

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 135**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2007 E 07447007 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 1813931**

54 Título: **Envoltura líquida para analizador de partículas**

30 Prioridad:

31.01.2006 JP 2006021672

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

04.12.2015

73 Titular/es:

**SYSMEX CORPORATION (100.0%)
1-5-1, Wakinohama-Kaigandori Chuo-ku
Kobe 651-0073, JP**

72 Inventor/es:

FUJIMOTO, YUKIE

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 553 135 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

Envoltura líquida para analizador de partículas

5 Antecedente de la invención

1. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a una envoltura líquida para un analizador de partículas que se usa para analizar partículas contenidas en una muestra, a un método para producirla, a un método para analizar las mismas utilizando la anterior. 2. Descripción de la técnica relacionada

2. Descripción de la técnica relacionada

15 Se usa generalmente un analizador de partículas basado en citometría de flujo para analizar partículas en muestras biológicas tales como orina y sangre. Cuando se usa un citómetro de flujo, las muestras se envuelven en la corriente de una envoltura líquida y pasan a través de una celda de flujo del citómetro de flujo. La información eléctrica u óptica de las muestras al pasar se detecta en una sección de detección en la celda de flujo, analizando de esta forma las partículas contenidas en las muestras.

20 Se describe un ejemplo de una envoltura líquida conocida usada para un citómetro de flujo en la patente de Estados Unidos número 6.750.060. Una gran cantidad de cloruro sódico está contenida en la envoltura líquida para ajustar el índice de refracción de la envoltura líquida. El uso de la envoltura líquida permite un análisis preciso de las partículas, incluso si una muestra tal como orina que tiene un alto índice de refracción se usa como espécimen.

25 Sin embargo, en el caso donde un dispositivo con la envoltura líquida descrito en la patente de Estados Unidos número 6.750.060 no se usa durante un determinado periodo, los precipitados pueden acumularse en el interior del dispositivo debido a la evaporación de la envoltura líquida. Por tanto, es necesario desmontar el dispositivo para retirar los precipitados cuando se acumulan. Adicionalmente, se pueden usar materiales que son muy anticorrosivos para la envoltura líquida para preparar la parte metálica del dispositivo que entra en contacto con la envoltura líquida y puede ser necesaria una sustitución regular de las piezas, dando como resultado elevados costes de producción.

El documento US 2003/0180955 muestra otro ejemplo de la composición de la envoltura líquida.

35 Sumario de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una envoltura líquida debido a la cual sea menos probable que se produzcan precipitados y la parte metálica del dispositivo esté menos corroída. Además, el objetivo de la presente invención es proporcionar un método para preparar la envoltura líquida debido a la cual sea menos probable que se produzcan precipitados y la parte metálica del dispositivo esté menos corroída. Además, el objetivo de la presente invención es proporcionar un método para analizar partículas utilizando la envoltura líquida debido a la cual sea menos probable que se produzcan precipitados y la parte metálica del dispositivo esté menos corroída.

Los aspectos de la presente invención se definen en las reivindicaciones adjuntas.

45 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un diagrama esquemático de un citómetro de flujo de un analizador de partículas donde se usa una envoltura líquida en la realización.

50 La Fig. 2 muestra una fotografía de un porta de vidrio (porta a) tras gotear una envoltura líquida D y secar esta, y un porta de vidrio (porta b) tras gotear una envoltura líquida A y secar esta.

La Fig. 3 muestra una fotografía de la parte lateral de un frasco de medio (frasco de medio a) tras evaporar una envoltura líquida B, y una fotografía de la parte lateral de un frasco de medio (frasco de medio b) tras evaporar una envoltura líquida D.

55 La Fig. 4 es una fotografía de la parte lateral del frasco de medio a en

La Fig. 3, y una fotografía de la parte lateral del frasco de medio b en la Fig. 3.

La Fig. 5 es un diagrama de dispersión utilizado cuando las bacterias que imitan el recuento utilizan la envoltura líquida B.

60 La Fig. 6 es un diagrama de dispersión utilizado cuando glóbulos blancos que imitan el recuento utilizan la envoltura líquida B.

La Fig. 7 es un diagrama de dispersión utilizado cuando las bacterias que imitan el recuento utilizan BACTSHEATH.

La Fig. 8 es un diagrama de dispersión utilizado cuando los glóbulos blancos que imitan el recuento utilizan BACTSHEATH.

65 La Fig. 9 muestra una gráfica de correlación entre el recuento bacteriano medido utilizando la envoltura líquida B y el recuento bacteriano utilizando BACTSHEATH.

La Fig. 10 muestra una gráfica de correlación entre el recuento de glóbulos blancos medidos utilizando la envoltura líquida B y el recuento de glóbulos blancos medidos utilizando BACTSHEAT.

Descripción de las realizaciones preferidas

5 Se usa en la realización una envoltura líquida para el analizador de partículas basado en citometría de flujo. El analizador de partículas basado en la citometría de flujo tiene una celda de flujo. Una muestra está envuelta en la corriente de la envoltura líquida y pasa a través de la celda de flujo del dispositivo. A continuación, la información eléctrica u óptica de la muestra al pasar se detecta en una sección de detección en la celda de flujo, analizando de esta forma las partículas contenidas en la muestra. El uso de este dispositivo permite la clasificación y el recuento de partículas contenidas en las muestras, por ejemplo células. La envoltura líquida puede prepararse disolviendo la sustancia para ajustar el índice de refracción (denominado a partir de ahora en el presente documento agente de ajuste del índice de refracción) en agua.

15 El índice de refracción de la envoltura líquida utilizada en la realización no está particularmente limitado siempre que no afecte al análisis de partículas. Preferentemente, el índice de refracción de la envoltura líquida es un valor aproximado del índice de refracción de la muestra sometida a la medida. Aquí, el término "un valor aproximado" significa el valor en el intervalo de $\pm 0,5\%$ para el índice de refracción de una muestra, preferentemente $\pm 0,3\%$. Cuando se usa orina como muestra, es preferible que la envoltura líquida tenga un índice de refracción en el intervalo de 1,338 a 1,345 a la longitud de línea de la línea D del sodio ($\lambda = 589,3 \text{ nm}$) a 25°C .

