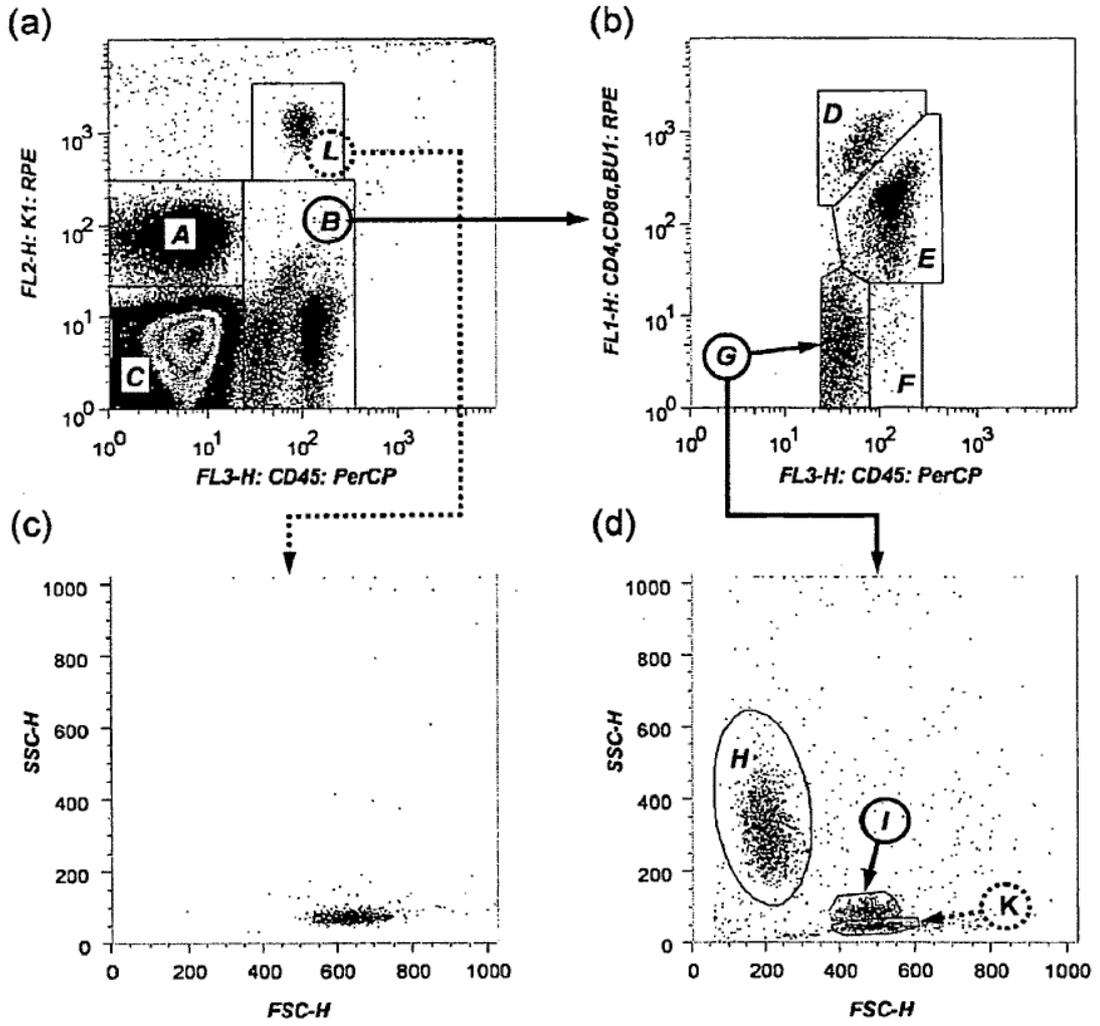


Figura 3

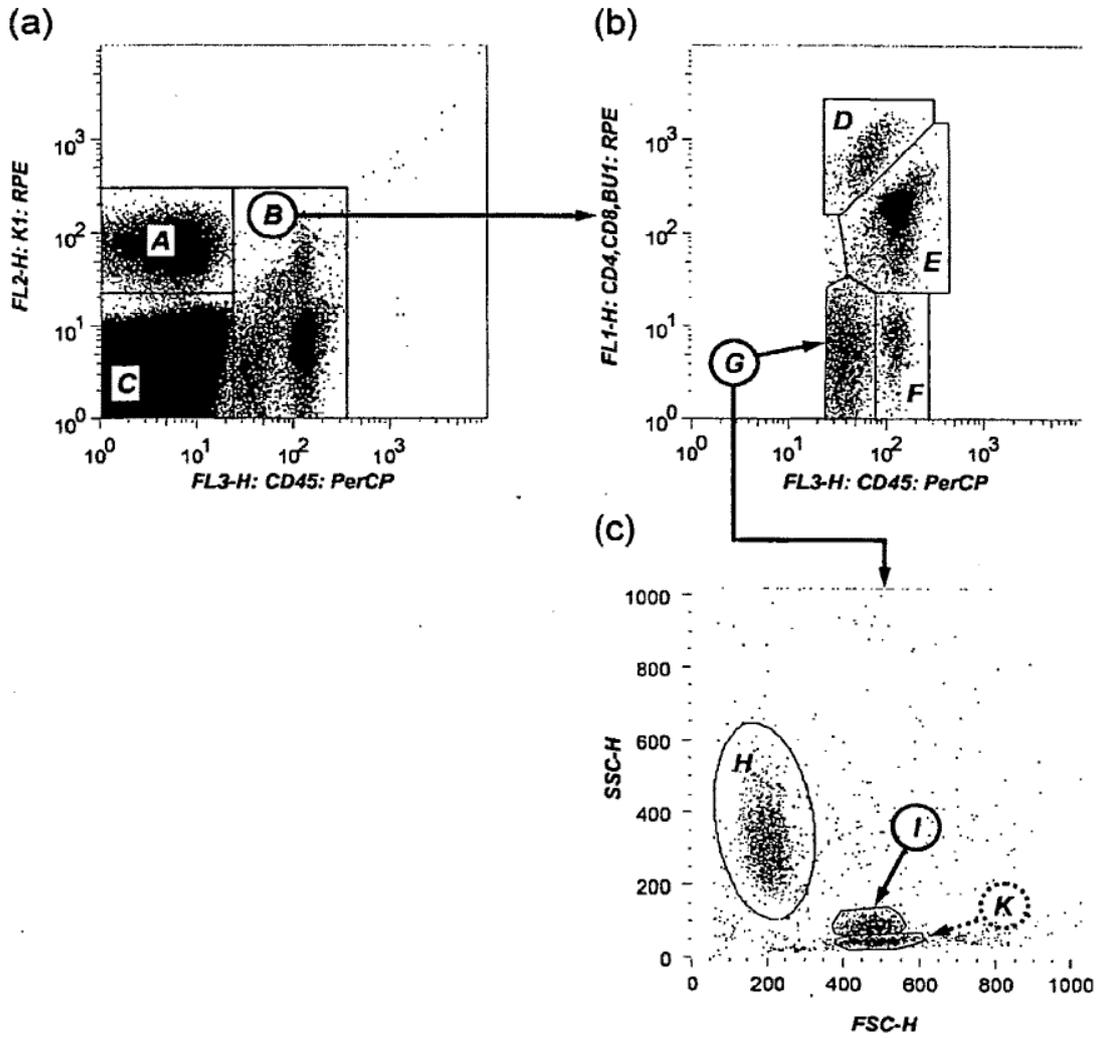


Figura 4

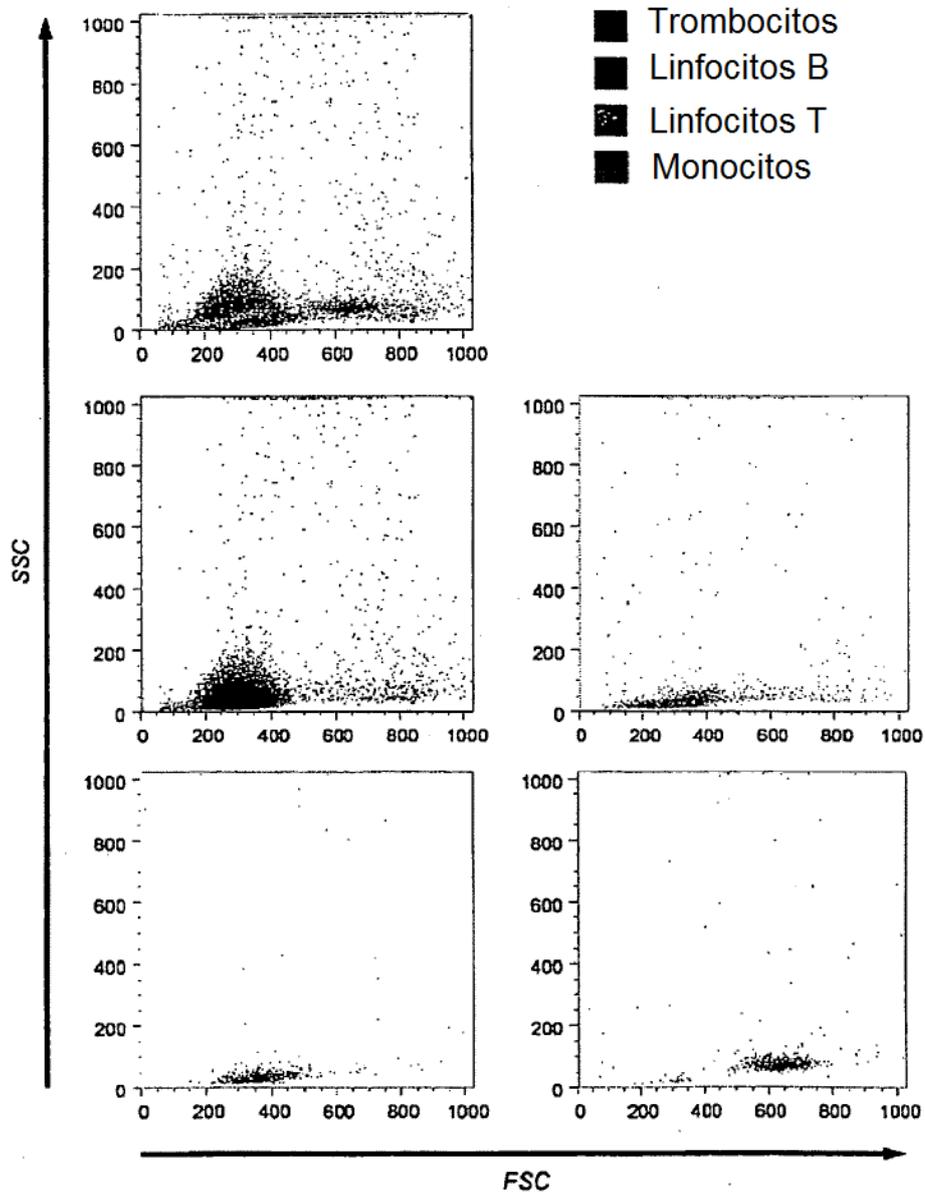


