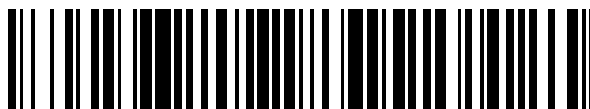


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 030**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/06 (2006.01)

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.08.2011** **PCT/US2011/046965**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2012** **WO12021458**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2011** **E 11748829 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017** **EP 2603786**

54 Título: **Composición isotónica tamponada y método que permite el recuento de células**

30 Prioridad:

09.08.2010 US 853046

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

10.07.2017

73 Titular/es:

BECKMAN COULTER, INC. (100.0%)
250 S. Kraemer Boulevard
Brea, CA 92821, US

72 Inventor/es:

GOLDSON, WAYNE y
SOCARRAS, SANDRA

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 623 030 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 isotónica tamponada y método que permite el recuento de células

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición de fluido de dosificación para analizadores celulares automatizados que utilizan dosificación volumétrica de líquidos. La invención se refiere también a métodos de control del inicio y finalización de un episodio de conteo de un analizador celular automatizado que utiliza dosificación volumétrica de líquidos.

10

Antecedentes de la invención

Los analizadores celulares automatizados, tales como los analizadores de hematología, permiten el conteo y la caracterización de células en una muestra celular. Algunos de dichos instrumentos detectan cambios en la conductancia eléctrica a medida que las células son arrastradas a través de una pequeña abertura. Las células conducen la electricidad de forma diferente que el fluido que las rodea. Por lo tanto, su paso a través del orificio altera su sección transversal eficaz y por lo tanto su conductividad. El conteo preciso y la caracterización precisa de células realizados por dichos dispositivos requiere una capacidad de medición precisa del volumen de muestra analizado durante un episodio de conteo. Un modo de hacerlo es utilizando dosificación volumétrica de líquidos, en donde el flujo de un volumen específico de un fluido a través de un capilar controla el inicio y el final de un episodio de conteo.

El sistema de dosificación de analizadores celulares automatizados que utilizan dosificación volumétrica líquida puede comprender un tubo de dosificación, un sensor de inicio y un sensor de finalización. El sensor de inicio y el sensor de finalización están situados en extremos opuestos del tubo de dosificación. Ambos sensores pueden ser sensores ópticos, calibrados para detectar un cambio en la intensidad lumínica que se produce a medida que pasa el menisco del fluido de dosificación. El flujo de un fluido de dosificación de líquidos a través del tubo de dosificación pasa primero por el sensor de inicio y a continuación pasa por el sensor de finalización, activando así el inicio y finalización de un episodio de conteo.

Actualmente, los analizadores celulares automatizados que utilizan dosificación volumétrica de líquidos tienen el tubo y los sensores de dosificación orientados en vertical, de modo que el sensor de inicio se sitúa en la parte superior del tubo de dosificación y el sensor de finalización se sitúa en el fondo del tubo de dosificación. El fluido de dosificación fluye de arriba a abajo, activando primero el sensor de inicio y después el sensor de finalización. En esta orientación, puede surgir el problema de "flujo lateral" de líquido. Debido a los efectos de la gravedad en el fluido de dosificación de líquidos, parte del fluido puede fluir más rápidamente a lo largo de una cara de la pared interna del tubo de dosificación, modificando el ángulo del menisco de modo que los sensores de inicio y de finalización no lo detectarán. En este caso, falla la dosificación. Para combatir este problema, los fluidos de dosificación se diseñan con tensiones superficiales relativamente altas que reducen la probabilidad del flujo lateral. Sin embargo, incluso con un fluido de dosificación con una tensión superficial relativamente alta, se puede producir flujo lateral si se depositan restos celulares sobre el tubo de dosificación.

Recientemente, se han diseñado analizadores celulares automatizados con sistemas de dosificación volumétrica de líquidos que eliminan el problema del flujo lateral. Dichos instrumentos se utilizan como un tubo de dosificación orientado en vertical, pero el fluido de dosificación fluye de abajo a arriba. El sensor de inicio se sitúa en el fondo del tubo de dosificación y el sensor de finalización se sitúa en la parte superior del tubo de dosificación. Por lo tanto, el fenómeno del flujo lateral se elimina por completo a medida que los efectos de la gravedad sobre el fluido de dosificación dejan de ser relevantes. El desarrollo de estos instrumentos necesitaba el desarrollo de reactivos de dosificación novedosos, puesto que los reactivos existentes no eran adecuados para usar en estos sistemas nuevos.

Los analizadores celulares automatizados se disponen a menudo de modo que una cara del orificio es un baño de muestra que recibe la muestra celular suspendida en un diluyente isotónico antes del análisis. En la otra cara del orificio se encuentra un reactivo de aclarado que actúa retirando las células del orificio después de su conteo. El reactivo de aclarado está en comunicación de fluidos con el baño de muestra y por lo tanto se puede producir un flujo de retorno en donde parte del reactivo de aclarado pasa al baño de muestra y entra en contacto con la muestra celular, especialmente cuando el instrumento no está en funcionamiento. Tradicionalmente, el diluyente isotónico utilizado para suspender la muestra celular se utiliza también como reactivo de aclarado. Por lo tanto, los fluidos en ambas caras del orificio son tradicionalmente los mismos.