20 Los gliceroles están contenidos en la envoltura líquida. Las envolturas líquidas debido a las cuales es menos probable que se produzcan precipitados y se corroa menos la parte metálica de un analizador de partículas se pueden proporcionar utilizando sulfatos y gliceroles como agentes de ajuste del índice de refracción. El agente de ajuste del índice de refracción se añade adecuadamente de tal manera que ajusta el índice de refracción de la envoltura líquida al intervalo deseado. La envoltura líquida contiene gliceroles como principales agentes de ajuste del índice de refracción. Además, puede contener agentes de ajuste del índice de refracción tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, urea, carbonato de sodio, sacarosa, citrato, acetato, D-sorbitol, bicarbonato, y trietanolamina para fines auxiliares tales como un ajuste fino del índice de refracción. Cuando se añade cloruro de sodio a la envoltura líquida, la concentración del cloruro de sodio es el nivel de concentración en el cual un tubo del dispositivo no queda obturado con precipitados de cloruro de sodio. Alternativamente, cuando se añaden cloruro de sodio y/o cloruro de potasio a la envoltura líquida, estas concentraciones son iguales a los niveles de concentración para los cuales la parte metálica del dispositivo no está corroída. Cuando se usa cloruro de sodio, la concentración es preferentemente de 20 g/l o menos, y más preferentemente de 10 g/l o menos.

35 Como se usa en el presente documento, el término "gliceroles" abarca glicerol y un derivado de glicerol (denominado a partir de ahora en el presente documento derivado de glicerol). Los ejemplos de un derivado de glicerol incluyen tioglicerol, poliglicerol, y similares. Los ejemplos útiles de poligliceroles pueden incluir diglicerol, POLYGLYCERIN #310 (Sakamoto Yakuhin Kogyo Co., Ltd.), POLYGLYCERIN #750 (Sakamoto Yakuhin Kogyo Co., Ltd.), POLYGLYCERIN #500 (Sakamoto Yakuhin Kogyo Co., Ltd.), y similares.

40 En algunos casos, se puede medir la conductividad eléctrica de la muestra cuando se analizan las partículas de la muestra con el analizador de partículas. Por ejemplo, se sabe que la conductividad eléctrica de la orina está correlacionada con la presión osmótica o el peso específico de la orina. La presión osmótica urinaria o el peso específico urinario se usa como indicador de diversas enfermedades. Por ejemplo, el peso específico urinario bajo (1,010 o menos) y la presión osmótica urinaria baja (200 mOsm/kg H_2O u menos) se observan más frecuentemente en el deterioro de la concentración urinaria tal como la diabetes insípida y polidipsia psicógena. Por otra parte, el elevado peso específico urinario (1,030 o más) y la elevada presión osmótica urinaria (850 mOsm/kg H_2O u más) se observan más frecuentemente en la deshidratación, insuficiencia prerrenal, y similares.

50 La elevada conductividad eléctrica de la envoltura líquida puede afectar a las siguientes medidas de las muestras (se produce el arrastre), por tanto, es preferible que la conductividad eléctrica de la envoltura líquida sea tan baja como sea posible. La conductividad eléctrica de la envoltura líquida es preferentemente de 40 mS o menos a 25°C , ya que la conductividad eléctrica de la orina es de 5 a 30 mS a 25°C en muchos casos. De esta manera, cuando se mide la conductividad eléctrica de las muestras, se puede controlar el arrastre.

55 El pH de la envoltura líquida es preferentemente de 6,0 a 8,5, más preferentemente de 7,0 a 8,0. Es preferible añadir un agente tampón a la envoltura líquida a fin de ajustar el pH de la envoltura líquida. Los tipos de agentes tampón no están particularmente limitados siempre que el pH de la envoltura líquida se ajuste al intervalo adecuado. Los ejemplos de dichos agentes tampón incluyen tampones de Good (específicamente, tampones tris, MES, Bis-Tris, ADA, PIPES, ACES, MOPSO, BES, MOPS, TES, HEPES, DIPSO, TAPSO, POPSO, HEPPSO, EPPS, Tricina, Bicina, TAPS, y similares), hidrogenofosfato de disodio, dihidrogenofosfato de sodio, fosfato potásico monobásico, HCl de veronal sodio, HCl de colidina, ácido tris (hidroximetil) aminometano-maleico, HCl de tris (hidroximetil) aminometano, que se pueden usar solos o en combinación. Es preferible usar HCl de tris (hidroximetil) aminometano o ácido tris (hidroximetil) aminometano-maleico entre los agentes tampón.

La introducción de la envoltura líquida en la celda de flujo del dispositivo puede dar como resultado la formación de espuma en la envoltura líquida, que puede producir un efecto negativo sobre las medidas. Se pueden añadir agentes tensioactivos a la envoltura líquida a fin de controlar la formación de espuma. Los tipos de tensioactivos no están particularmente limitados siempre que puedan controlar la formación de espuma. Se pueden usar cualesquiera de los tensioactivos catiónicos, aniónicos, no iónicos, y anfólicos. Específicamente, se pueden usar tensioactivos de tipo polioxietilentalquil éter, tensioactivos de tipo polioxietilentalquil fenil éter (por ejemplo, NISSAN NONION NS-240 (NOF CORPORATION, marca comercial registrada)), tensioactivos de tipo polioxietilensorbitan alquil éter (Por ejemplo, RHEODOL TW-0120 (Kao Corporation, marca comercial registrada)), copolímeros de poli(ol) (Por ejemplo, Pluronic P-105, P-84, P-85, P-87, P-75, y similares (BASF Corporation, marca comercial registrada)), MEGA-8, monocaprato de sacarosa, desoxi-BIGCHAP, n-octil- β -D-tioglucoído, n-nonil- β -D-tiomaltóido, n-heptil- β -D-tioglucoído, n-octil- β -D-tioglucoído, CHAPS, CHAPSO, y similares. La concentración del tensioactivo en la envoltura líquida es preferentemente el nivel de concentración donde la formación de espuma está controlada y no se ven afectadas las partículas tales como las células de la muestra. Específicamente, la concentración es preferentemente de 5 a 5000 mg/l, más preferentemente de 100 a 3000 mg/l.