Figura 5

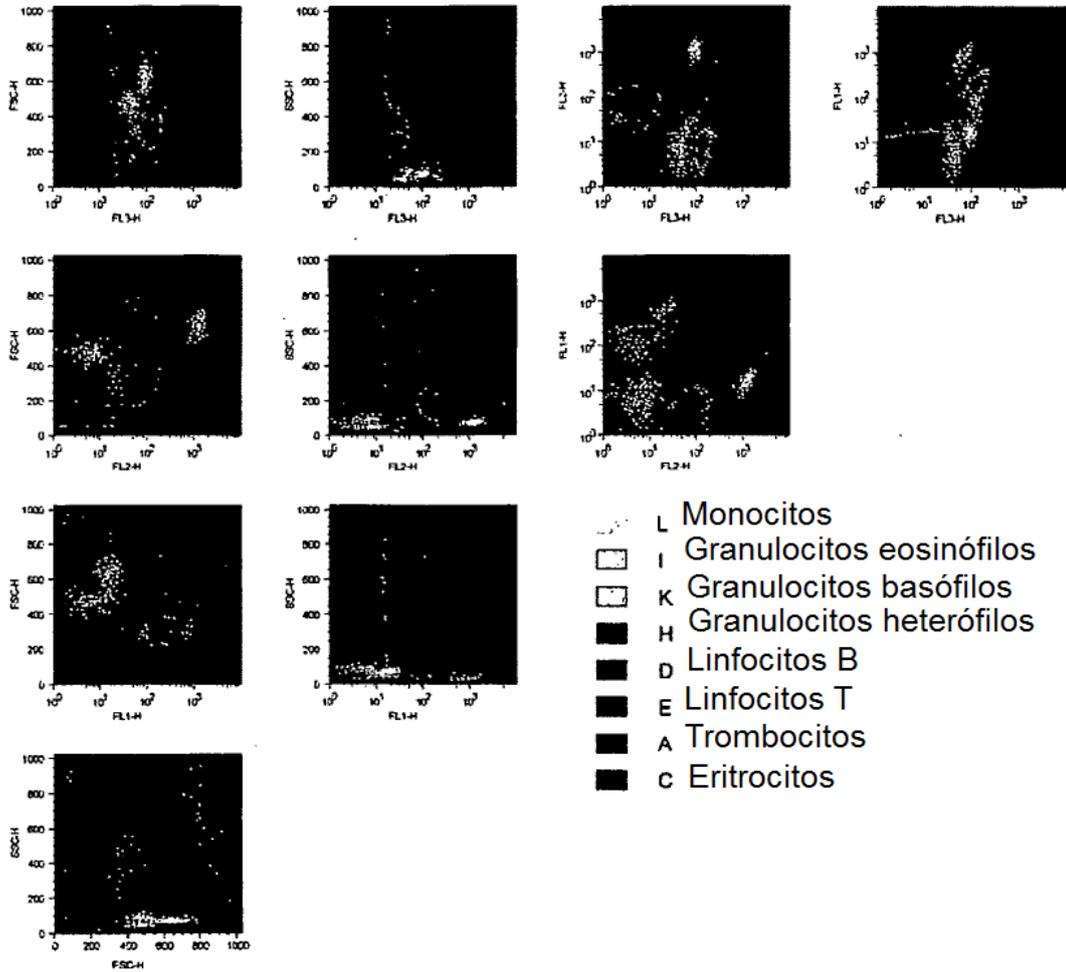


Figura 6

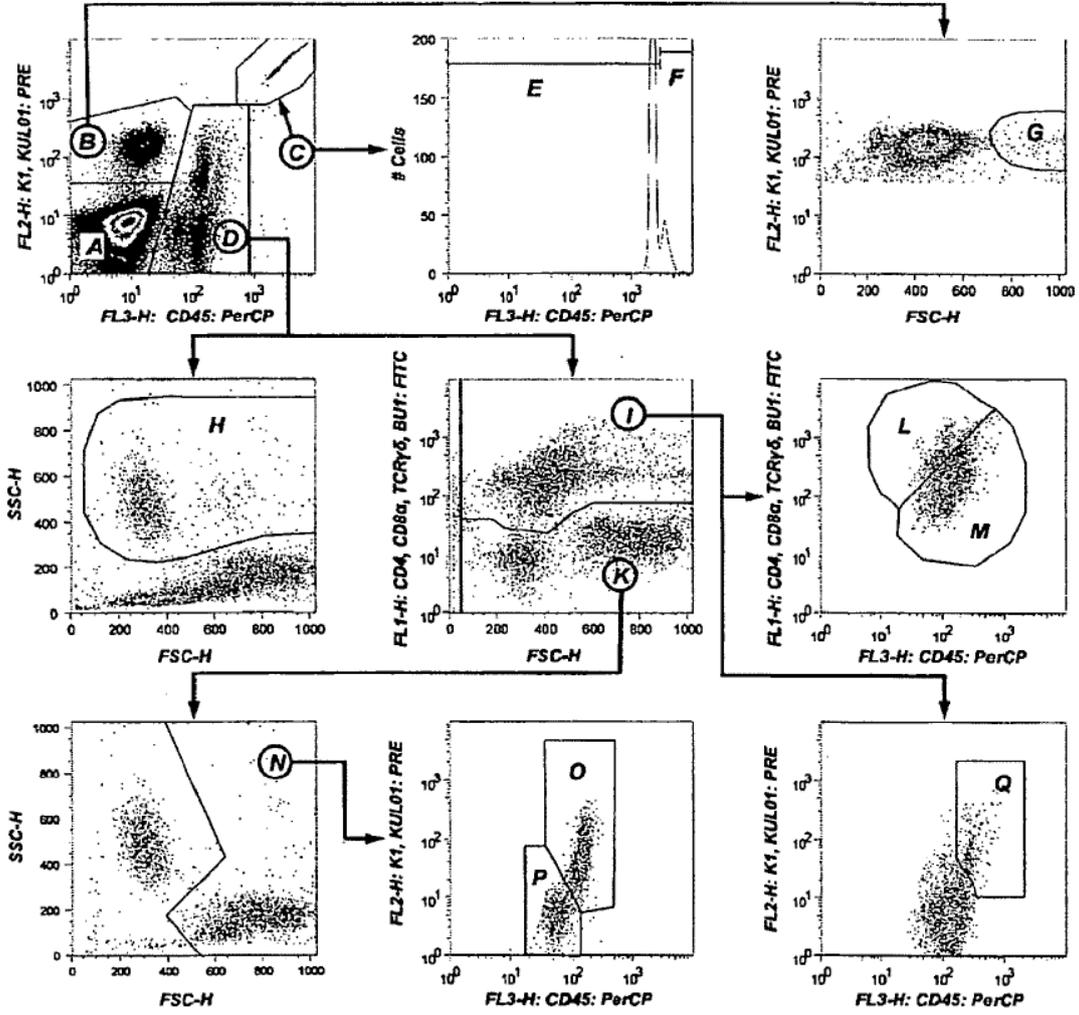


Figura 7