Muchos de los fluidos de dosificación comerciales y reactivos de aclarado para usar en analizadores celulares automatizados producen formaldehído en cantidades que superan aproximadamente 400 partes por millón. El formaldehído ha sido clasificado como carcinógeno humano por la International Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer - IARC) perteneciente a la OMS y es también tóxico y alergénico. Las entidades reguladoras de estados como California y Massachusetts han ido restringiendo cada vez más la cantidad de formaldehído permitido en residuos industriales y médicos. Conforme a dichas regulaciones, se consideran exentos de formaldehído los residuos con concentraciones de formaldehído iguales o inferiores a 1 parte por millón. En consecuencia, son altamente deseables diluyentes, fluidos de dosificación y reactivos de aclarado para usar en analizadores celulares automatizados que produzcan menos de 1 parte por millón (ppm) de formaldehído en el transcurso de su período de validez.

La solicitud WO2007/081387 describe dispositivos para microfluidos, kits y métodos para llevar a cabo pruebas analíticas de alto rendimiento.

- 5 La patente US-6.632.676 B1 describe un sistema reactivo para usar con analizadores hematológicos automatizados y semiautomatizados.

La presente invención mejora los fluidos de dosificación actualmente disponibles al describir fluidos de dosificación estables optimizados para su uso en analizadores celulares automatizados que utilizan una
10 disposición de tubo de dosificación ascendente. Los fluidos de dosificación de la presente invención tienen una tensión superficial relativamente baja y capacidad detergente, lo que ayuda a prevenir la deposición de restos celulares sobre las superficies internas del instrumento, simplificando la limpieza y el mantenimiento del analizador celular. Los fluidos de dosificación de la presente invención son también isotónicos y no hemolíticos y,
15 por lo tanto, adecuados para su uso como reactivo de aclarado. En comparación con los diluyentes tradicionalmente utilizados como reactivos de aclarado, las composiciones de la presente invención tienen capacidad detergente. Por lo tanto, cuando se utilizan como reactivo de aclarado, los fluidos de dosificación de la presente invención ayudan a prevenir la deposición de desechos celulares en el orificio y alrededor de este.

Los fluidos de dosificación de la invención se pueden utilizar también para lavar el analizador celular entre
20 episodios de conteo y para retirar desechos celulares de las superficies internas del instrumento. Las composiciones de fluido de dosificación de la presente invención preferiblemente tienen también una amplia actividad biocida, son isotónicas, no hemolíticas y producen meniscos con ángulos que activan adecuadamente los sensores de inicio y de finalización, comenzando y finalizando el intervalo de conteo. De forma ventajosa, las composiciones de fluido de dosificación de la presente invención producen también menos de aproximadamente 1
25 parte por millón de formaldehído en el transcurso de sus períodos de validez.

Breve sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones anexas y se refiere a composiciones no hemolíticas para
30 usar en analizadores celulares automatizados que utilizan dosificación volumétrica líquida. En determinadas realizaciones, las composiciones comprenden un agente quelante, una sal ionizante, y un tensioactivo no hemolítico. En determinadas realizaciones, las composiciones son útiles como fluido de dosificación y/o reactivo de aclarado.

Por lo tanto, la invención proporciona una composición para utilizar en un analizador celular automatizado que
35 utiliza dosificación volumétrica líquida, comprendiendo la composición: a) un agente quelante presente a una concentración de 0,05 g/l a 6,0 g/l, b) una sal ionizante presente a una concentración de 0,1 g/l a 5 g/l, y c) un tensioactivo no hemolítico presente a una concentración de 0,1 g/l a 3,0 g/l, en donde la composición es no hemolítica, tiene un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5, y en donde:

- i) la tensión superficial de la composición es de entre aproximadamente 0,04 N/m (40 dinas/cm) y
40 aproximadamente 0,066 N/m (66 dinas/cm); o
- ii) la composición produce un menisco con un ángulo de entre aproximadamente 30° y aproximadamente 60° cuando fluye a través de un tubo de dosificación; o
- iii) la composición produce un menisco con un ángulo de entre aproximadamente 30° y aproximadamente 60° en un capilar de vidrio de borosilicato con un diámetro interno de 2,7 mm.

En determinadas realizaciones, las composiciones están en comunicación de fluidos con un analizador celular
45 automatizado. Por lo tanto, por ejemplo, los fluidos de dosificación de la presente invención se pueden almacenar en un recipiente de gran volumen conectado al analizador celular automatizado mediante un conector de tapa de rosca. El recipiente se puede configurar de modo que se puede conectar directamente al analizador celular automatizado.

50 La presente invención se refiere también a métodos de control del inicio y la finalización de un episodio de conteo con un analizador celular automatizado que utiliza dosificación volumétrica de líquidos.