Cuando se analizan partículas contenidas en la muestra con el analizador de partículas, pueden precipitar en la muestra sales amorfas tales como fosfato de amonio, fosfato de magnesio, carbonato de calcio. Se pueden añadir agentes quelantes a la envoltura líquida a fin de disolver estas sales amorfas. La adición de agentes quelantes permite no solo disolver sales amorfas, sino inhibir también la oxidación de la envoltura líquida. Los ejemplos útiles de un agente quelante incluyen sales de EDTA, CyDTA, DHEG, DPTA-OH, EDDA, EDDP, GEDTA, HDTA, HIDA, Metil-EDTA, NTA, NTP, NTPO, EDDPO, y similares. La concentración del agente quelante en la envoltura líquida está preferentemente en el intervalo de 0,05 a 5 g/l.

La multiplicación de microorganismos tales como bacterias y hongos en la envoltura líquida puede afectar el análisis de partículas en la muestra. Para inhibir la multiplicación de bacterias u hongos, se añaden a la envoltura líquida sustancias que tienen actividad fungicida frente a la envoltura líquida (agentes fungicidas) y/o sustancias que tienen actividad bactericida frente a la envoltura líquida (agentes bactericidas). Los ejemplos útiles de agentes fungicidas/agentes bactericidas pueden incluir productos comercialmente disponibles. Sus ejemplos útiles incluyen los agentes antimicrobianos de triazina, agentes bactericidas de tiazol (por ejemplo, bencisotiazolona, etc.), piritiona, agentes bactericidas de piridina (por ejemplo, 1-hidroxi piridina-2-tiosodio, etc.), 2-fenoxietanol, y similares. Específicamente, se pueden usar Proxel GXL (Avecia), TOMICIDE S (API Corporation), y similares.

La muestra que se somete a análisis utilizando el analizador de partículas con la envoltura líquida en la realización no está particularmente limitada. Se pueden usar las muestras obtenidas del cuerpo vivo (muestras biológicas). Alternativamente, dichas muestras pueden diluirse, purificarse, colorearse, o similares. Específicamente, los ejemplos de dicha muestra pueden incluir orina, sangre, semen, fluido cerebroespinal, y similares. La envoltura líquida en la realización se usa adecuadamente cuando se analizan partículas en la orina (glóbulos rojos, glóbulos blancos, bacterias, etc.).

Para analizar las partículas de la muestra utilizando la envoltura líquida en la realización, se puede usar un citómetro de flujo como se muestra en la Fig. 1. Una celda de flujo 42 para hacer fluir una muestra es una parte que se irradia con un haz láser, teniendo la celda de flujo: una sección de orificio 43 donde el paso del flujo interno es estrecho; una boquilla 44 donde se inyecta una muestra de forma ascendentes en la sección del orificio; una apertura 45 que alimenta la envoltura líquida; y una apertura 46 para el líquido residual.

El citómetro de flujo 41 incluye:

una lente condensadora 48 que concentra un haz láser emitido desde una fuente de luz láser 47 hacia la celda de flujo 42;

un fotodiodo 49 que recibe la luz dispersada hacia delante emitida por las partículas de la muestra irradiada con el haz láser y que a continuación convierte esta en una señal eléctrica;

una lente colectora 50 y un agujero de alfiler 51 para concentrar la luz dispersada hacia delante hacia el fotodiodo 49;

un tubo fotomultiplicador 52 que recibe la fluorescencia emitida por las partículas de la muestra irradiada con el haz láser y que a continuación convierte esta en una señal eléctrica;

una lente colectora 53, un filtro 54, y un agujero de alfiler 55 para concentrar la fluorescencia hacia el tubo fotomultiplicador 52;

y un amplificador 57 que amplifica la salida de la señal eléctrica procedente del fotodiodo 49 y la dirige hacia una sección analizadora 56 en forma de una señal luminosa dispersada hacia delante;

un amplificador 58 que amplifica la salida de la señal eléctrica procedente del tubo fotomultiplicador 52, y la dirige hacia una sección analizadora 56 en forma de una señal de fluorescencia.

Cuando la muestra se hace pasar a través de la celda de flujo 42, cada vez que las partículas contenidas en la muestra pasan a través de la zona de irradiación del haz láser emitido desde la fuente de luz láser 47, se produce la luz dispersada. Se recibe la fluorescencia lateral que se convierte fotoeléctricamente por el tubo fotomultiplicador 52, y se recibe la luz dispersada hacia delante que se convierte fotoeléctricamente por el fotodiodo 49, que son la salida

en dirección a la sección analizadora 56 como señales detectoras de la luminosidad, de tal manera como señal de fluorescencia lateral y señal luminosa dispersada hacia delante.

5 La sección analizadora 56 está compuesta por un ordenador que consiste en un circuito que amplifica la señal detectora de la luminosidad para cada partícula detectada por el citómetro de flujo 41 y elimina el ruido, CPU, ROM, RAM y similares. La sección analizadora 56 analiza la señal detectora de la luminosidad para cada partícula detectada por el citómetro de flujo 41 y crea un diagrama de dispersión para contar las partículas contenidas en la muestra. La sección analizadora 56 calcula la intensidad de la luz dispersada hacia delante y la anchura de luz dispersada hacia delante basándose en la señal luminosa dispersada hacia delante y calcula también la intensidad de la fluorescencia basándose en la señal de fluorescencia lateral. Se construye un diagrama de dispersión utilizando combinaciones de estos parámetros y a continuación se analizan el tipo y el número de cada partícula en la muestra.