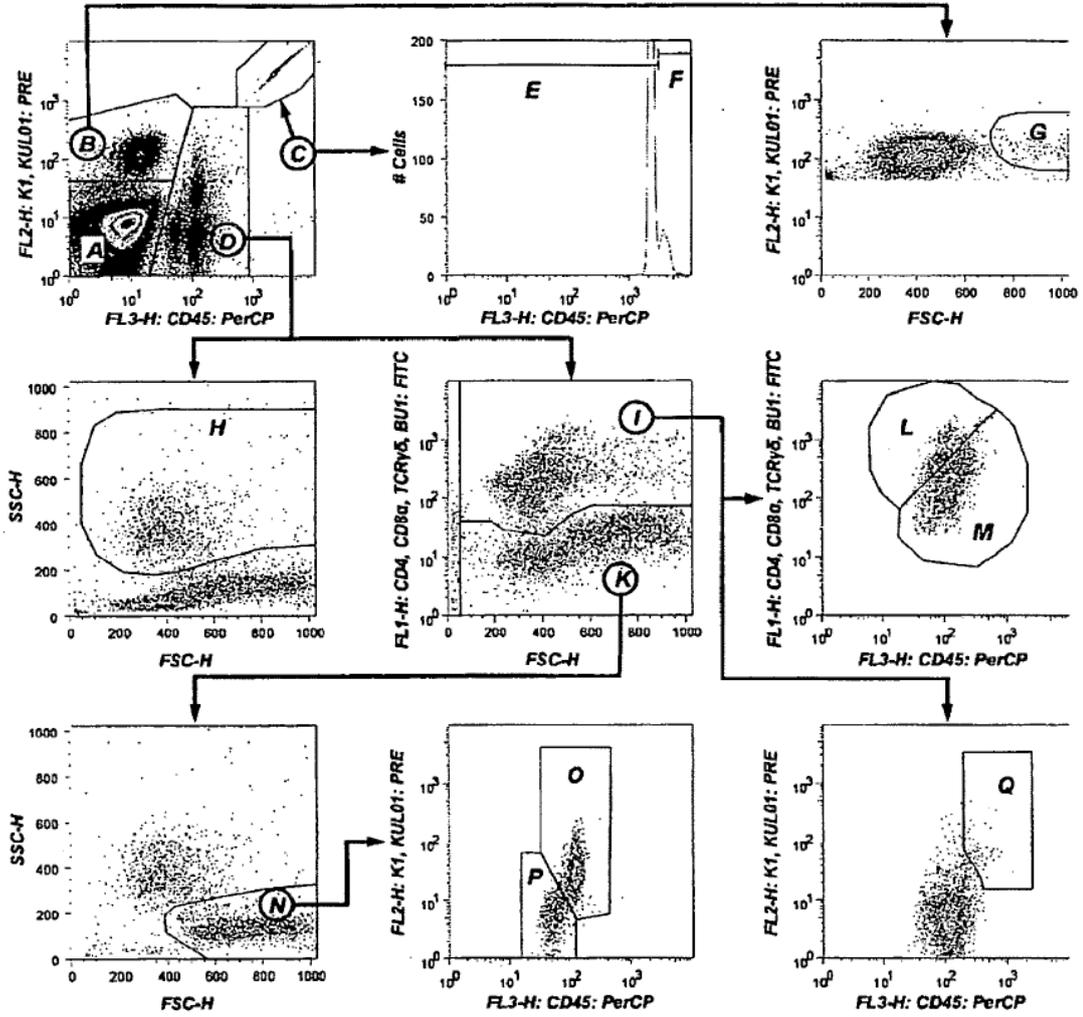


Figura 8

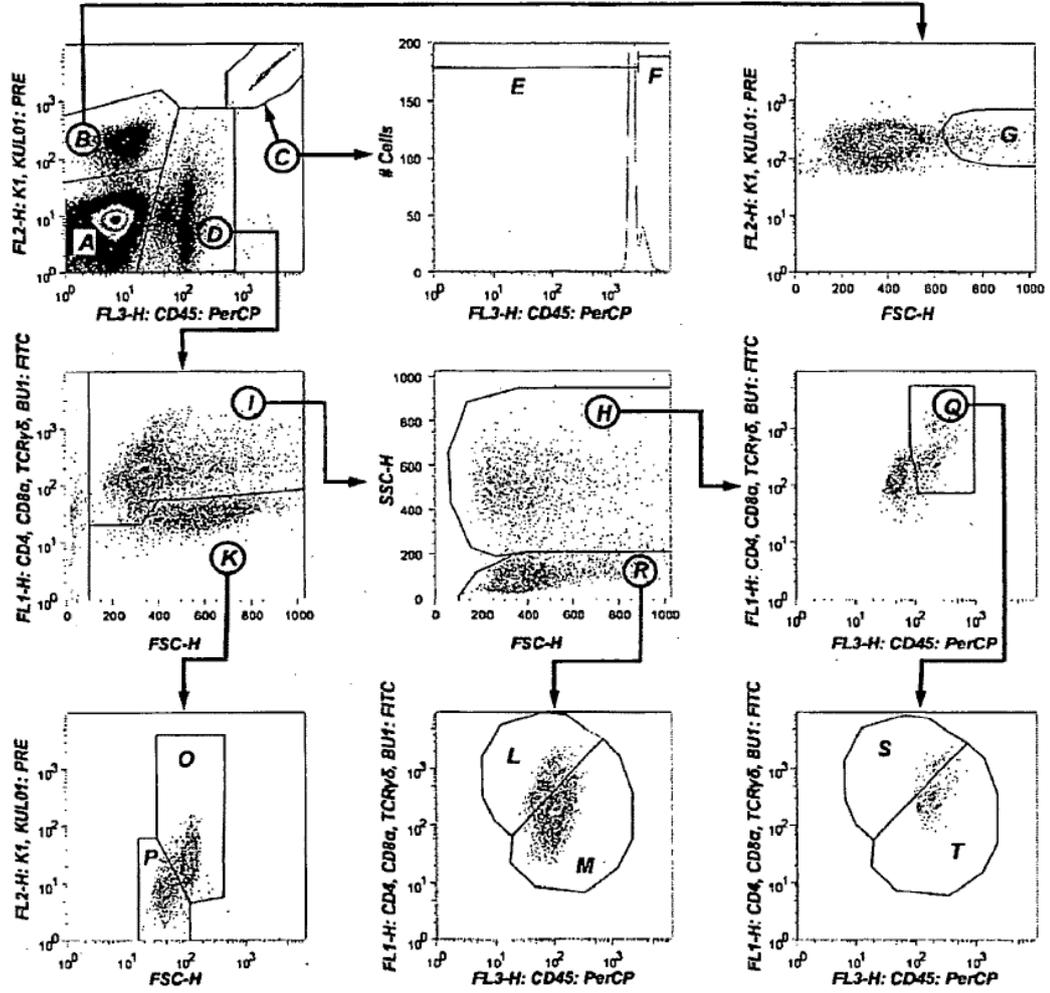


Figura 9

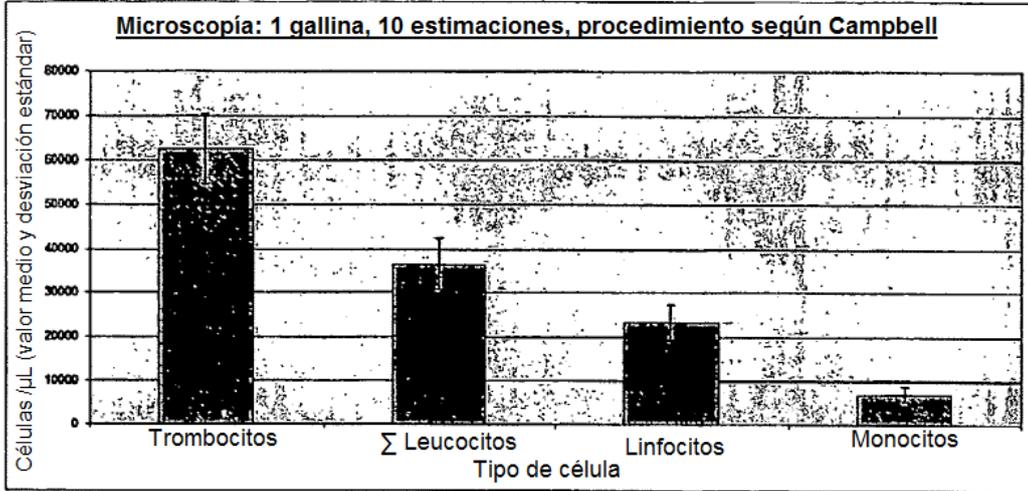