Por lo tanto, la invención proporciona un método de control del inicio y el final de un episodio de conteo correspondiente a
55 un analizador celular automatizado que utiliza dosificación volumétrica de líquidos, comprendiendo el método: proporcionar a un tubo de dosificación una composición de fluido de dosificación de la presente invención; hacer fluir la composición de fluido de dosificación a través del tubo de dosificación; en donde el menisco del fluido de dosificación activa primero el sensor de inicio, comenzando el episodio de conteo, y activa a continuación el sensor de finalización, finalizando el episodio de conteo. En determinadas realizaciones, el método de control del inicio y la finalización de un episodio de
60 conteo con un analizador celular automatizado que utiliza dosificación volumétrica de líquidos además comprende la etapa de colocar la composición de fluido de dosificación en comunicación de fluidos con el baño de muestra.

Breve descripción de los dibujos/las figuras

Los dibujos que acompañan a la presente memoria, a la que se han incorporado y de la que forman parte, ilustran la presente invención y, junto con la descripción, sirven además para explicar los principios de la invención y para permitir realizar y utilizar la invención a un experto en la técnica pertinente.

- 5 La Figura 1 es un diagrama esquemático de los componentes de un analizador celular automatizado que utiliza dosificación volumétrica de líquidos.

Descripción detallada de la invención

10 Definiciones

El término “baja en formaldehído” en la presente memoria se refiere a una solución que tiene o produce menos de aproximadamente 1 parte por millón (ppm) de formaldehído durante un período de tiempo de al menos 1 año. En una realización, baja en formaldehído describe una solución que tiene o produce menos de aproximadamente 0,70 ppm de formaldehído durante un período de tiempo de al menos 1 año. En otra realización, baja en formaldehído describe una solución que tiene o produce menos de aproximadamente 0,10 ppm de formaldehído durante un período de tiempo de al menos 1 año. En una realización preferida, baja en formaldehído describe una solución que tiene o produce menos de aproximadamente 0,01 ppm de formaldehído durante un período de tiempo de al menos 1 año. En otras realizaciones, baja en formaldehído describe una solución que tiene o produce menos de aproximadamente 0,001 ppm de formaldehído durante un período de tiempo de al menos 1 año.

El formaldehído se puede medir utilizando el método 8315A de la EPA. Este método entraña derivatizar la muestra con 2,4-dinitrofenilhidrazina para convertir los grupos carbonilo de aldehídos presentes en las hidrazonas. Cada compuesto carbonílico presente en la muestra forma un derivado de hidrazona aparte y dichos derivados individuales se extraen de la solución utilizando un disolvente orgánico. Los derivados de hidrazona individuales se separan y cuantifican mediante High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta eficacia - HPLC). Los detalles del método 8315A de la EPA se pueden obtener en la página web de la EPA.

El término “tensión superficial” en la presente memoria se refiere a fuerzas de cohesión, tales como las fuerzas de Van der Waals, que unen moléculas líquidas. En el conjunto de un líquido, cada molécula de líquido es atraída igualmente en todas las direcciones por moléculas líquidas vecinas, dando lugar a una fuerza neta igual a cero. La superficie de un líquido es siempre una superficie de contacto entre ese líquido y algún otro medio. En la superficie de un líquido, las moléculas de líquido están en contacto con otras moléculas de líquido y también con la superficie del medio circundante (ya sea otro líquido, un gas, o un medio sólido). Por lo tanto, todas las moléculas de la superficie están sometidas a fuerzas cohesivas que las atraen hacia otras moléculas líquidas y a fuerzas adhesivas que las atraen o repelen con respecto a las moléculas del medio circundante. El líquido adoptará una geometría que iguala dichas fuerzas en la superficie límite.

Los solutos pueden tener un efecto en la tensión superficial de los líquidos. Por ejemplo, las sales inorgánicas tienden a aumentar la tensión superficial. Los tensioactivos y los alcoholes tenderán a disminuir la tensión superficial.

La tensión superficial se puede medir en términos de fuerza por longitud unidad como Newtons por metro (N/m) o dinas por centímetro (dina/cm) en (1 N/m = 1.000 dina/cm [1 dina/cm = 0,001 N/m]). Existen muchos métodos conocidos de determinación de la tensión superficial de un líquido, e incluyen medición del menisco del capilar (J.E. Lane, J. Colloid. Interface Sci., 42, 145-149 [1973]), mediciones del ángulo de contacto de avance y de retroceso de una placa Wilhelmy sumergida (R.H. Dettre, R.E. Johnson, J. Colloid. Interface Sci., 21, 367 [1966]), el método del anillo de DuNouy (W.D. Harkins, H.F. Jordan, J. Amer. Chem. Soc., 52, 1751 [1930]), y análisis de forma de gota colgante (K. Hansen, G. Rodsrud, J. Colloid. Interface Sci., 141, 1-12 [1991]). Una técnica habitualmente utilizada para medir la tensión superficial es el método del ascenso capilar. En el método del ascenso capilar se sumerge el extremo de un capilar en la solución que se desea medir. La altura a la que asciende la solución dentro del capilar está relacionada con la tensión superficial mediante la ecuación $y = \frac{2}{r} \frac{\gamma}{\rho g}$, en donde y es la tensión superficial del líquido, ρ es la densidad del líquido, h es el ascenso capilar, r es el radio del capilar y g es la aceleración debida a la gravedad. Las unidades de tensión superficial descritas en la presente memoria, salvo que se indique lo contrario, se midieron utilizando el método del ascenso capilar.

