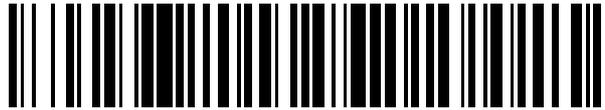


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 219**

51 Int. Cl.:

**G01N 1/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2010 E 10752066 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2457079**

54 Título: **Composición de fijación citológica o histológica y procedimientos de coloración**

30 Prioridad:

**22.07.2009 FR 0955127**

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

**29.12.2015**

73 Titular/es:

**R.A.L. DIAGNOSTICS (100.0%)  
Bordeaux Technopolis, Site Montesquieu  
33650 Martillac, FR**

72 Inventor/es:

**DAGIRAL, RODOLPHE LOUIS GUY y  
MONTIEL, FLORIAN**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 555 219 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**

Composición de fijación citológica o histológica y procedimientos de coloración.

5 La presente invención se refiere a una composición para fijar unos tejidos, unas células o unos componentes celulares sobre unas láminas, con vistas a su coloración y a su análisis.

10 La invención se refiere asimismo a un procedimiento de preparación de este fijador y a su utilización en histología o citología. Una utilización particular de la presente invención es un procedimiento de coloración de tejidos, células o componentes celulares, en particular para la sangre y la médula, que utiliza este fijador.

Para identificar unos tejidos, unas células o unas partes de células, se utilizan unas técnicas de coloración celular asociadas a la observación microscópica o a sistemas de análisis de imagen.

15 Estos métodos de coloración son indispensables en numerosos campos de la biología, tanto en la investigación fundamental como en análisis médico o veterinario para el diagnóstico tisular o el citodiagnóstico.

En hematología particularmente, se utiliza desde hace muchos años la coloración conocida bajo el nombre de MGG, May-Grünwald Giemsa. El procedimiento de coloración consiste:

- 20 - en fijar las células a colorear sobre un portaobjetos con una solución de May-Grünwald constituida por azul de metileno-eosina disuelta en metanol,
- en poner en contacto el portaobjetos con una solución tamponada,
- 25 - después en ponerla en contacto con una solución de Giemsa constituida por azul Azur II - eosina disuelta en metanol con glicerina,
- y finalmente en aclararla y secarla.

30 Se obtienen entonces unas coloraciones conocidas por todos los especialistas que hacen de esta técnica un estándar y permiten establecer unas comparaciones fiables. Sin embargo, la coloración MGG adolece de numerosos inconvenientes. En particular, utiliza unos disolventes tóxicos y volátiles. Además, la presencia de glicerina genera también unos inconvenientes ya que hace más difíciles los aclarados de los portaobjetos y puede generar unas obstrucciones de los filtros durante la filtración.

35 Además, para realizar una buena coloración, es importante que el colorante sea estable y que no persistan depósitos de colorantes después del aclarado del portaobjetos. Ahora bien, unos depósitos de este tipo pueden aparecer con el MGG. Estos depósitos perturban el funcionamiento de los dispositivos automáticos de coloración y de los sistemas de reconocimiento de células y obstaculizan la distinción de los diferentes elementos celulares y el reconocimiento de las células sanas de las células enfermas en el caso de un citodiagnóstico.

40 Con el fin de evitar estos inconvenientes, se ha intentado reemplazar el MGG por otros procedimientos de coloración.

45 Sin embargo, una mayoría de los procedimientos desarrollados para reemplazar el MGG no permiten ni conservar su reproducibilidad esencial para el análisis, ni obtener unos resultados comparables.

50 Además, al igual que el MGG, utilizan metanol, ya sea para realizar los colorantes en sí mismos o la solución de fijación de las células. En efecto, el metanol presenta unas propiedades físicas particulares que le permiten fijar bien las células.

55 Ahora bien, el metanol es un producto tóxico y volátil, por lo que es deseable limitar su utilización, ya que puede ser peligroso para el especialista.

Se han propuesto unas soluciones sustituyendo el metanol por el etanol, pero el etanol solo no da unos resultados satisfactorios, en particular cuando se utiliza para la fijación.

60 Otras soluciones consisten en utilizar ácido pícrico, formaldehído, glutaraldehído o también ácido ósmico como agente de fijación de las estructuras celulares.

Ahora bien, aunque los resultados obtenidos puedan ser de calidad, la presencia de productos tóxicos conlleva unos riesgos para las personas destinadas a manipularlos.

65 Por otra parte, con el desarrollo de los sistemas de análisis de imágenes, es necesario utilizar unos mecanismos de coloración con el fin de asegurar un desarrollo siempre idéntico de las etapas de coloración. Ahora bien, con los

reactivos y productos de fijación actuales, estas máquinas sufren un mantenimiento complejo, ya que provocan un ensuciamiento rápido de los circuitos y depósitos.