Figura 10

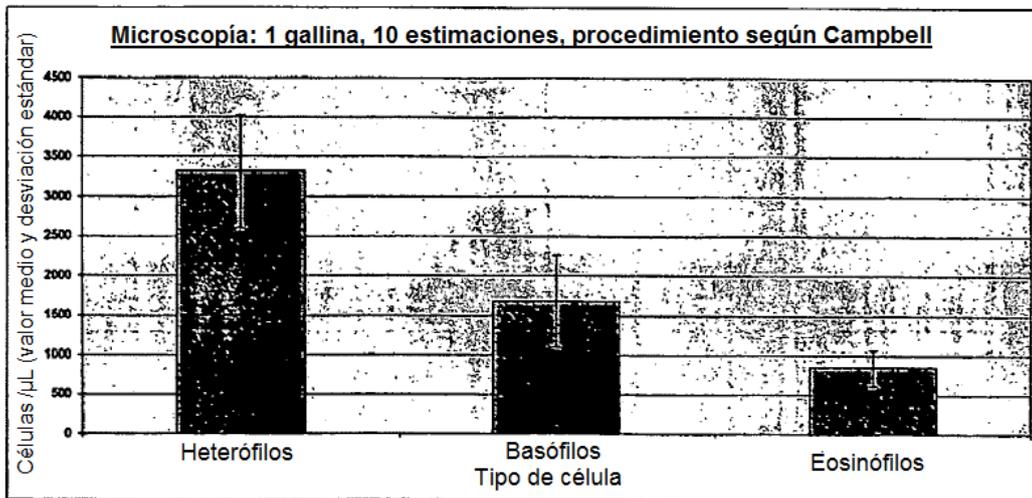


Figura 11

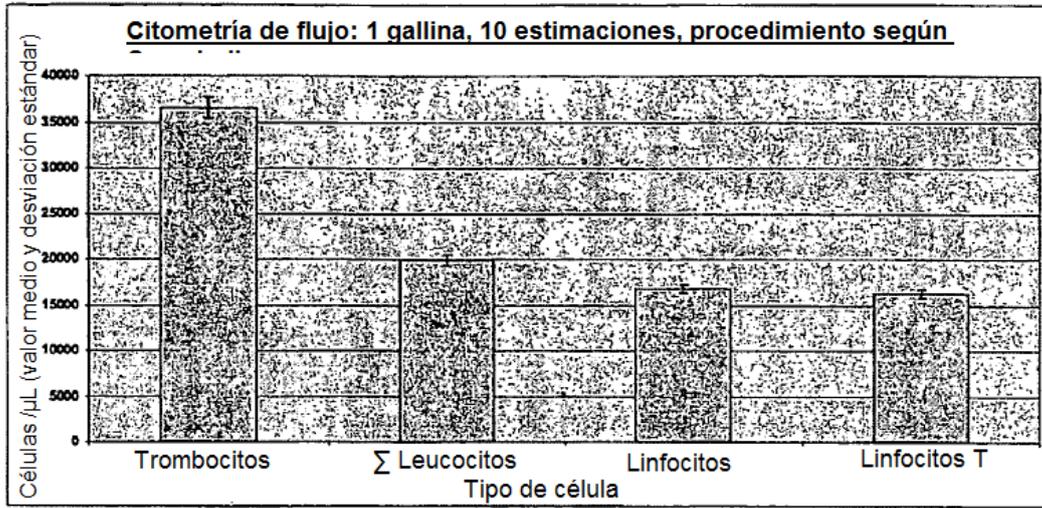


Figura 12