En la presente memoria, el término “menisco” se refiere a la curva en la superficie de un líquido que se produce como resultado de la compensación de las fuerzas cohesivas existentes entre las moléculas de líquido y las fuerzas adhesivas existentes entre las moléculas de líquido situadas en la superficie de contacto líquido/sólido y la superficie del sólido. Los meniscos pueden ser cóncavos, convexos o planos. Los meniscos convexos se producen cuando las moléculas de líquido se atraen entre sí con mayor intensidad que con respecto a la superficie del sólido. En cambio, los meniscos cóncavos se producen cuando las moléculas del líquido atraen a las de la superficie del sólido.

El ángulo del menisco (también conocido como ángulo de contacto) es el ángulo de intersección de la superficie de contacto líquido/vapor con la superficie del sólido. El ángulo del menisco es específico de cada sistema dado y se determina a partir de las fuerzas cohesiva y adhesiva que interactúan sobre las tres superficies de contacto. El ángulo de un menisco dado se puede medir utilizando un goniómetro de ángulo de contacto. De forma alternativa, el ángulo del menisco se puede calcular utilizando la ecuación de Young: $\gamma^{sv} = \gamma^{sl} + \gamma^{lv} \cos \theta$, en donde γ^{sv} = la

energía libre de la superficie del sólido, γ^{sl} = la energía libre de la superficie de contacto sólido/líquido, γ^{lv} = la energía libre de la superficie líquida y θ es el ángulo del menisco.

En la presente memoria, los términos “isotónico” o “iso-osmótico” se refieren a una solución que tiene aproximadamente la misma osmolalidad que la muestra celular que se desea analizar. Un fluido de dosificación demasiado hipotónico (con una menor osmolalidad que la muestra celular) puede dar lugar a la difusión del agua al interior de las células, lo que puede hacer a su vez que las células se hinchen y exploten, liberando desechos celulares que se pueden acumular sobre las superficies internas del instrumento. Un fluido de dosificación demasiado hipertónico (con una mayor osmolalidad que la muestra celular) puede dar lugar a la difusión desde las células hacia el exterior, lo que hará que las células se contraigan. En determinadas realizaciones, la muestra celular es de sangre. Los fluidos fisiológicos tales como la sangre pueden tener valores de osmolalidad comprendidos de aproximadamente 240 mOsm/kg a aproximadamente 340 mOsm/kg. Por lo tanto, cuando se utilizan fluidos fisiológicos como muestra celular, las soluciones isotónicas tendrán valores de osmolalidad comprendidos de aproximadamente 240 mOsm/kg a aproximadamente 340 mOsm/kg.

El término “agente antimicrobiano” en la presente memoria describe todo compuesto químico que es eficaz en términos de reducción o eliminación de microorganismos, incluidos, aunque no de forma limitativa, bacterias gram positivas, bacterias gram negativas, hongos y levadura.

El término “no hemolítico” en la presente memoria describe una solución que no ocasionará la lisis de un número significativo de células en una muestra celular cuando se exponen las células a la solución durante la cantidad de tiempo requerido para completar un conteo de la muestra celular con un analizador celular automatizado. De forma típica, un ciclo de conteo completo en el caso de un analizador celular automatizado es de un minuto o menos. Por lo tanto, por ejemplo, una solución que no produce lisis celular en aproximadamente un minuto de exposición a estas es no hemolítica.

Los analizadores celulares automatizados que utilizan la dosificación volumétrica de líquidos de la presente invención tendrán un sistema de dosificación que comprende un tubo de dosificación, un sensor de inicio, un sensor de finalización, y una cámara de vacío. El sensor de inicio y el sensor de finalización están situados en extremos opuestos del tubo de dosificación. Si el analizador celular automatizado tiene el tubo de dosificación en configuración ascendente, el tubo de dosificación estará dispuesto en vertical con el sensor de inicio situado en el fondo del tubo de dosificación y el sensor de finalización situado en la parte superior del tubo de dosificación. La parte superior del tubo de dosificación está comunicada con la cámara de vacío. Aplicando una presión negativa dentro de la cámara de vacío se forzará la ascensión del fluido de dosificación de líquidos a través del tubo de dosificación, pasando primero por el sensor de inicio y pasando a continuación por el sensor de finalización. Los sensores se calibran para detectar el paso del menisco por la superficie de contacto aire/líquido/tubo de dosificación.

El sensor de inicio y el sensor de finalización son sensores ópticos diseñados para detectar cambios en la intensidad de la luz. En determinadas realizaciones, los sensores de inicio y de finalización son sensores de tipo diodo emisor de luz (LED). Cuando la superficie del fluido de dosificación pasa por el sensor de inicio, la presencia del menisco de un ángulo apropiado ocasiona un cambio en la intensidad lumínica, lo que genera una señal eléctrica que activa el inicio del conteo. Cuando la superficie del fluido de dosificación alcanza el sensor de finalización, el menisco de un ángulo apropiado ocasiona de nuevo un cambio en la intensidad lumínica, lo que genera otra señal eléctrica que da lugar a la terminación del conteo. En la publicación de patente estadounidense n.º 2007/0269882 concedida a Zhang y col. se describe un dispositivo volumétrico para líquidos ilustrativo que utiliza un sistema de dosificación ascendente.