5 Finalmente, se sabe que, de manera histórica, según los países a los que se dirigen, los reactivos de coloración pueden ser diferentes para un mismo campo de biología. Esto se traduce en unos tonos diferentes y una visualización más o menos marcada de tal o cual tipo de elemento celular. Se distinguen clásicamente en hematología unas coloraciones que hacen intervenir una combinación de reactivos de coloración (como los colorantes de MGG utilizados en los países de "cultura europea"), y unas coloraciones que hacen intervenir un reactivo de coloración única (como los colorantes de Wright y de Leishman, utilizados en los países "cultura anglosajona o asiática"). Ahora bien, las soluciones de fijación utilizadas actualmente son específicas de un procedimiento de coloración dado, y no es posible utilizar el mismo fijador para dos procedimientos diferentes.

15 Por lo tanto, subsiste una necesidad de unos productos destinados a la coloración de los tejidos, células o componentes celulares, no tóxicos, estables, económicos, fáciles de utilizar, que permitan obtener unos resultados reproducibles y adaptados a los mecanismos de coloración. En particular, subsiste una necesidad de un producto de fijación de los tejidos, células o elementos celulares sobre unos portaobjetos para su estudio con microscopio, que responda a estas exigencias y que se adapte a diferentes procedimientos de coloración.

20 Esto es a lo que responde la presente invención proponiendo utilizar una composición de fijación histológica o citológica que palie los inconvenientes de la técnica anterior, particularmente adaptada al campo de la hematología. La invención tiene como objeto para ello la utilización de una composición que comprenda por lo menos:

- un alcohol,
- dimetilsulfóxido,
- 25 - etilenglicol,
- agua, y
- cloruro de sodio,

30 para fijar unos tejidos, células o componentes celulares en un portaobjetos para su coloración y su análisis con microscopio o por un sistema de análisis de imagen.

La invención tiene también como objeto la composición de fijación histológica o citológica, o fijadora, utilizada.

35 Ventajosamente, dicha composición de fijación no contiene ningún producto tóxico. Permite conservar eficazmente las células para su coloración, con el fin de obtener unos resultados reproducibles y estables fácilmente analizables con microscopio o por unos sistemas de análisis de imagen.

40 La invención se refiere también a un procedimiento de preparación de esta composición. Preferentemente, la composición de fijación comprende también por lo menos un colorante azul y un colorante rojo, y puede ser utilizada simultáneamente al mismo tiempo para fijar y colorear las células.

Finalmente, la invención tiene también como objeto un procedimiento de coloración de células o de elementos celulares, adaptado en particular para la sangre y la médula, que utiliza la composición de fijación.

45 De manera ventajosa, el procedimiento según la invención permite obtener unos resultados reproducibles, de muy buena calidad. Además, es económico, rápido, fiable, fácil de utilizar y necesita sólo un bajo contenido en colorantes.

La invención se describe ahora en detalle en relación con las figuras adjuntas, en las que:

- 50 - la figura 1a representa un frotis sanguíneo después de una coloración MGG,
- la figura 1b representa un frotis sanguíneo después de una coloración MGG con una mala fijación,
- 55 - la figura 1c representa un frotis sanguíneo después de una coloración Wright,
- la figura 1d representa un frotis sanguíneo después de una coloración Leishman,
- la figura 2a representa un frotis sanguíneo después de la fijación y de la coloración por la composición según la invención, mediante la utilización de un procedimiento de coloración de tipo coloración MGG,
- 60 - la figura 2b representa un frotis sanguíneo después de la fijación y coloración por la composición según la invención, mediante la utilización de un procedimiento de coloración de tipo coloración de Wright/Leishman,
- 65 - la figura 3a representa un frotis sanguíneo después de una coloración rápida con un procedimiento que comprende una etapa de fijación preliminar durante 1 minuto con etanol a 70° + un 2% de etilenglicol,

- la figura 3b representa un frotis sanguíneo después de una coloración rápida con un procedimiento que comprende una etapa de fijación preliminar durante 1 minuto con etanol a 99,9° + un 2% de etilenglicol,
- 5 - la figura 3c representa un frotis sanguíneo después de una coloración rápida con un procedimiento que comprende una etapa de fijación preliminar durante 5 minutos con etanol a 99,9° + un 2% de etilenglicol,
- la figura 4 representa un frotis sanguíneo después de una coloración rápida con un procedimiento que  
10 comprende una etapa de fijación preliminar durante 5 minutos con etanol a 99,9° + un 2% de etilenglicol +  
dimetilsulfóxido,
- la figura 5a representa un frotis sanguíneo después de una coloración rápida con un procedimiento que  
15 comprende una etapa de fijación preliminar durante 5 minutos con etanol a 99,9° + un 2% de etilenglicol +  
dimetilsulfóxido + 5 ml de agua,
- la figura 5b representa un frotis sanguíneo después de una coloración rápida con un procedimiento que  
20 comprende una etapa de fijación preliminar durante 5 minutos con etanol a 99,9° + un 2% de etilenglicol +  
dimetilsulfóxido + 10 ml de agua,
- la figura 5c representa un frotis sanguíneo después de una coloración rápida con un procedimiento que  
25 comprende una etapa de fijación preliminar durante 5 minutos con etanol a 99,9° + un 2% de etilenglicol +  
dimetilsulfóxido + 20 ml de agua,
- la figura 6a representa un frotis sanguíneo después de una coloración rápida con un procedimiento que  
30 comprende una etapa de fijación preliminar durante 5 minutos con etanol a 99,9° + un 2% de etilenglicol +  
dimetilsulfóxido + 5 ml de agua + 0,1 g de cloruro de sodio,
- la figura 6b representa un frotis sanguíneo después de una coloración rápida con un procedimiento que  
35 comprende una etapa de fijación preliminar durante 5 minutos con etanol a 99,9° + un 2% de etilenglicol +  
dimetilsulfóxido + 5 ml de agua + 0,3 g de cloruro de sodio, y
- la figura 6c representa un frotis sanguíneo después de una coloración rápida con un procedimiento que  
comprende una etapa de fijación preliminar durante 5 minutos con etanol a 99,9° + un 2% de etilenglicol +  
40 dimetilsulfóxido + 5 ml de agua + 0,2 g de cloruro de sodio.