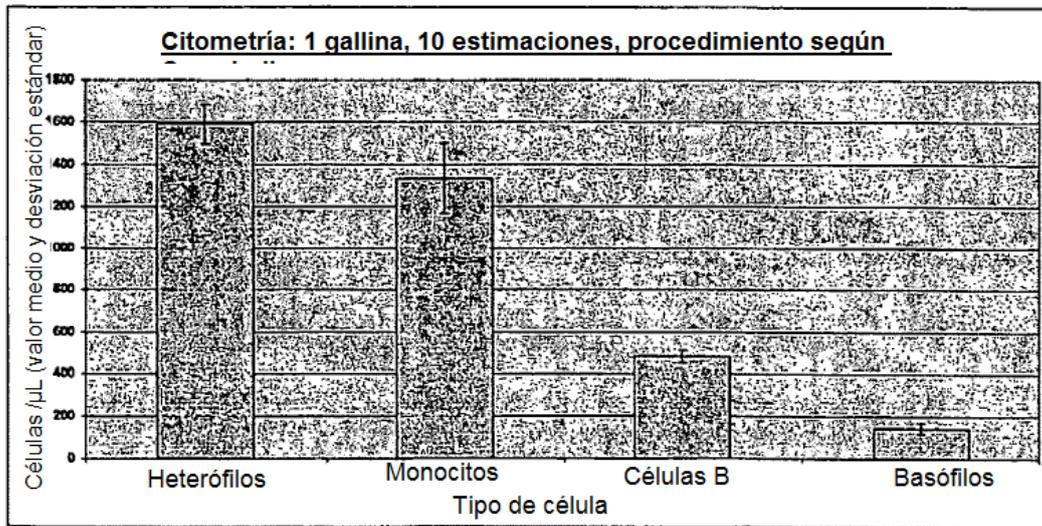


Figura 13

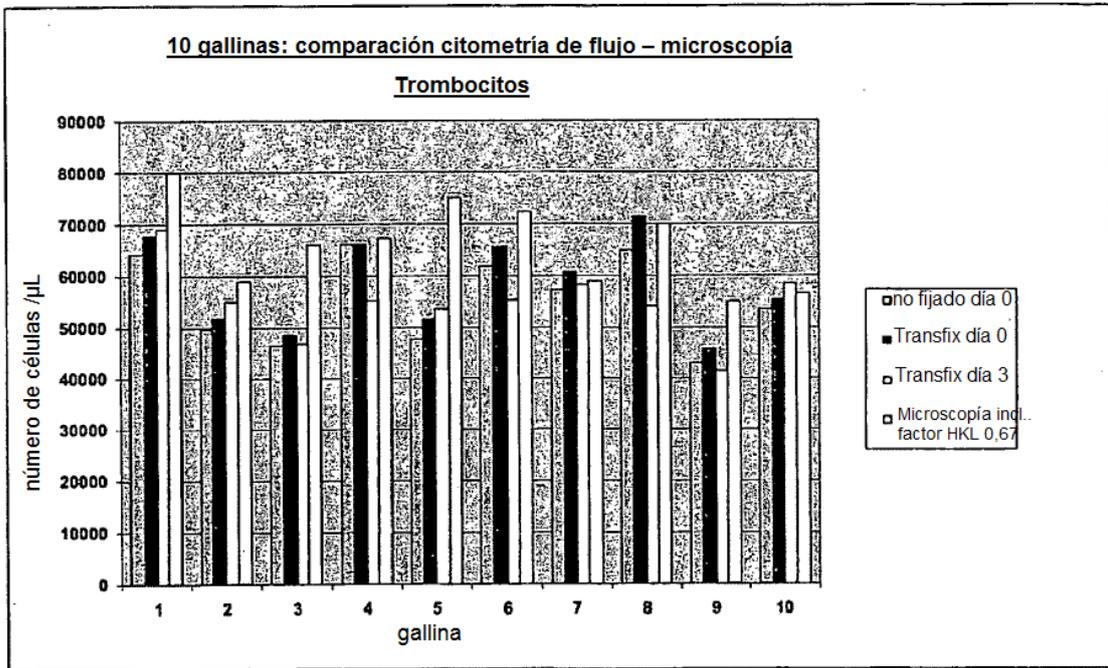


Figura 14

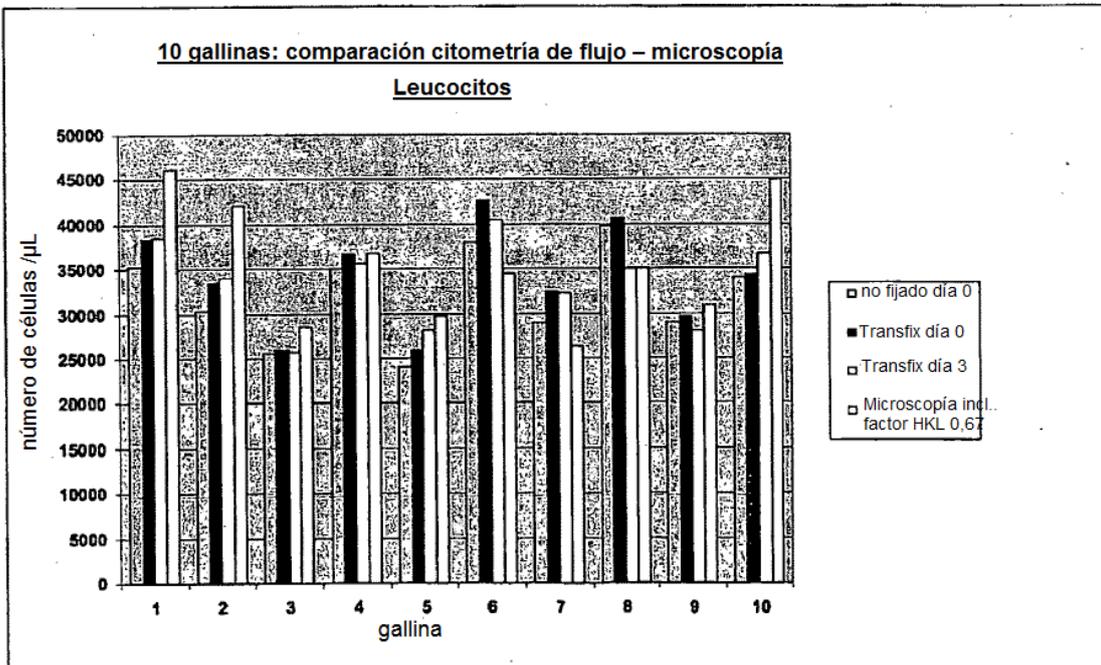