(Ejemplo 1)

15 Se disolvieron las siguientes sustancias en 1 kg de agua purificada para preparar una envoltura líquida.

20 Tris (hidroximetil) aminometano 1,51 g
 Ácido clorhídrico 6 mol
 EDTA-2K 0,2 g
 RHEODOL TW0120V 0,75 g
 TOMICIDE S 0,2 g
 Proxel GXL 0,2 g

25 Se añadieron diferentes tipos de agentes de ajuste del índice de refracción a la envoltura líquida anteriormente mencionada. A continuación los inventores examinaron qué cantidad de agentes de ajuste del índice de refracción deberían añadirse para ajustar el índice de refracción de la envoltura líquida a 1,342. Se usó el refractómetro digital RX-5000 α (ATAGO CO., LTD.) para las medidas del índice de refracción. Se midió el índice de refracción a 25 °C.

30 Como resultado del examen de los inventores, se ha encontrado que, en el caso donde se usó glicerol como agente de ajuste del índice de refracción, la adición de glicerol a una concentración de 79 g/l a la envoltura líquida permitió el ajuste del índice de refracción a 1,342.

35 Se ha encontrado que, en el caso donde se usó tioglicerol como agente de ajuste del índice de refracción, la adición de tioglicerol a una concentración de 57 g/l a la envoltura líquida permitió el ajuste del índice de refracción a 1,342.

40 Se ha encontrado que, en el caso donde se usó diglicerol como un agente de ajuste del índice de refracción, la adición de diglicerol a una concentración de 69 g/l a la envoltura líquida permitió el ajuste del índice de refracción a 1,342.

45 Se ha encontrado que, en el caso donde se usó POLYGLYCERIN nº 310 como agente de ajuste del índice de refracción, la adición de POLYGLYCERIN nº 310 a una concentración de 71 g/l a la envoltura líquida permitió el ajuste del índice de refracción a 1,342.

50 Se ha encontrado que, en el caso donde se usó POLYGLYCERIN nº 750 como agente de ajuste del índice de refracción, la adición de POLYGLYCERIN nº 750 a una concentración de 73 g/l a la envoltura líquida permitió el ajuste del índice de refracción a 1,342.

55 Se ha encontrado que, en el caso donde se usó POLYGLYCERIN nº 500 como agente de ajuste del índice de refracción, la adición de POLYGLYCERIN nº 500 a una concentración de 75 g/l a la envoltura líquida permitió el ajuste del índice de refracción a 1,342.

60 Se ha encontrado que, en el caso donde se usó sulfato de sodio como agente de ajuste del índice de refracción, la adición de sulfato de sodio a una concentración de 62 g/l a la envoltura líquida permitió el ajuste del índice de refracción a 1,342.

65 Se ha encontrado que, en el caso donde se usaron cloruro de sodio y glicerol como agentes de ajuste del índice de refracción, la adición de cloruro de sodio y glicerol a concentraciones de 7,1 g/l y 69,1 g/l, respectivamente a la envoltura líquida permitió el ajuste del índice de refracción a 1,342.

Se ha encontrado que, en el caso donde se usaron cloruro de sodio y sulfato de sodio como agentes de ajuste del índice de refracción, la adición de cloruro de sodio y sulfato de sodio a concentraciones de 7,1 g/l y 54,44 g/l, respectivamente a la envoltura líquida, permitió el ajuste del índice de refracción a 1,342.

Se ha encontrado que, en el caso donde se usaron cloruro de sodio, sulfato de sodio, y glicerol como agentes de ajuste del índice de refracción, la adición de cloruro de sodio, sulfato de sodio, y glicerol a concentraciones de

7,1 g/l, 28,45 g/l, y 34 g/l, respectivamente a la envoltura líquida permitió el ajuste del índice de refracción a 1,342.

(Ejemplo 2)

5 Se añadieron diferentes tipos de agentes de ajuste del índice de refracción a la envoltura líquida del Ejemplo 1 para ajustar el índice de refracción de la envoltura líquida a 1,342, y a continuación se midió la conductividad eléctrica. Se usó el medidor de conductividad eléctrica DS-8F (HORIBA, Ltd.) para las medidas de conductividad eléctrica.

10 Se añadieron 7,1 g/l de cloruro de sodio y 69,1 g/l de glicerol como agentes de ajuste del índice de refracción a la envoltura líquida, y se preparó una envoltura líquida A. La conductividad eléctrica de la envoltura líquida A fue de 11 mS.

15 Se añadieron 7,1 g/l de cloruro de sodio, 28,45 g/l de sulfato de sodio, y 34 g/l de glicerol como agentes de ajuste del índice de refracción a la envoltura líquida anteriormente mencionada para preparar la envoltura líquida B. La conductividad eléctrica de la envoltura líquida B era de 35 mS.

Se añadieron 79 g/l de glicerol como agente de ajuste del índice de refracción a la envoltura líquida para preparar la envoltura líquida C. La conductividad eléctrica de la envoltura líquida C era de 1,1 mS.

20 Como se ha mencionado anteriormente, se considera que se produjo menos arrastre durante la medida debido a que cada una de las envolturas líquidas A a C tiene un índice de refracción de 1,342 y una conductividad eléctrica de 40 mS o menos.

(Ejemplo 3)

25 Los inventores examinaron si se observaba precipitación de sales utilizando la envoltura líquida A preparada en el Ejemplo 2. Como control, a la envoltura líquida del Ejemplo 1 se añadió cloruro de sodio a una concentración de 55 g/l como agente de ajuste del índice de refracción para preparar la envoltura líquida D.

30 100 µl de la envoltura líquida A y 100 µl de la envoltura líquida D se añadieron gota a gota sobre portas de vidrio, respectivamente, que se secaron a 25 °C.

35 En la Fig. 2 se muestra una fotografía de los portas de vidrio tras el secado. Un porta a indica el porta de vidrio sobre el cual se añadió gota a gota la envoltura líquida D, y un porta b indica el porta de vidrio sobre el cual se añadió gota a gota la envoltura líquida A. Como se muestra en la Fig. 2, cuando se secó la envoltura líquida D, se observó la precipitación de sales. Sin embargo, cuando se secó la envoltura líquida A, se observó poca precipitación de sales. Como se ha mencionado anteriormente, se considera que el tubo se obtura menos debido a la precipitación de sales en el caso donde se usó la envoltura líquida A para el analizador de partículas.