La invención tiene como objeto la utilización para efectuar la fijación de tejidos y/o de células y/o de estructuras celulares sobre un portaobjetos para su coloración y para su análisis con microscopio o con la ayuda de un sistema de análisis de imagen, de una composición que comprende por lo menos un alcohol, dimetilsulfóxido, etilenglicol, agua y cloruro de sodio.

Preferentemente, la composición se utiliza para fijar unas células y/o estructuras celulares de la sangre o de la médula.

Ventajosamente, la composición puede contener también uno o varios colorantes y ser utilizada para efectuar simultáneamente la fijación y la coloración de tejidos y/o de células y/o de estructuras celulares.

La invención se refiere también a una composición particular de fijación histológica o citológica, también denominada fijadora.

Por composición de fijación o fijadora en el sentido de la presente invención, se entiende un reactivo que permite detener los fenómenos de autólisis de las células y tejidos con el fin de que conserven un aspecto tan parecido como sea posible al que tienen en estado vivo. Dicho reactivo permite por lo tanto respetar la morfología e inmovilizar las células y tejidos con el objetivo de realizar unas preparaciones microscópicas que podrán ser conservadas. Debe también permitir realizar unos tratamientos complementarios, como coloraciones, reacciones histoquímicas o inmunológicas, con el fin de revelar ciertos aspectos estructurales, funcionales o genéticos de las células y tejidos.

La composición comprende por lo menos un alcohol, dimetilsulfóxido, etilenglicol, agua y cloruro de sodio.

El alcohol se puede seleccionar de entre todos los alcoholes no tóxicos. Preferentemente, el alcohol es el etanol o el isopropanol.

Puede tratarse también de una mezcla de alcoholes.

Según un modo de realización particularmente adaptado, el alcohol es el etanol. El agua puede ser agua desmineralizada o agua desionizada.

5 Con el fin de obtener una mejor eficacia de la composición, el agua y el cloruro de sodio deben estar presentes en proporciones particulares. Asimismo, según un modo de realización particularmente adaptado, el cloruro de sodio está presente entre un 0,1 y un 0,5% en masa del total de la composición, y el agua entre un 2 y un 12%, preferentemente entre un 2,6 y un 8,0%, en masa total de la composición. Aún más preferentemente, el cloruro de sodio está presente entre un 0,2 y un 0,3% y el agua entre un 3 y un 6%. Asimismo, el alcohol está presente entre un 40 y un 60% en masa del total de la composición, y el etilenglicol entre un 0,1 y un 1% en masa del total de la composición. Aún más preferentemente, el alcohol está presente entre un 50 y un 60% y el etilenglicol entre un 0,1 y un 0,5%.

10 Además, se obtienen unos resultados particularmente interesantes cuando el DMSO está presente entre un 30 y un 40% en masa del total de la composición.

15 Comparando las diferentes figuras 3a a 6c, se constata que la presencia de cada uno de los componentes alcohol, etilenglicol, dimetilsulfóxido, cloruro de sodio y agua, es importante. Es la mezcla de estos constituyentes particulares, lo cual permite que la composición se pueda fijar las células, que podrán después ser fácilmente coloreadas y analizadas.

20 En las figuras 3a a 6c, las células se fijan con unas composiciones que comprenden la totalidad o parte de los constituyentes de la composición según la invención, y después se colorean mediante una técnica de coloración rápida como la utilizada en el kit RAL 555 (RAL<sup>®</sup>): se sumerge el portaobjetos fijado en un primer colorante rojo durante 5 segundos, después en un colorante azul durante 5 segundos y finalmente se aclara y se seca el portaobjetos. Los resultados obtenidos son mejores cuando el alcohol, el etilenglicol, el dimetilsulfóxido, el cloruro de sodio y el agua están presentes en la composición de fijación.