Figura 15

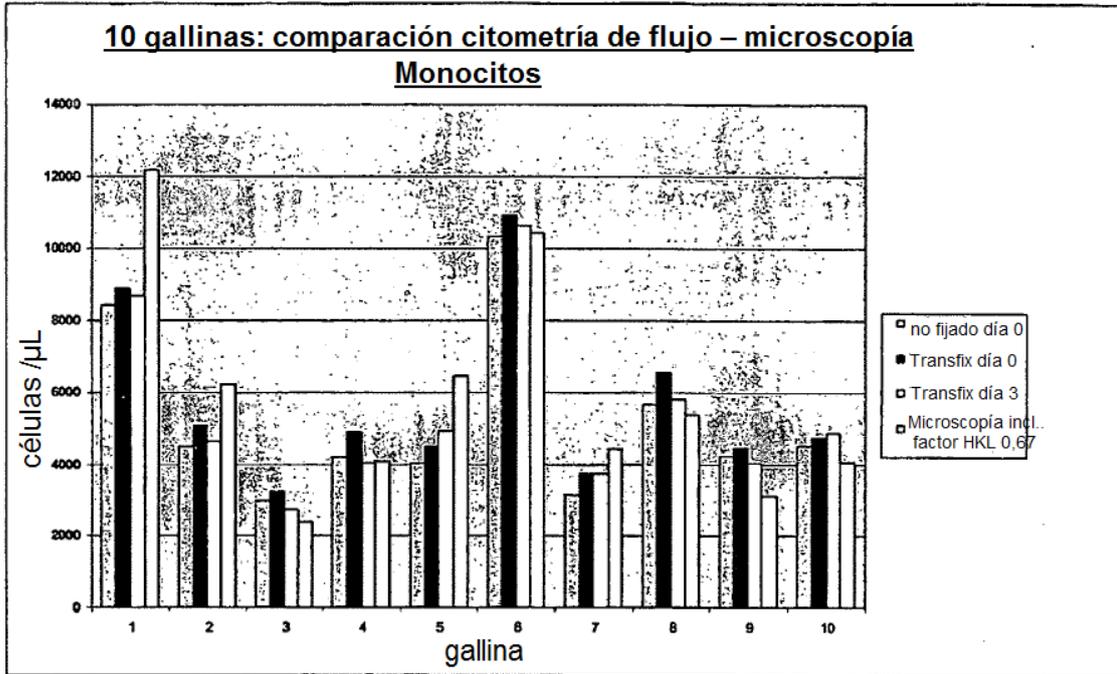


Figura 16

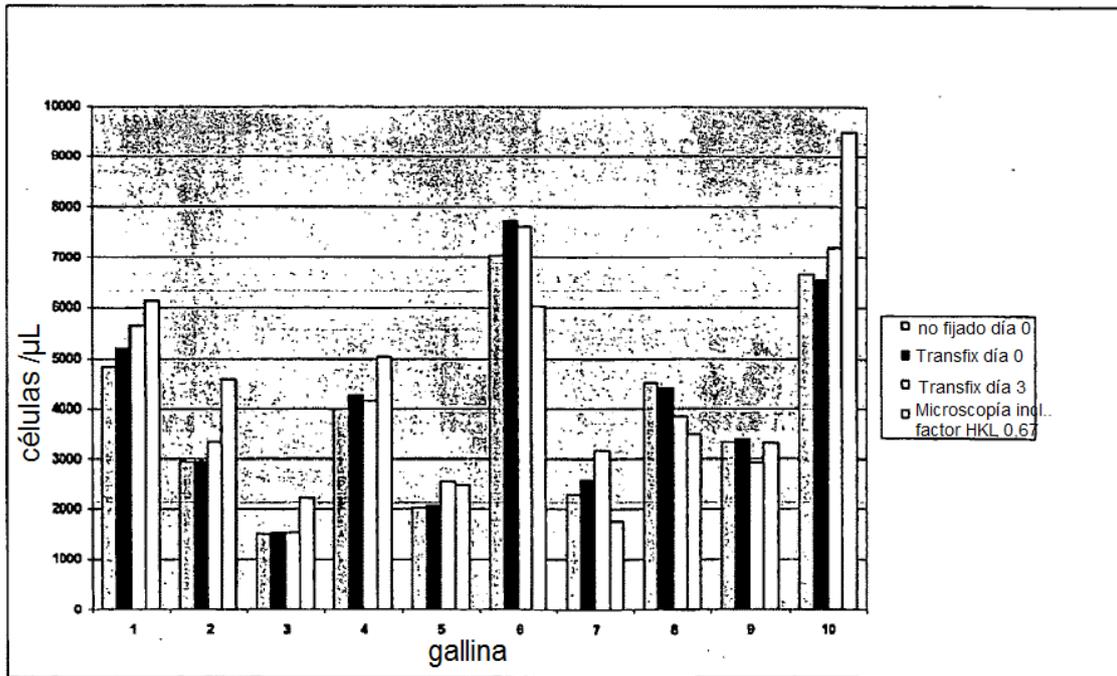


Figura 17