(Ejemplo 4)

Los inventores examinaron si se observaba precipitación de sales utilizando la envoltura líquida B preparada en el Ejemplo 2. Como control, se usó la envoltura líquida D preparada en el Ejemplo 3.

45 Se cargaron 100 ml de la envoltura líquida A y 100 ml de la envoltura líquida D en los matraces de medio, respectivamente, que se secaron a 60 °C hasta que se había evaporado toda el agua.

50 Se muestra una fotografía de los matraces de medio tras el secado en las Figs. 3 y 4. La Fig. 3 muestra una fotografía de la parte lateral del frasco de medio (frasco de medio a) tras la evaporación de la envoltura líquida B y una fotografía de la parte lateral del frasco de medio (frasco de medio b) tras la evaporación de la envoltura líquida D. La Fig. 4 (a) muestra una fotografía del interior del frasco de medio a en la Fig. 3, y la Fig. 4 (b) muestra una fotografía del interior del frasco de medio b en la Fig. 3. Como resulta evidente de las Figs. 3 y 4, cuando se secó la envoltura líquida B, solo se observó una pequeña precipitación de sales. Sin embargo, cuando se secó la envoltura líquida D, se observaron grandes cantidades de sales de precipitación. Como se ha mencionado anteriormente, se considera que el tubo está menos obturado con la precipitación de sales en el caso donde se usó la envoltura líquida B para el analizador de partículas.

(Ejemplo 5)

60 Se aplicó la envoltura líquida B preparada en el Ejemplo 2 para el analizador de bacterias BACSYS-40i (fabricado por Sysmex Corporation) y BACTCHECK (fabricado por Sysmex Corporation) que es una sustancia para control de calidad que se usó como una muestra. Se midieron las partículas miméticas (denominadas a partir de ahora como partículas que imitan bacterias) que corresponden a las bacterias en la muestra y a las partículas miméticas (denominadas a partir de ahora en el presente documento como partículas que imitan glóbulos blancos) que corresponden a los glóbulos blancos de la muestra.

Se mezclaron 50 µl of BACTCHECK, 10 µl de solución de tinción, reactivo de medida "BACTCATCH" (fabricado por Sysmex Corporation) utilizado para el analizador de bacterias, y 340 µl de diluyente. Se introdujeron las soluciones mezcladas en la celda de flujo del analizador de partículas, y se obtuvo la señal de fluorescencia lateral y la señal luminosa dispersada hacia delante generadas por las partículas contenidas en la muestra. Se calculó la intensidad de la fluorescencia procedente de la señal de fluorescencia lateral, y la intensidad 1 de la luz dispersada hacia delante, se calcularon la intensidad 2 de la luz dispersada hacia delante, y la anchura de la luz dispersada hacia delante procedente de la señal luminosa dispersada hacia delante. El grado de amplificación de la señal difiere entre la intensidad 1 de la luz dispersada hacia delante y la intensidad 2 de la luz dispersada hacia delante. Por consiguiente, se usó la intensidad 1 de luz dispersada hacia delante para la medida de las partículas que imitan bacterias, y la intensidad 2 de luz dispersada hacia delante se usó para la medida de las partículas que imitan glóbulos blancos.

Se construyó un diagrama de dispersión donde se usaron la anchura de la luz dispersada hacia delante y la intensidad 1 de luz dispersada hacia delante en dos ejes, y se contaron las partículas que imitan bacterias. En la Fig. 5 se muestra el diagrama de dispersión. Se usó un diagrama de dispersión donde se usaron la intensidad de la fluorescencia y la intensidad 2 de luz dispersada hacia delante en dos ejes, y se contaron las partículas que imitan glóbulos blancos. En la Fig. 6 se muestra el diagrama de dispersión. Se llevó a cabo la medida 8 veces. En la Tabla 1 siguiente se muestran los resultados de la medida. En la tabla 1, "BACT" muestra los recuentos de las partículas que imitan a bacterias (/µl). "WBC" muestra los recuentos de las partículas que imitan glóbulos blancos (/µl). "FSLI 1" muestra la intensidad 1 de la luz dispersada hacia delante. "FSLIW" muestra la anchura de la luz dispersada hacia delante. "FSLI 2" muestra la intensidad 2 de la luz dispersada hacia delante. "FI" muestra la intensidad de la fluorescencia.

(Tabla 1)

	Medición	BACT	WBC	FSLI 1	FSLW	FSLI 2	FI
envoltura líquida B	1	454,1	500,6	91,5	60	211	62,5
	2	466,6	500	92	60	210	59
	3	458,9	482,9	91	60	208,5	59
	4	486,6	507,2	91	60	209,5	58,5
	5	477,3	502,7	92	61	210	57,5
	6	473,1	493,6	92	60,5	209,5	56,5
	7	466,3	470,2	92,5	60	211	62
	8	483,4	492,7	91,5	60	210	61
Promedio		470,8	493,7	91,7	60,2	209,9	59,5
CV(%)		2,40 %	2,40 %	0,60 %	0,60 %	0,40 %	3,60 %

Además, las partículas que imitan bacterias y las partículas que imitan glóbulos blancos se contaron de la misma manera que se ha descrito anteriormente utilizando BACTSHEATH (fabricado por Sysmex Corporation) que es una envoltura líquida utilizada para el dispositivo anteriormente mencionado como un control. Se han mostrado en la Fig. 7 un diagrama de dispersión donde la anchura de la luz dispersada hacia delante y la intensidad 1 de la luz dispersada hacia delante se utilizaron en dos ejes. Se ha mostrado en la Fig. 8 un diagrama de dispersión donde la intensidad de la fluorescencia y la intensidad 2 de la luz dispersada hacia delante se usaron en dos ejes. Se llevó a cabo la medida 8 veces. En la Tabla 2 siguiente se muestran los resultados de la medida.