25 La composición según la invención se puede obtener mediante un procedimiento de fabricación que comprende por lo menos la realización de las etapas siguientes:

- mezclar alcohol y etilenglicol con el fin de obtener una solución 1,
- disolver cloruro de sodio en agua con el fin de obtener una solución 2,
- 30 - añadir la solución 2 en la solución 1 bajo agitación, y después añadir dimetilsulfóxido, y
- filtrar.

35 Según una variante, la composición de fijación según la invención comprende también por lo menos un colorante azul, y por lo menos un colorante rojo.

El colorante azul se puede seleccionar de entre el azul de metileno y/o el azul azur I y/o un colorante azul que pertenece al grupo de las tiazinas.

40 El colorante rojo se puede seleccionar de entre la eosina y/o la eritrosina. Preferentemente, el o los colorantes azul y rojo están disueltos en dimetilsulfóxido.

Según un modo de realización particularmente adaptado, la composición según la invención comprende:

- 45 - dimetilsulfóxido,
- un alcohol, por ejemplo etanol o isopropanol, o una mezcla de alcoholes,
- etilenglicol,
- agua,
- cloruro de sodio,
- 50 - azul de metileno -Eosina,
- azul azur I, Eosina,
- azul de metileno,
- azul azur I de metileno, y
- un compuesto del grupo de las tiazinas.

55 En particular, la composición según la invención puede comprender:

- aproximadamente un 32% (en volumen) de DMSO,
- aproximadamente un 63% (en volumen) de alcohol,
- aproximadamente un 0,1% (en volumen) de etilenglicol,
- 60 - aproximadamente un 4,9% (en volumen) de agua,
- aproximadamente un 20% (en peso de materia seca) de azul de metileno -Eosina,
- aproximadamente un 20% (en peso de materia seca) de azul azur I - Eosina,
- aproximadamente un 8% (en peso de materia seca) de azul de metileno,
- aproximadamente un 8% (en peso de materia seca) de azul azur I de metileno,
- 65 - aproximadamente un 4% (en peso de materia seca) de un compuesto del grupo de las tiazinas, y
- aproximadamente un 40% (en peso de materia seca) de cloruro de sodio.

Ventajosamente, dicha composición permite efectuar simultáneamente la coloración y la fijación de los tejidos, células o componentes celulares.

5 Se puede obtener mediante un procedimiento de fabricación que comprende por lo menos la realización de las etapas siguientes:

- preparar una solución 4 que comprenda por lo menos dimetilsulfóxido, un colorante azul y un colorante rojo,
- mezclar un alcohol y etilenglicol con el fin de obtener una solución 1,
- 10 - disolver el cloruro de sodio en agua con el fin de obtener una solución 2,
- añadir la solución 2 en la solución 1 bajo agitación con el fin de obtener una solución 3,
- añadir la solución 3 bajo agitación en la solución 4, y
- filtrar.

15 Los colorantes de la solución 4 se disuelven en DMSO.

Preferentemente, el alcohol es el etanol.

20 Ventajosamente, el fijador según la invención está desprovisto de productos tóxicos permitiendo al mismo tiempo una buena fijación de los tejidos, células y estructuras celulares. Es particularmente adecuado para la fijación de los frotis sanguíneos y medulares.

25 Según otra ventaja, la composición de fijación se puede utilizar de diferentes maneras y aplicar a diferentes procedimientos de coloración, tanto los que utilizan una combinación de reactivos de coloración como los que hacen intervenir un reactivo de coloración único.

30 La invención tiene no obstante como objeto unos procedimientos particulares de coloración que utilizan este fijador. Se trata de procedimientos de coloración de células o de estructuras celulares, en particular para la sangre y la médula.

Estos procedimientos comprenden por lo menos una etapa que consiste en poner en contacto la preparación a colorear con una composición de fijación objeto de la invención.

35 Según una primera variante, el procedimiento de coloración comprende por lo menos las etapas siguientes:

- poner en contacto una preparación a colorear, por ejemplo un portaobjetos que lleva unos frotis sanguíneos o medulares a analizar, con una composición de fijación según la invención, preferentemente entre 5 y 10 minutos;
- 40 - poner en contacto la preparación fijada con una solución tampón a pH comprendido entre 6,5 y 7, preferentemente entre 3 y 8 minutos, con el fin de activar y controlar el proceso de coloración preparado por el fijador según la invención; puede ser ventajoso en esta etapa no eliminar todo el fijador durante el paso en la solución tampón,
- 45 - poner en contacto, eventualmente agitando ligeramente, la preparación con una solución de aclarado, preferentemente entre 5 y 20 segundos, cuyas funciones son detener la coloración eliminando los colorantes en exceso, y afinar la coloración de las estructuras celulares.