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un fluido de dosificación de baja tensión superficial para usar en analizadores celulares automatizados que utiliza un sistema de dosificación ascendente, y que produce un menisco con un ángulo en la superficie de contacto líquido/aire/tubo de dosificación que da lugar al cambio adecuado en intensidad lumínica para activar el comienzo y la finalización del intervalo de conteo. En algunos casos dichos reactivos se almacenan durante largos períodos de tiempo antes de usarlos, por lo que preferiblemente tienen propiedades antimicrobianas adecuadas para evitar el crecimiento de bacterias y hongos. También es importante para evitar el crecimiento de microorganismos dentro de los instrumentos, por ejemplo, dentro del tubo de dosificación, porque el crecimiento de organismos puede ocasionar la contaminación de los componentes del instrumento y afectar a la eficacia del sistema. Por ejemplo, los microorganismos pueden ser contados erróneamente como células de muestra, alterando los resultados del conteo. Por lo tanto, es preferible que un fluido de dosificación tenga acción antimicrobiana.

Las muestras celulares a menudo contienen proteínas y desechos procedentes de las células lisadas. Dichos materiales pueden precipitar sobre la superficie de los componentes del instrumento que están en contacto con las mezclas de muestra. Además, dichos materiales pueden también formar complejos insolubles con sustancias químicas presentes en el diluyente, precipitando sobre la superficie de los componentes del instrumento. Dichos precipitados se pueden acumular a lo largo del tiempo, ocasionando una obstrucción parcial o completa del orificio o tubo de dosificación, lo que puede hacer que el instrumento quede inutilizable o dar lugar a conteos celulares erróneos. Por lo tanto, son especialmente deseables reactivos de aclarado para usar en analizadores celulares automatizados que 1) sean no hemolíticos e isotónicos, y 2) tengan capacidad detergente que ayude a retirar las proteínas celulares precipitadas y desechos de las superficies interiores del instrumento.

Por lo tanto, es otro objeto de la presente invención proporcionar reactivos de fluido de dosificación que se puedan utilizar también como reactivos de aclarado. Los fluidos de dosificación de la presente invención son isotónicos, no hemolíticos y tienen una tensión superficial baja y capacidad detergente. Por lo tanto, los fluidos de dosificación de la presente invención son reactivos de aclarado superiores en comparación con los reactivos de aclarado utilizados de forma tradicional, ya que ayudan a prevenir la deposición de desechos celulares en el orificio y alrededor de este, lo que reducirá la necesidad de un reactivo aparte para aclarar el instrumento. De ese modo, se reducen los costes de operación, aumenta la exactitud y fiabilidad de los conteos celulares y aumenta el tiempo entre las operaciones habituales de mantenimiento y limpieza del instrumento. Las composiciones de la presente invención también se pueden congelar y descongelar sin pérdida de eficacia. De forma adicional, las composiciones de la presente invención producen menos de 1 ppm de formaldehído en el transcurso de un año.

Agentes quelantes

La composición de la presente invención contiene uno o más agentes quelantes como componentes. Un agente quelante es un compuesto que quela iones en membranas celulares y los debilita, haciendo que la célula sea más susceptible frente a los biocidas. Por lo tanto, el agente quelante facilita la eliminación de células y hongos por parte de los compuestos antimicrobianos presentes en la composición. El agente quelante también puede actuar junto con el tampón manteniendo el pH de la composición. Cuando la muestra celular es una muestra de sangre, el agente quelante también ayuda a mantener el efecto anticoagulación en la sangre reduciendo la agregación plaquetaria.

En una realización, el agente quelante puede ser ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), un derivado de EDTA, o combinaciones de los mismos. En una realización específica, el agente quelante es un derivado de EDTA. Los derivados de EDTA incluyen sales de EDTA, tales como EDTA disódico, EDTA tetrasódico, EDTA dipotásico, y ácido etilenglicol-bis-(3-aminoetileter) N-N'-tetraacético (EGTA). Por ejemplo, en una realización, el agente quelante es EDTA disódico. En otra realización, el agente quelante es EDTA dipotásico. En otra realización, el agente quelante es ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetileter)N,N,N',N'-tetraacético (EGTA).

En otra realización, a la composición de la presente invención se pueden añadir agentes quelantes adicionales distintos del EDTA o sus derivados. Dichos agentes quelantes adicionales incluyen compuestos que quelan iones como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, que son conocidos por los expertos en la técnica. Algunos de dichos agentes quelantes incluyen, sin limitación, ácido ciclohexanodiamino-tetraacético, ácido dietilentriaminopentaacético, y/o ácido hidroxietil-etilen-diaminotriacético.

La concentración de cada agente quelante en la composición es de aproximadamente 0,05 gramos por litro (g/l) a aproximadamente 6,0 g/l. En determinadas realizaciones, la concentración de cada agente quelante en la composición es de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 4 g/l. Preferiblemente, la concentración del agente quelante es de aproximadamente 2,7 g/l a aproximadamente 3,3 g/l.