(Tabla 2)

	Medición	BACT	WBC	FSLI 1	FSLW	FSLI 2	FI
Bactsheath (Control)	1	480,4	484,6	90,5	61	205,5	62,5
	2	502,6	486,6	90	61	206	62,5
	3	483,8	490,4	90	61	205	62
	4	485,7	471	90	61	206	63
	5	508,7	475,2	90	61	206	57,5
	6	499,4	500,3	90	61	205,5	63
	7	510	474,9	91,5	61	208	65
	8	482	491,3	90,5	61	208	70
Promedio		494,1	484,3	90,3	61	206,3	63,2
CV (%)		2,50 %	2,10 %	0,60 %	0,00 %	0,50 %	5,50 %

Como es evidente a partir de las Tablas 1 y 2, cuando se usaron tanto la envoltura líquida B como BACTSHEATH, los recuentos de partículas que imitan bacterias, los recuentos de partículas que imitan glóbulos blancos, la fuerza de la señal, y el CV (coeficiente de variación) de la anchura de la señal fueron extremadamente bajos en ocho mediciones. Los recuentos de partículas que imitan bacterias y los recuentos de partículas que imitan glóbulos blancos que se cuantificaron usando BACTSHEATH se aproximaron a los recuentos de partículas que imitan bacterias y a los recuentos de glóbulos blancos imitados que se cuantificaron usando la envoltura líquida B. Como se ha mencionado anteriormente, se ha confirmado que las partículas en la muestra podrían medirse con precisión y reproducibilidad así como con líquidos convencionales cuando se usó la envoltura líquida B.

5

10 (Ejemplo 6)

Se cuantificaron los recuentos bacterianos y los recuentos de glóbulos blancos en 116 especímenes, es decir, 116 muestras de orina (números de especímenes 1 a 116) de la misma manera que en el Ejemplo 5 utilizando la envoltura líquida B. Alternativamente, se cuantificaron los recuentos de bacterias y los recuentos de glóbulos blancos de las 116 muestras utilizando BACTSHEATH como control. En la Fig. 9 se muestra una gráfica de correlación entre los recuentos bacterianos cuantificados utilizando la envoltura líquida B y los recuentos bacterianos cuantificados utilizando BACTSHEATH. En la Fig. 10 se muestra una gráfica de correlación entre los recuentos de glóbulos blancos cuantificados utilizando la envoltura líquida B y los recuentos de glóbulos blancos cuantificados utilizando BACTSHEATH.

15

20

Como se muestra en la Fig. 9, se ha encontrado que los recuentos bacterianos cuantificados utilizando la envoltura líquida B estuvieron significativamente correlacionados con los recuentos bacterianos cuantificados utilizando BACTSHEATH. Además, como se muestra en la Fig. 10, se ha encontrado que los recuentos de glóbulos blancos cuantificados utilizando la envoltura líquida B estuvieron significativamente correlacionados con los recuentos de glóbulos blancos cuantificados utilizando BACTSHEATH. Como se ha mencionado anteriormente, se ha confirmado que las partículas en el espécimen podrían medirse con precisión con envolturas líquidas convencionales cuando se usó la envoltura líquida B.

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una envoltura líquida para analizar partículas en una muestra con un citómetro de flujo, donde la envoltura líquida comprende:
- agua;
20 g/l o menos de cloruro de sodio;
un agente tampón; y
un agente quelante;
- 10 y donde la envoltura líquida tiene un índice de refracción comprendido en el intervalo de 1,338 a 1,345 a una longitud de onda de la línea D de sodio ($\lambda = 589,3$ nm) a 25 °C,
caracterizado por que la envoltura líquida comprende además al menos uno seleccionado entre glicerol y un derivado de glicerol.
- 15 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** además **por que** el derivado de glicerol se selecciona entre el grupo que consiste en tioglicerol y poliglicerol.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado** además **por que** la muestra comprende orina.
- 20 4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** además **por que** la envoltura líquida tiene una conductividad eléctrica de 40 mS o menos a 25 °C.
5. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** además **por que** el agente tampón comprende HCl de tris(hidroximetil)aminometano y/o ácido tris(hidroximetil)aminometano-maleico.
- 25 6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** además **por que** la envoltura líquida comprende además al menos una sustancia seleccionada entre el grupo que consiste en un tensioactivo y un agente fungicida/agente bactericida.
- 30 7. Un método para analizar partículas en una muestra mediante un citómetro de flujo, que comprende las etapas de:
- envolver la muestra con una envoltura líquida; y
pasar la muestra envuelta por la envoltura líquida a través de una celda de flujo del citómetro de flujo,
donde la envoltura líquida comprende:
- 35 agua;
20 g/l o menos de cloruro de sodio;
un agente tampón; y
un agente quelante;
- 40 y donde la envoltura líquida tiene un índice de refracción comprendido en el intervalo de 1,338 a 1,345 a una longitud de onda de la línea D de sodio ($\lambda = 589,3$ nm) a 25 °C,
caracterizado por que la envoltura líquida comprende además al menos uno seleccionado entre glicerol y un derivado de glicerol.
- 45 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado por** comprender además las etapas de:
- detectar la información óptica de las partículas en la muestra que atraviesan la celda de flujo; y
analizar las partículas basándose en la información óptica.
- 50 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado por que** la información óptica comprende luz dispersa y/o fluorescencia.
10. Una envoltura líquida para su uso en un citómetro de flujo que analiza partículas en una muestra que comprende:
- 55 agua;
20 g/l o menos de cloruro de sodio;
un agente tampón;
y un agente quelante;
- 60 donde la envoltura líquida tiene un índice de refracción comprendido en el intervalo de 1,338 a 1,345 a una longitud de onda de la línea D del sodio ($\lambda = 589,3$ nm) a 25 °C,
caracterizada por que la envoltura líquida comprende además al menos uno seleccionado entre glicerol y un derivado de glicerol.
- 65 11. La envoltura líquida de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizada** además **por que** el derivado de glicerol se selecciona entre el grupo que consiste en tioglicerol y poliglicerol.

12. La envoltura líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, **caracterizada** además **por que** la muestra comprende orina.