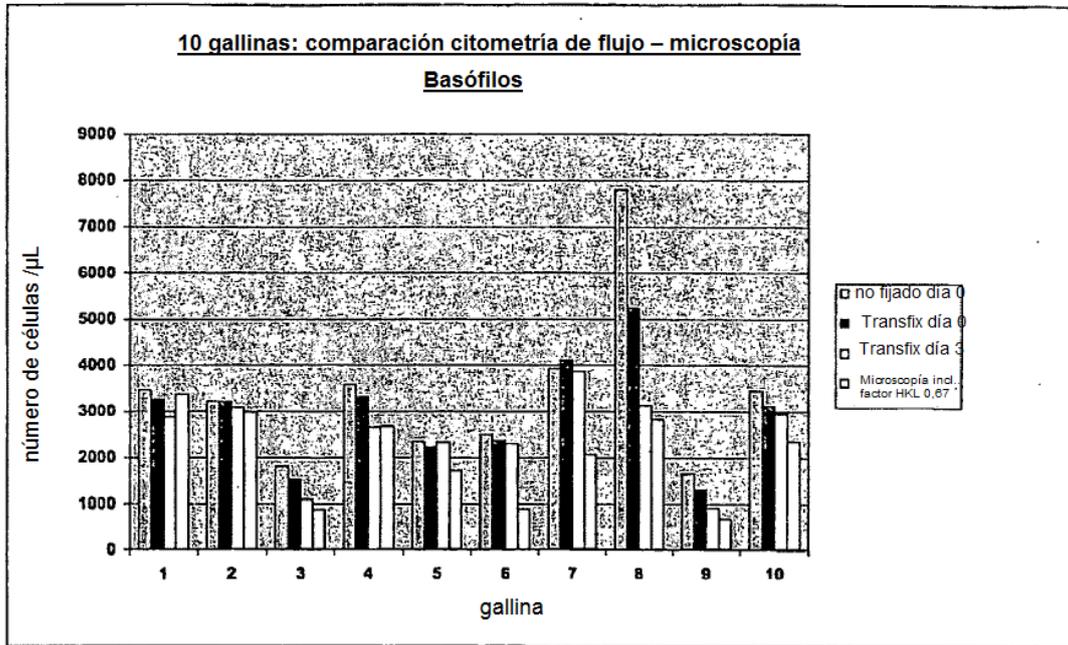


Figura 18

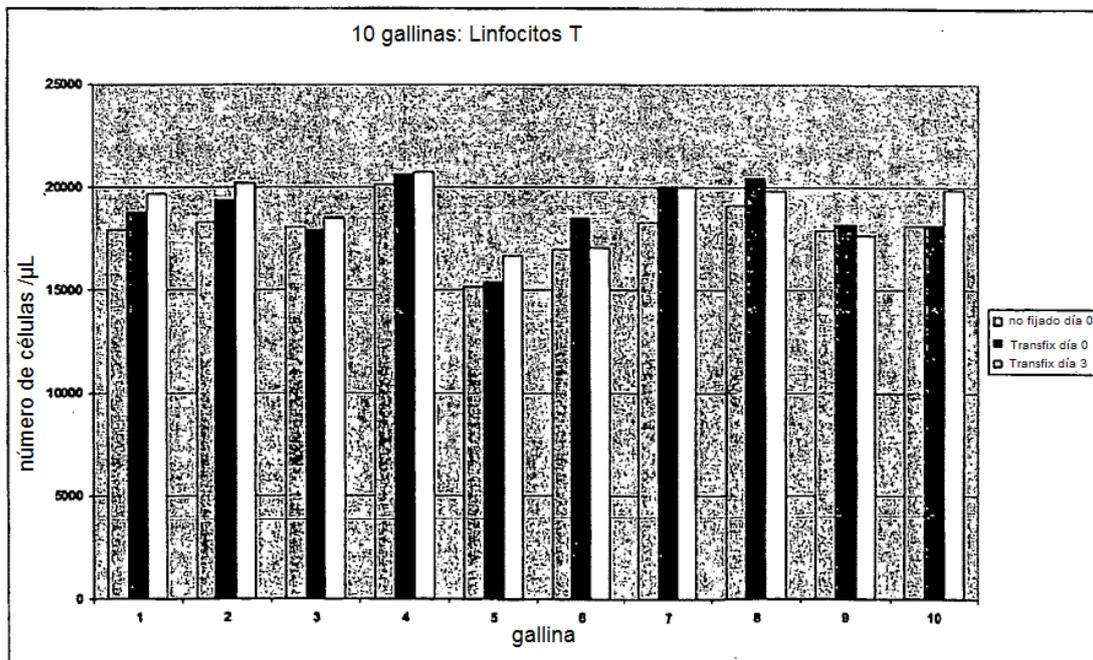


Figura 19

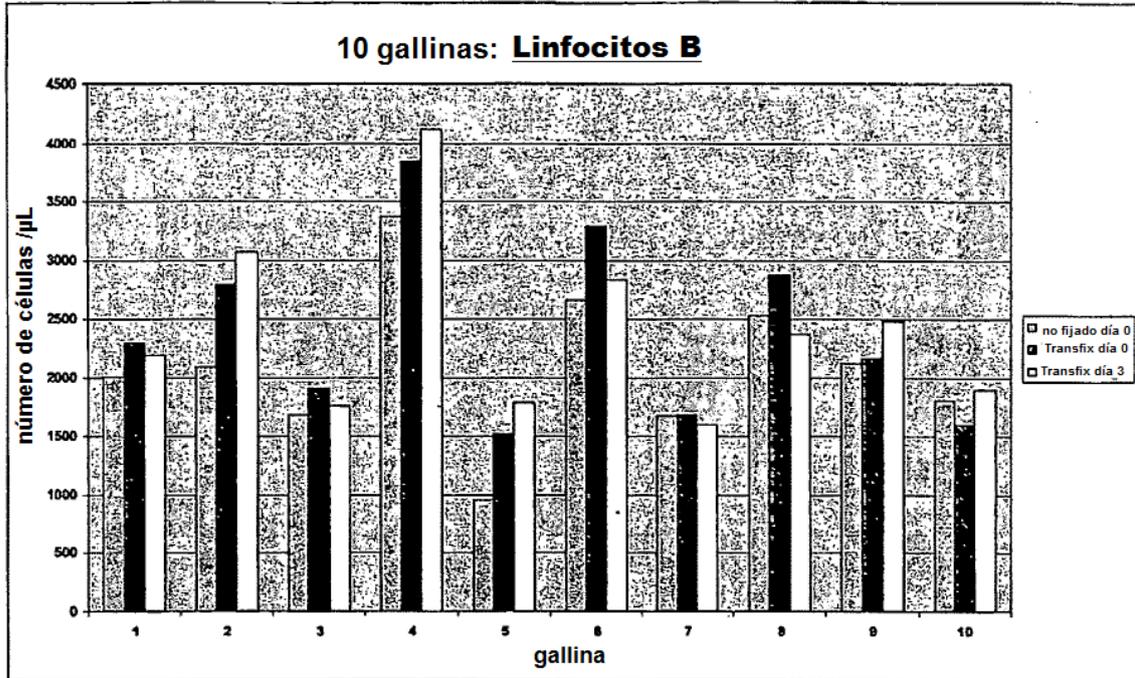