Iones estabilizantes

La composición de la presente invención preferiblemente contiene uno o más iones estabilizantes como componentes. Los iones estabilizantes contribuyen a la isotonicidad, osmolalidad, y fuerza iónica de la composición, contribuyen a la conductividad de la solución, y ayudan a mantener el equilibrio electroquímico. Los iones estabilizantes también ayudan a solubilizar proteínas anormales en la muestra y a evitar que precipiten. Preferiblemente, los iones estabilizantes incluyen un anión sulfato. El anión sulfato puede ser proporcionado por una sal sulfato tal como una sal sulfato de metal alcalino. Sales sulfato de metal alcalino ilustrativas incluyen, aunque no de forma limitativa, sulfatos de sodio y de potasio. Preferiblemente, la sal sulfato de metal alcalino es sulfato de sodio. En una realización, el sulfato de metal alcalino se añade a la composición como solución acuosa. Preferiblemente, el ion estabilizante está presente en la composición a una concentración de aproximadamente 7 g/l a aproximadamente 21 g/l. Más preferiblemente, el ion estabilizante está presente en la composición a una concentración de aproximadamente 12 g/l a aproximadamente 16 g/l.

También se contempla que los iones estabilizantes puedan ser proporcionados por sales tales como el sulfato de amonio, el cloruro sódico, el acetato de magnesio, el sulfato de guanidinio, y sales neutras que contienen citrato, acetato y fosfato.

Sales ionizantes

La composición de la presente invención contiene una o más sales ionizantes como componente. La sal ionizante contribuye a la regulación de la osmolalidad y de la fuerza iónica de la composición por parte de la sal sulfato. Preferiblemente, la sal ionizante es un cloruro de metal alcalino. Los cloruros de metales alcalinos incluyen, aunque no de forma limitativa, cloruros de sodio y de potasio. Más preferiblemente, la sal ionizante es cloruro sódico. En una realización, la sal ionizante se añade a la composición como solución acuosa. La sal ionizante está presente a una concentración de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 5 g/l. Más preferiblemente, la sal ionizante está presente a una concentración de aproximadamente 0,5 g/l a aproximadamente 1,5 g/l.

Tampones

El pH deseado de la composición depende del instrumento de análisis celular utilizado y de la prueba que se realice. El pH de la composición es de entre aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5.

Generalmente, se añaden uno o más tampones a la composición a concentraciones suficientes para lograr el pH deseado. Esta concentración depende de la concentración de otros solutos que pueden contribuir a la acidez o basicidad global de la composición.

A modo de referencia, esta memoria descriptiva utilizará el término “tampón” o “un tampón”. Sin embargo, se entenderá que se pueden utilizar dos o más tampones como tampón para la presente invención. El tampón se añade a la composición en cantidad suficiente para ajustar el pH al intervalo preferido. El ajuste de la cantidad del tampón para proporcionar un pH adecuado es un método establecido. En determinadas realizaciones, el tampón comprende una base. Preferiblemente, la base es un hidróxido de metal alcalino. Más preferiblemente, el hidróxido de metal alcalino es hidróxido sódico o hidróxido potásico. Se pueden utilizar otras bases, siempre y cuando no interfieran en el análisis de la muestra celular. En otra realización, la base se añade como solución acuosa. En otra realización, la base se añade como solución acuosa al 50 %.

Tensioactivos

La composición de la presente invención puede contener de forma adicional un tensioactivo no hemolítico. El tensioactivo actúa disminuyendo la tensión superficial de la composición de modo que se forma un menisco entre la superficie del fluido de dosificación y la superficie interior del tubo de dosificación con un ángulo que activará los sensores de inicio y de finalización. El tensioactivo interfiere en la capacidad que tienen las moléculas de las sustancias de interaccionar entre sí y disminuye, por lo tanto, la tensión superficial de las sustancias. El tensioactivo confiere también capacidad detergente a la composición, proporcionándole la capacidad de retirar desechos celulares y proteínas que han precipitado sobre las superficies interiores del analizador celular automatizado y/o evita la deposición de desechos celulares y proteínas. Preferiblemente, el tensioactivo confiere propiedades de congelación/descongelación a la composición, lo que hace posible almacenarla congelada y posteriormente descongelarla para usar sin pérdidas de eficacia. El tensioactivo debería ser también estable en un ambiente de alto contenido en electrolitos y no precipitar en la solución. El tensioactivo debería también ser no hemolítico, de modo que pueda entrar en contacto con los eritrocitos y no producir su lisis, que daría lugar a desechos celulares y a la liberación de proteínas que podrían contaminar las superficies interiores del analizador celular y/o bloquear el orificio.

Tensioactivos no hemolíticos adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, nonilfenol polietoxilado (IGEPAL® CO-630, comercializado por GAF Corp., conocido también como 2-[2-(4-nonilfenoxi)etoxi]etanol, núm. CAS 9016-45-9), dodecilnonaetilenglicoléter (polidocanol o TWEEN® 20, CAS 1L 9002-92-0), monododeciléter etoxilado (THESIT®, comercializado por Sigma Aldrich Co., núm. CAS 9006-65-9), y dimetilsiloxano etoxilado (SILWET® 7600, comercializado por GE Silicones).

Los tensioactivos se utilizan a concentraciones de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 3,0 g/l. Preferiblemente, la concentración de tensioactivo o tensioactivos es de aproximadamente 0,5 g/l a aproximadamente 2,5 g/l. Con máxima preferencia, la concentración de tensioactivo o tensioactivos es de aproximadamente 0,9 g/l a aproximadamente 2,1 g/l.