50 Este procedimiento corresponde a una coloración de tipo "coloración de Wright/Leishman".

Según una segunda variante, el procedimiento de coloración comprende por lo menos las etapas siguientes:

- poner en contacto una preparación a colorear con una composición de fijación según la invención, preferentemente entre 5 y 8 minutos,
- 55 - poner en contacto la preparación fijada con una solución tampón a pH comprendido entre 6,8 y 7,2, preferentemente entre 2 y 3 minutos, con el fin de activar y controlar el proceso de coloración preparado por el fijador según la invención,
- 60 - poner en contacto, eventualmente agitando ligeramente, la preparación con un reactivo de coloración complementario, preferentemente entre 1 y 3 minutos, que actúa en medio tamponado y permite perfeccionar la coloración para ciertas condiciones de utilización,
- poner en contacto la preparación con una solución de aclarado, preferentemente entre 5 y 20 segundos.

65 Este procedimiento corresponde a una coloración de tipo "coloración de May-Grünwald Giemsa".

El tampón utilizado para la realización de los procedimientos según la invención puede estar compuesto por agua, por fosfato disódico, por fosfato monopotásico, por un agente anti-microbiano y por un tensioactivo no iónico.

5 El reactivo de coloración complementario puede estar compuesto por azul de metileno, por azul azur I de metileno y por un compuesto del grupo de las tiazinas disuelto en DMSO, y por fosfato disódico y por fosfato monopotásico disuelto en agua.

10 El líquido de aclarado, por su parte, puede estar compuesto por fosfato disódico, por fosfato monopotásico, por un agente antimicrobiano y por isopropanol disuelto en agua.

Después del secado al aire, los portaobjetos están listos para ser observados directamente con microscopio o por un sistema de análisis de imagen.

15 Ventajosamente, con los productos utilizados, en particular con el fijador según la invención, es posible garantizar una estandarización de las coloraciones y obtener una reproducibilidad de los colores. Están relacionadas con la composición de los productos, en particular del fijador, pero también con el hecho de que se trata de productos listos para usar. En efecto, la utilización de tales productos evita introducir un factor humano en la preparación de las soluciones, en particular suprimiendo las etapas de dilución y de utilización de productos complementarios de  
20 calidad variable que degradan la calidad y la reproducibilidad de las coloraciones.

Esta reproducibilidad constituye una referencia estable en la que pueden basarse los sistemas de análisis de imagen. Estos sistemas, responsables de identificar y clasificar los diferentes tipos celulares, localizando las anomalías eventuales, indicios posibles de la presencia de una patología, pueden ser utilizados sólo si los resultados  
25 obtenidos son reproducibles.

Además, el fijador y los reactivos utilizados según la invención se pueden utilizar en mecanismos de coloración, ya que su utilización limita los depósitos, disminuyendo así considerablemente el coste de explotación de estas  
30 máquinas.

Según otra ventaja, la invención permite obtener excelentes contrastes visuales, permitiendo una identificación precisa de los diferentes tipos celulares, y sin depósito de colorante, fuente de artefactos diversos. Se constata en particular en las figuras 2a y 2b que el contraste obtenido es mejor que el obtenido con los productos de la técnica anterior (figuras 1a, 1b, 1c y 1d).  
35

La invención se ilustra ahora mediante un ejemplo no limitativo aplicado a la hematología.

### **Material**

#### 40 Composición de fijación (producto 1)

La composición de fijación se prepara de la siguiente manera.

Para 1 l de producto:

- 45
- se prepara una solución A disolviendo en 280 a 380 ml de DMSO los siguientes colorantes: azul de metileno - Eosina, azul azur I - Eosina, azul de metileno, azul azur I de metileno, un compuesto del grupo de las tiazinas,

50

  - se prepara una solución B mezclando entre 550 y 680 ml de etanol con aproximadamente 1 ml de etilenglicol,
  - se prepara una solución C disolviendo entre 1 y 4 g de cloruro de sodio en 40 a 60 ml de agua,

55

  - se prepara una solución D añadiendo la solución C bajo agitación a la solución B,
  - se añade bajo agitación la solución A a la solución D, y
  - se filtra la mezcla.

#### 60 Tampón (producto 2)

El tampón se prepara mediante la realización del protocolo descrito a continuación.

65 Para 1 l de producto, se disuelven en aproximadamente 1 l de agua, entre 0,189 y 0,530 g de fosfato disódico, entre 0,399 y 0,726 g de fosfato monopotásico, aproximadamente 1 g de agente antimicrobiano y aproximadamente 1 g de tensioactivo no iónico. Después, se filtra el conjunto.

Reactivo de coloración complementario (producto 3)

El reactivo de coloración complementario se prepara de la siguiente manera.

- 5 Para 1 l de producto:
- se prepara una primera solución disolviendo entre 10 y 15 ml de DMSO los siguientes colorantes: azul de metileno, azul azur I de metileno y un compuesto del grupo de las tiazinas,
  - 10 - se prepara una segunda solución disolviendo entre 985 y 990 ml de agua, entre 5 y 8 g de fosfato disódico y entre 1,5 y 3 g de fosfato monopotásico,
  - se añade la primera solución bajo agitación a la segunda solución, y
  - 15 - se filtra la mezcla.