5 13. La envoltura líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, **caracterizada** además **por** tener una conductividad eléctrica de 40 mS o menos a 25 °C.

10 14. La envoltura líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, **caracterizada** además **por que** el agente tampón comprende HCl de tris(hidroximetil)aminometano y/o ácido tris(hidroximetil)aminometano-maleico.

15. La envoltura líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, **caracterizada** además **por** comprender al menos una sustancia seleccionada entre el grupo que consiste en un tensioactivo y un agente fungicida/agente bactericida.

FIG. 1

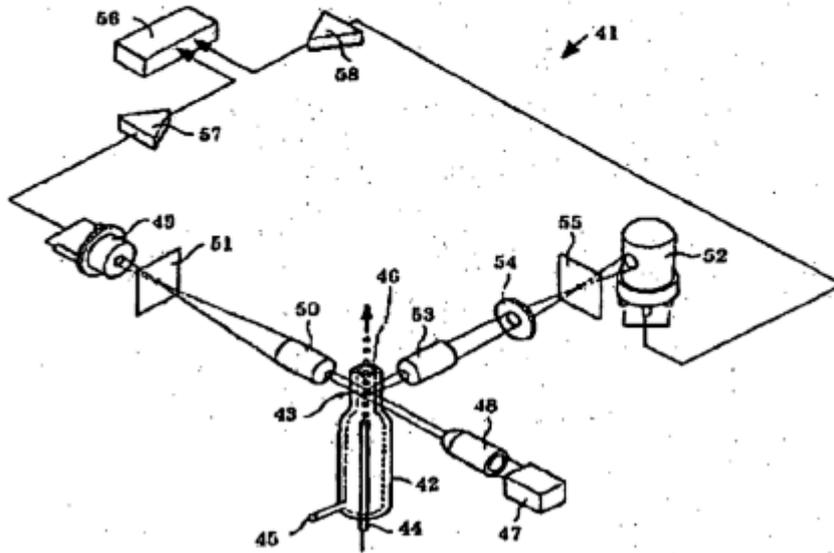


FIG. 2