Tensión superficial

Un parámetro crítico de las composiciones de la invención es la tensión superficial. Para formar un menisco con un ángulo que se pueda detectar mediante los sensores de inicio y de finalización, es necesario ajustar la tensión superficial de forma adecuada. Los componentes del fluido de dosificación, tales como las sales ionizantes, pueden contribuir a la tensión superficial global de la composición. La adición de un tensioactivo disminuirá la tensión superficial al afectar a las fuerzas de cohesión existentes entre las moléculas de la composición.

En determinadas realizaciones, la tensión superficial del fluido de dosificación de la presente invención es de entre aproximadamente 0,04 N/m (40 dinas/cm) y aproximadamente 0,066 N/m (66 dinas/cm). En determinadas realizaciones, la tensión superficial es de entre aproximadamente 0,047 N/m (47 dinas/cm) y aproximadamente 0,064 N/m (64 dinas/cm). En realizaciones preferidas, la tensión superficial es de entre aproximadamente 0,052 N/m (52 dinas/cm) y aproximadamente 0,062 N/m (62 dinas/cm). La concentración del tensioactivo se puede ajustar para lograr una tensión superficial que dé lugar a un menisco de un ángulo suficiente para su detección por parte de los sensores calibrados de un analizador celular automatizado que utilice dosificación volumétrica de líquidos. Aunque la presencia de solutos en la composición (tal como el sulfato de sodio ácido cloruro de sodio) tendrá un efecto en la tensión superficial, este es despreciable en comparación con el efecto del tensioactivo.

Sustancias antimicrobianas

Las composiciones para usar en analizadores celulares automatizados se pueden almacenar durante períodos de tiempo prolongados antes de su uso, y pueden exponerse a menudo a microorganismos durante el uso. Por lo tanto, la composición de la presente invención preferiblemente presenta eficacia antimicrobiana, puesto que la presencia de contaminación por microorganismos puede distorsionar el análisis de la muestra celular. Los agentes

antimicrobianos se deben utilizar para eliminar el crecimiento de microorganismos antes y durante el análisis. Sin embargo, los inventores han descubierto que los agentes antimicrobianos utilizados en las composiciones conocidas en la técnica contribuyen a la producción de niveles de formaldehído superiores a 1 ppm. Para su uso en la composición de la presente invención, los agentes antimicrobianos deberían tener las siguientes características: En asociación con otros componentes de la composición, estos reactivos deben producir cantidades bajas o no significativas (p. ej., preferiblemente, inferiores a 1 ppm) de formaldehído durante al menos un año. Los reactivos deberían proporcionar además una protección antimicrobiana adecuada y no interferir en la medición de la muestra celular en los diversos procedimientos analíticos. Preferiblemente, los agentes antimicrobianos no reaccionan con otros reactivos utilizados de forma habitual en muchos métodos de análisis celular.

La composición de la presente invención contiene por lo tanto de forma opcional uno o más agentes antimicrobianos eficaces en términos de eliminación de bacterias gram negativas, bacterias gram positivas, levadura, y hongos, y que sin embargo producen menos de 1 ppm de formaldehído en la composición en el transcurso de un año. Preferiblemente, los agentes antimicrobianos útiles en la composición de la invención incluyen diversas combinaciones de 1,2-benzisotiazolin-3-ona, 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-2-ona, 2-metil-4-isotiazolin-3-ona, y 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxano, hidrocloreto de ácido 4-butilaminobenzoico-2-(dimetilamin)etiléster, diazolidinilurea, 1,2-dibromo-2,4 dicianobutano, derivados de cada uno de estos compuestos, y combinaciones de los mismos. Dichos agentes antimicrobianos son comerciales.

Cuando se emplean combinados en la composición de fluido de dosificación de la presente invención, dichos compuestos antimicrobianos se pueden emplear en cualquier relación eficaz para combatir el crecimiento microbiano durante todo el período de validez de la composición, sin formar formaldehído y sin afectar además negativamente a la muestra celular o parámetro celular que se deba medir mediante el procedimiento analítico seleccionado.

Los agentes antimicrobianos se deben utilizar en la composición de la invención a concentraciones eficaces para combatir el crecimiento microbiano durante todo el período de validez de la composición. Las concentraciones eficaces de agentes antimicrobianos se pueden determinar fácilmente y variarán dependiendo de la selección de agentes antimicrobianos. En general, los agentes antimicrobianos se pueden utilizar en la composición de la invención a concentraciones de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 2,0 g/l. En otras realizaciones, los agentes antimicrobianos se pueden utilizar en la composición de la invención a concentraciones de aproximadamente 0,5 g/l a aproximadamente 1,5 g/l. En realizaciones preferidas, los agentes antimicrobianos se pueden utilizar en la composición de la invención a concentraciones de aproximadamente 0,5 g/l a aproximadamente 1,0 g/l.