Figura 20

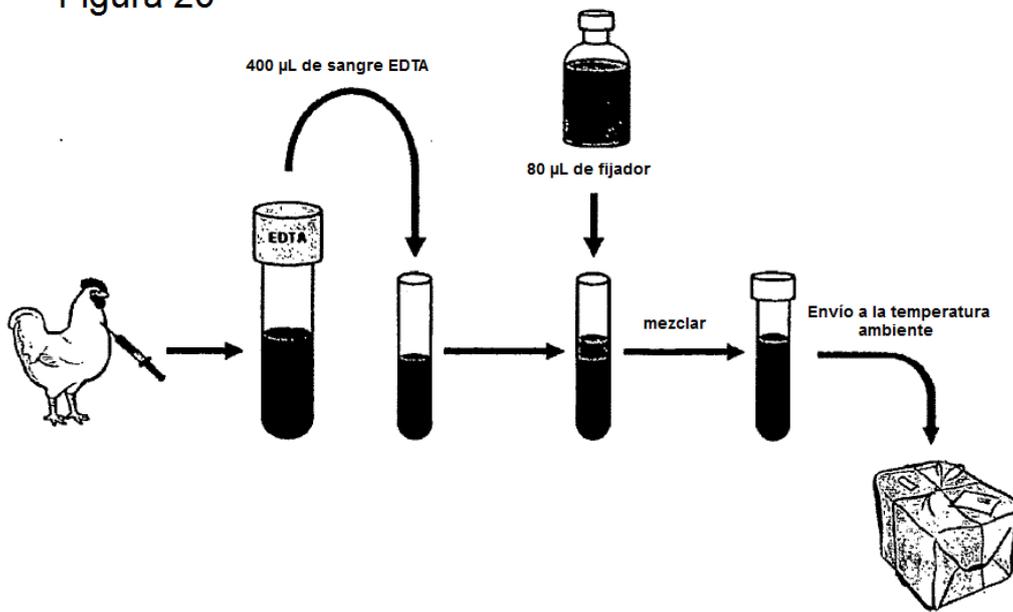


Figura 21

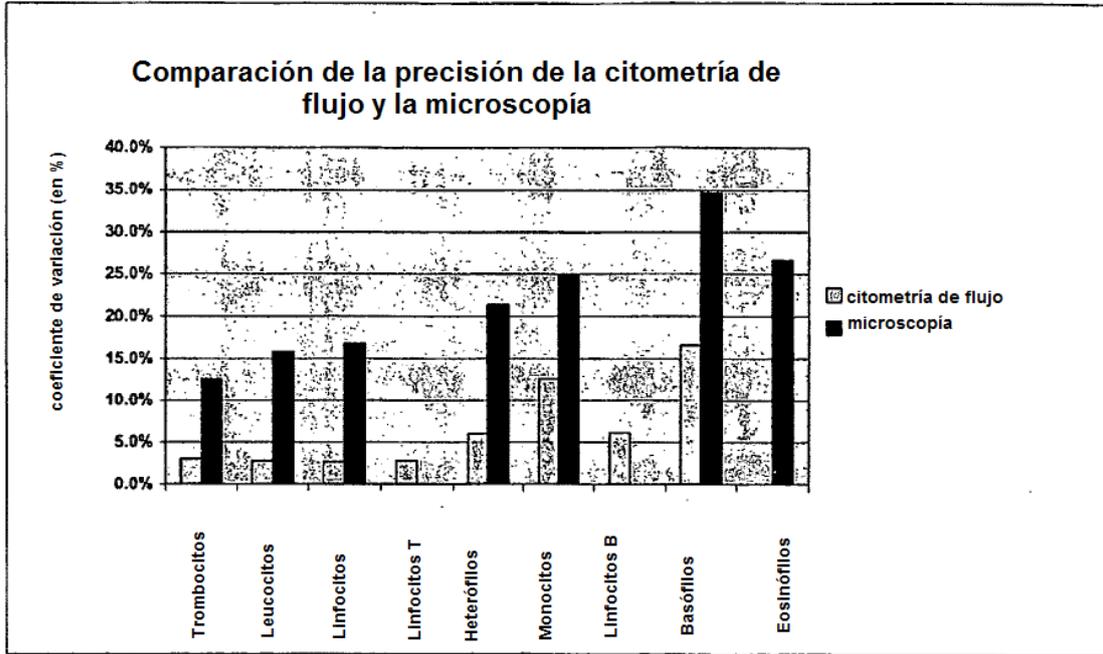


Figura 22