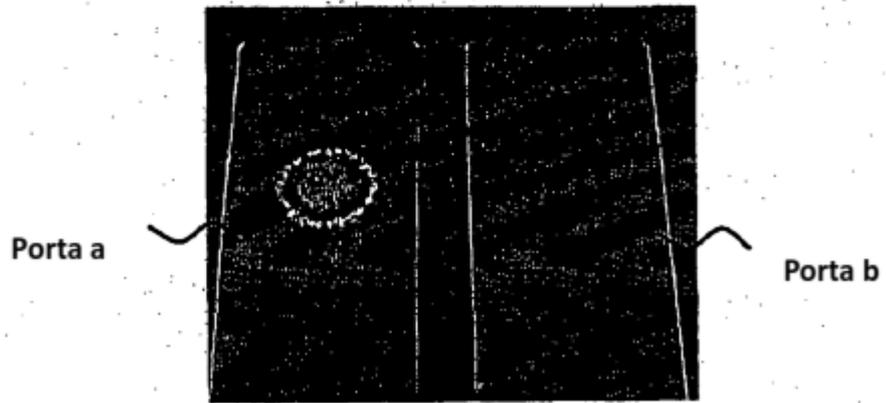


FIG. 3

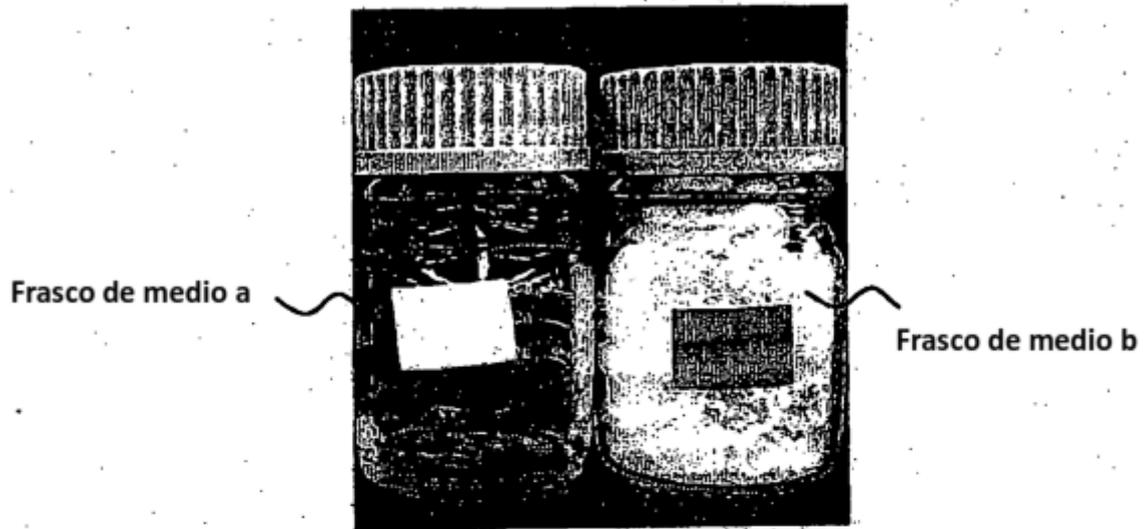


FIG. 4

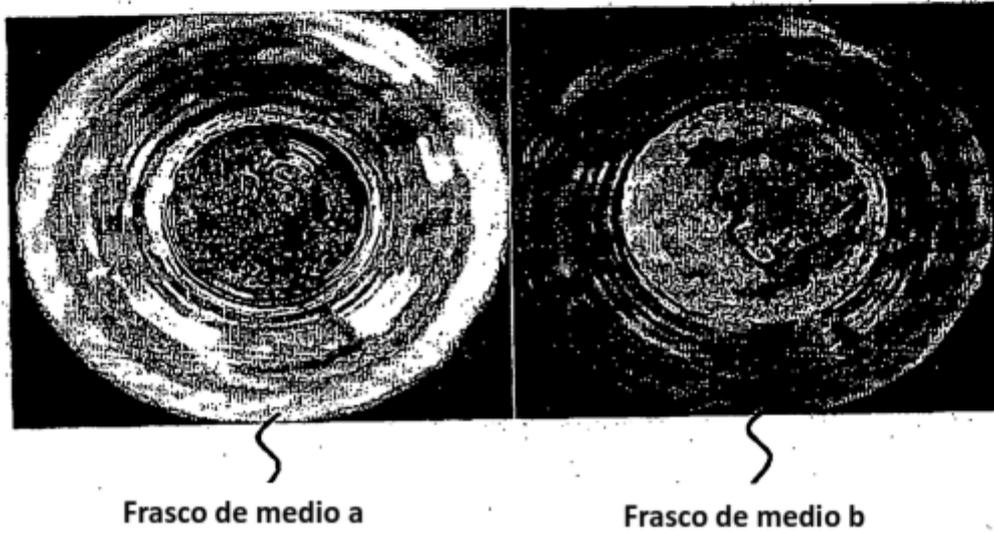
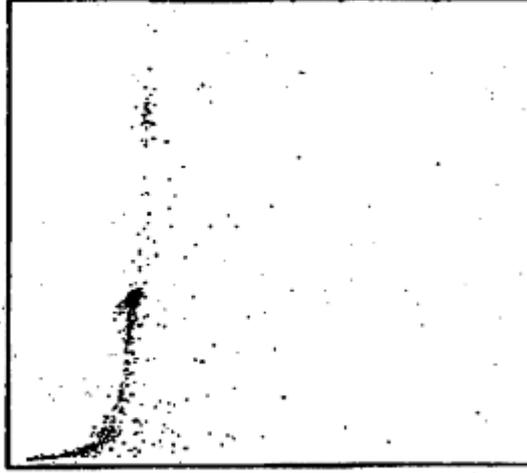


FIG. 5

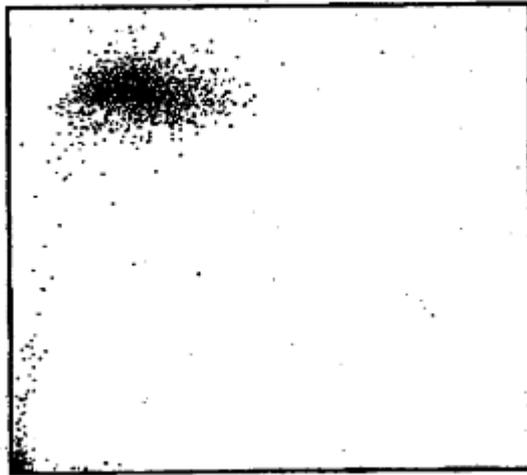
Intensidad 1 de la luz
dispersada hacia delante



Anchura de la luz dispersada hacia delante

FIG. 6

Intensidad 2 de la luz
dispersada hacia delante



Intensidad de la fluorescencia

FIG. 7

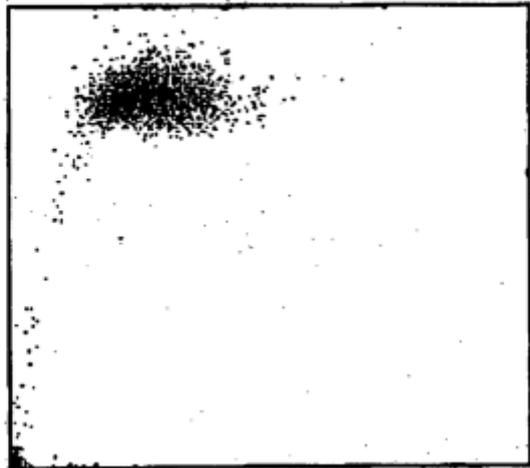
Intensidad 1 de la luz
dispersada hacia delante



Anchura de la luz dispersada hacia delante

FIG. 8

Intensidad 2 de la luz
dispersada hacia delante



Intensidad de la fluorescencia

FIG. 9

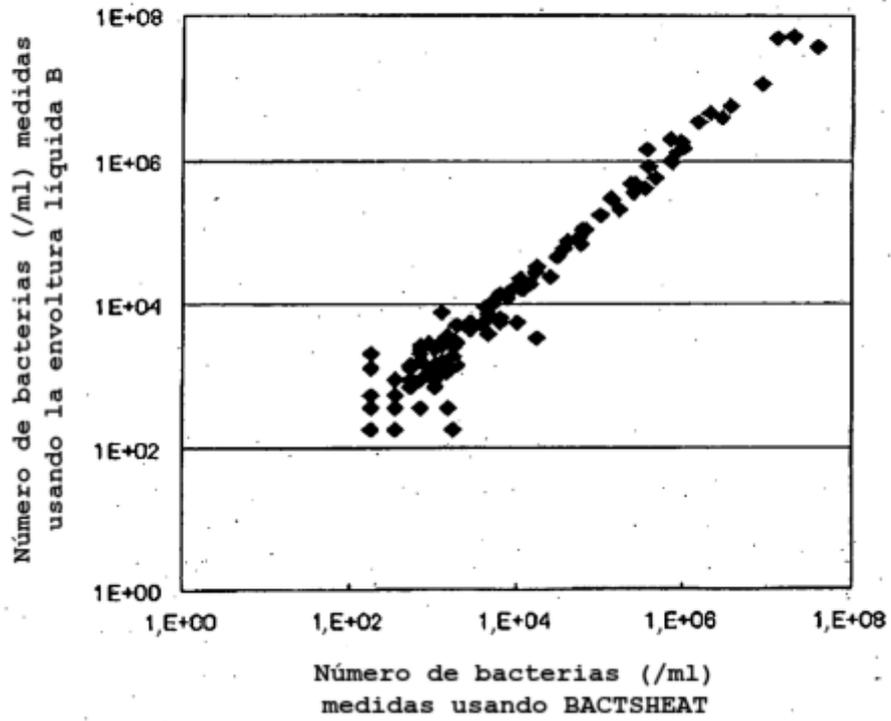


FIG. 10