Líquido de aclarado (producto 4)

20 El líquido de aclarado se obtiene, para 1 l de producto, disolviendo en aproximadamente 940 ml de agua, entre 0,3 y 0,5 g de fosfato disódico, entre 0,3 y 0,5 g de fosfato monopotásico, aproximadamente 0,1 g de un agente antimicrobiano, y entre 45 y 50 g de alcohol (preferentemente isopropanol). Después, se filtra el conjunto.

**Ejemplo de procedimiento de coloración: resultados de tipo "coloración de May-Grünwald Giemsa"**

- 25 Para obtener unos resultados reconocidos por los especialistas de la profesión como una coloración de tipo "coloración de May-Grünwald Giemsa", es posible realizar la sucesión de las siguientes etapas:
- 30 - poner en contacto durante de 5 a 8 minutos un portaobjetos que lleva un frotis sanguíneo o medular a analizar con el producto 1,
  - poner en contacto durante de 2 a 3 minutos el portaobjetos con el producto 2,
  - 35 - poner en contacto durante de 1 a 3 minutos el portaobjetos con el producto 3, y
  - poner en contacto durante de 5 a 20 segundos, eventualmente agitando ligeramente, el portaobjetos con el producto 4.

40 Después del secado al aire, los portaobjetos están listos para ser observados directamente con microscopio o por un sistema de análisis de imagen.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 2a.

**Ejemplo de procedimiento de coloración: resultados de tipo "coloración de Wright/Leishman"**

- 45 Para obtener unos resultados reconocidos por los especialistas de la profesión como una coloración de tipo "coloración de Wright/Leishman", es posible llevar a cabo la sucesión de las etapas siguientes:
- 50 - poner en contacto durante de 5 a 10 minutos un portaobjetos que tiene un frotis sanguíneo o medular a analizar con el producto 1,
  - poner en contacto durante de 3 a 8 minutos el portaobjetos con el producto 2, y
  - 55 - poner en contacto durante de 5 a 20 segundos, eventualmente agitando ligeramente, el portaobjetos con el producto 4.

Después del secado al aire, los portaobjetos están listos para ser observados directamente con microscopio o mediante un sistema de análisis de imagen.

60 Los resultados obtenidos se presentan en la figura 2b.

Por supuesto, la invención no está evidentemente limitada al modo de realización representado y descrito anteriormente, sino que, por el contrario, cubre todas sus variantes.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición de fijación de tejidos, y/o de células y/o estructuras celulares con vistas a su coloración y a su análisis por microscopio o por un sistema de análisis de imagen, caracterizada por que comprende por lo menos los componentes siguientes, siendo los porcentajes dados en masa con respecto a la composición total:
- entre un 40 y un 60% de alcohol,
  - dimetilsulfóxido,
  - 10 - entre un 0,1 y un 1% de etilenglicol,
  - entre un 2 y un 12% de agua, y
  - entre un 0,1 y un 0,5% de cloruro de sodio.
- 15 2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por que el alcohol es el etanol o el isopropanol.
- 15 3. Composición según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que el dimetilsulfóxido está presente entre un 30 y un 40% en masa de la composición total.
- 20 4. Composición según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que comprende también por lo menos un colorante azul y por lo menos un colorante rojo.
- 20 5. Composición según la reivindicación 4, caracterizada por que el colorante azul se selecciona de entre el azul de metileno y/o el azul azur I y/o un colorante azul que pertenece al grupo de las tiazinas, y por que el colorante rojo se selecciona de entre la eosina y/o eritrosina.
- 25 6. Procedimiento de fabricación de una composición según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que comprende por lo menos la realización de las etapas siguientes:
- mezclar alcohol y etilenglicol de manera que se obtenga una solución 1,
  - disolver cloruro de sodio en agua de manera que se obtenga una solución 2,
  - 30 - añadir la solución 2 en la solución 1 bajo agitación, y después dimetilsulfóxido, y
  - filtrar.
- 35 7. Procedimiento de fabricación de una composición según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que comprende por lo menos la realización de las siguientes etapas:
- preparar una solución 4 que comprende por lo menos dimetilsulfóxido, un colorante azul y un colorante rojo,
  - mezclar un alcohol y etilenglicol de manera que se obtenga una solución 1,
  - disolver cloruro de sodio en agua de manera que se obtenga una solución 2,
  - añadir la solución 2 en la solución 1 bajo agitación de manera que se obtenga una solución 3,
  - 40 - añadir la solución 3 bajo agitación en la solución 4, y
  - filtrar.
- 45 8. Procedimiento de fabricación según la reivindicación 7, caracterizado por que la solución 4 se obtiene disolviendo en dimetilsulfóxido los colorantes siguientes:
- azul de metileno -Eosina,
  - azul azur I, Eosina,
  - azul de metileno,
  - azul azur I de metileno, y
  - 50 - un compuesto del grupo de las tiazinas.
- 55 9. Procedimiento de fabricación según una de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizado por que el alcohol es el etanol o el isopropanol.
- 55 10. Procedimiento de coloración de células o de estructuras celulares, en particular para la sangre y la médula, caracterizado por que comprende por lo menos una etapa que consiste en poner en contacto la preparación a colorear con una composición de fijación según una de las reivindicaciones 4 o 5.
- 60 11. Procedimiento de coloración según la reivindicación 10, que comprende además las etapas siguientes:
- poner en contacto la preparación fijada con una solución tampón a pH comprendido entre 6,5 y 7,0,
  - poner en contacto la preparación con una solución de aclarado.
- 65 12. Procedimiento de coloración según una de las reivindicaciones 10 u 11, caracterizado por que:
- la preparación a colorear se pone en contacto en la composición de fijación durante 5 a 10 minutos,

## ES 2 555 219 T3

- la preparación fijada se pone en contacto en la solución tampón a pH comprendido entre 6,5 y 7,0 durante 3 a 8 minutos, y
- 5
- la preparación resultante se pone en contacto con una solución de aclarado durante de 5 a 20 segundos.
13. Procedimiento de coloración según la reivindicación 10, que comprende además las etapas siguientes:
- 10
- poner en contacto la preparación fijada con una solución tampón a pH comprendido entre 6,8 y 7,2,
  - poner en contacto la preparación con un reactivo de coloración complementario,
  - poner en contacto la preparación con una solución de aclarado.
14. Procedimiento de coloración según la reivindicación 13, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:
- 15
- poner en contacto durante 5 a 8 minutos la preparación a colorear con una composición de fijación según una de las reivindicaciones 4 o 5,
- 20
- poner en contacto durante 2 a 3 minutos la preparación fijada con una solución tampón a pH comprendido entre 6,8 y 7,2,
  - poner en contacto durante 1 a 3 minutos la preparación con un reactivo de coloración complementario,
  - poner en contacto durante 5 a 20 segundos la preparación con una solución de aclarado.

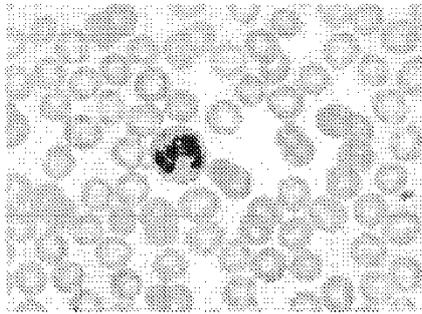


Fig. 1a

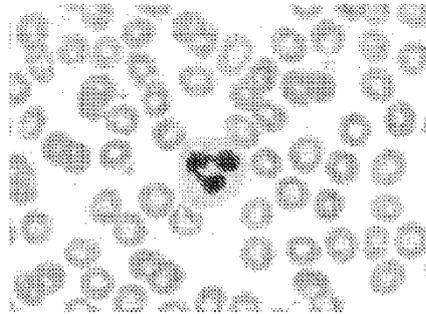


Fig. 1b

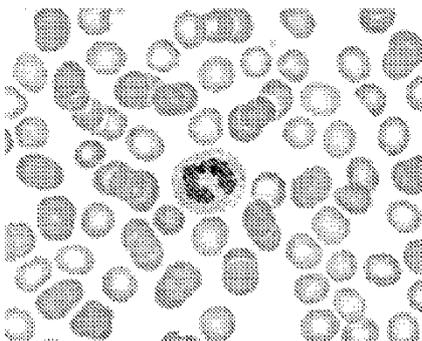


Fig. 1c

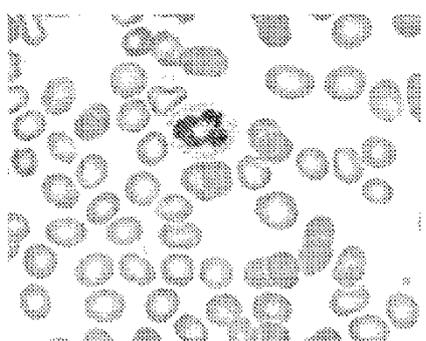


Fig. 1d

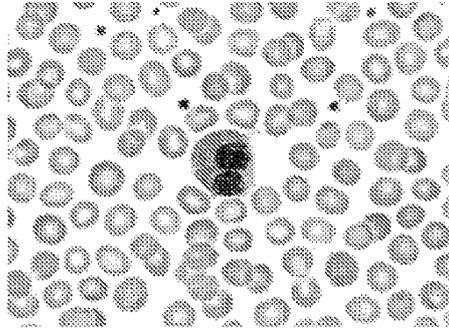


Fig. 2a

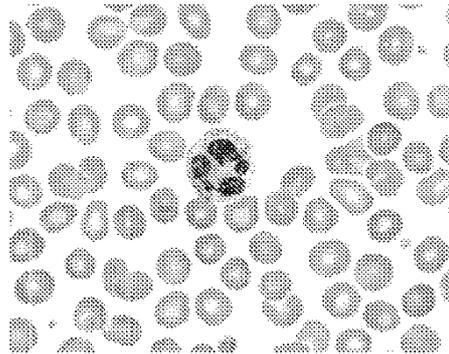


Fig. 2b

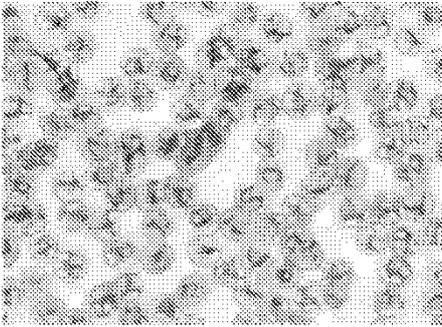


Fig. 3a

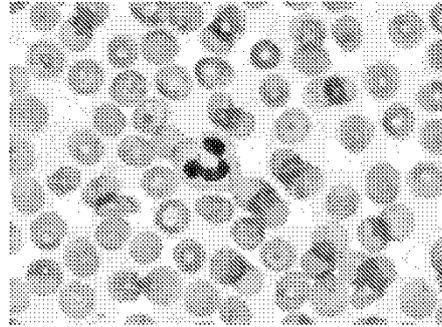


Fig. 3b

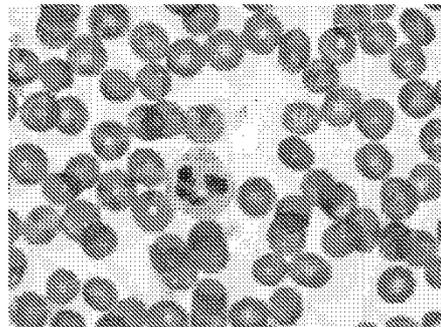


Fig. 3c

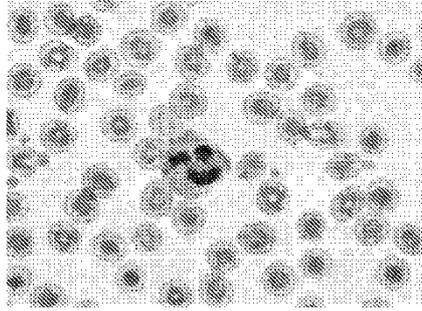


Fig. 4

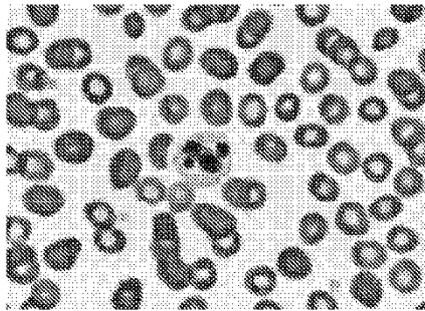


Fig. 5a

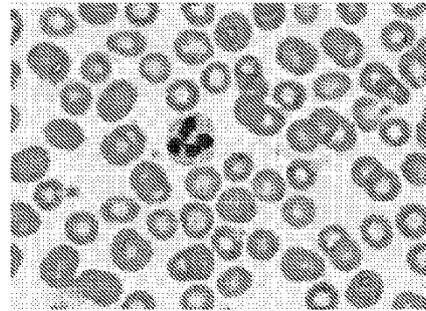
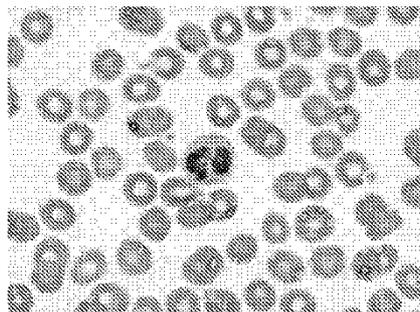


Fig. 5b

Fig. 5c



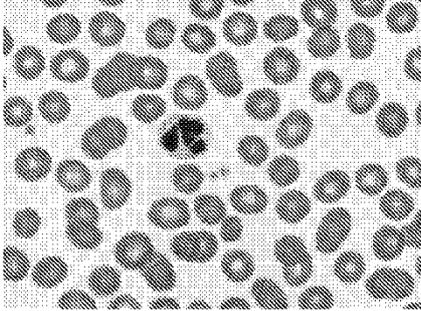


Fig. 6a

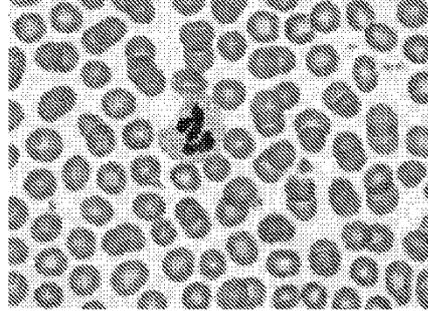


Fig. 6b

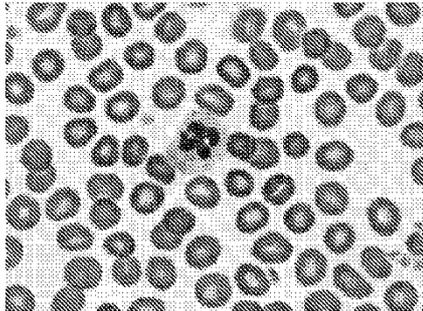


Fig. 6c