Determinados agentes antimicrobianos, tales como el hidrocloreto del éster 2-(dimetilamino)etilico del ácido 4-butilaminobenzoico son eficaces a concentraciones menores que los descritos anteriormente en la presente memoria. Por lo tanto, en realizaciones preferidas, dichos agentes antimicrobianos se pueden utilizar en la composición de la invención a concentraciones de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 0,5 g/l. En otras realizaciones, dichos agentes antimicrobianos se pueden utilizar en la composición de la invención a concentraciones de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 0,1 g/l. En otras realizaciones, los agentes antimicrobianos se pueden utilizar en la composición de la invención a concentraciones de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 0,03 g/l.

Se prevé que otros agentes antimicrobianos podrán ser igualmente útiles en composiciones de la presente invención. La selección de dichos componentes antimicrobianos útiles siguiendo las enseñanzas contenidas en la presente memoria está comprendida en la presente invención. Se encuentran métodos de determinación de la idoneidad de un determinado agente antimicrobiano en la composición de la presente invención en la patente US-6.706.526.

Otros componentes

La composición de la presente invención puede contener además otros componentes, incluidos agentes conservantes, anticoagulantes, detergentes, tintes y tinturas. Ver, por ejemplo, las patentes US-5.935.857 y US-4.528.274. Sin embargo, los compuestos adicionales añadidos a la composición no deben aumentar la producción de formaldehído del reactivo. En la medida en que dichos otros componentes afecten negativamente a los parámetros físicos de las células a analizar, se pueden hacer otros ajustes de la formulación de la composición para contrarrestar dichos efectos.

Osmolalidad

Generalmente, el fluido de dosificación de la presente invención será iso-osmótico con respecto a la muestra celular, generalmente una muestra de sangre, de modo que los volúmenes de las células en la muestra celular no cambian. Normalmente, la osmolalidad de la sangre de un adulto es de aproximadamente 285 mOsm/kg a aproximadamente 295 mOsm/kg. La osmolalidad de la sangre anormal puede estar comprendida de aproximadamente 240 mOsm/kg a aproximadamente 340 mOsm/kg. Preferiblemente, la osmolalidad de la composición es de entre aproximadamente 240 mOsm/kg a aproximadamente 340 mOsm/kg. Más preferiblemente, la osmolalidad será de entre aproximadamente 260 mOsm/kg a aproximadamente 320 mOsm/kg. Con máxima preferencia, la osmolalidad será de aproximadamente 280 mOsm/kg a aproximadamente 290 mOsm/kg. Sin embargo, la osmolalidad de la composición puede variar cuando se utiliza con una muestra celular diferente de la sangre. El ajuste de la osmolalidad de la composición alterando la concentración de la sal ionizante y de la sal sulfato se realiza de forma habitual.

Métodos de uso de la composición de fluido de dosificación

Los analizadores celulares automatizados que utilizan dosificación volumétrica de líquidos comprenden un tubo de dosificación (generalmente un capilar de vidrio), un sensor de inicio, un sensor de finalización, y una cámara de vacío. Los analizadores celulares automatizados comprenden además fluido de dosificación y otros reactivos conectados mediante fluidos con el analizador celular. Por lo tanto, por ejemplo, se conectan mediante fluidos al analizador celular depósitos de fluidos o recipientes de reactivos fluidos, de los cuales al menos uno contiene el fluido de dosificación de la presente invención.

En al menos determinadas realizaciones, el fluido de dosificación de la presente invención se almacena en un recipiente esterilizado de gran volumen. Preferiblemente, dichos recipientes son recipientes de plástico (generalmente polietileno de baja densidad) de gran volumen. Generalmente, los recipientes utilizados para la presente invención contendrán al menos 1 litro y, más preferiblemente, 5 litros del fluido de dosificación. Los recipientes son preferiblemente esterilizados y contienen una junta de vacío para mantener la esterilidad durante el almacenamiento.

En una realización especialmente preferida, el recipiente es un cubo de 5 litros que comprende polietileno de baja densidad. El recipiente además comprende un tapón sellado de inducción con un recubrimiento de mylar, que forma una junta rompible durante el llenado del recipiente con fluido de dosificación de la presente invención.

Como se ha mencionado previamente, el recipiente que contiene el fluido de dosificación comprende un tapón. En determinadas realizaciones, el tapón tiene un diámetro de 38 mm. Se retira el tapón y el recubrimiento de mylar se retira o se perfora de modo que se puede conectar un conector macho asociado con el analizador celular automatizado con el recipiente. El conector macho además comprende, en una realización preferida, un tubo de recogida, que tiene suficiente longitud para ser ajustado sustancialmente en el recipiente y preferiblemente se apoya en el fondo del recipiente de fluido de dosificación o cerca del fondo.

Como se muestra en la Figura 1, el sensor de inicio y el sensor de finalización están situados en extremos opuestos del tubo de dosificación. El extremo del tubo de dosificación con el sensor de finalización está comunicado con la cámara de vacío. El extremo del tubo de dosificación con el sensor de inicio está comunicado con un bloque de abertura por el que se introduce el fluido de dosificación en el dispositivo. Para determinar de forma precisa el punto de inicio y de finalización en un intervalo de conteo, se aplica una presión negativa dentro de la cámara de vacío, forzando la salida del flujo de dosificación del bloque de abertura y a continuación a través del tubo de dosificación, pasando primero por el sensor de inicio y pasando a continuación por el sensor de finalización. Los sensores de inicio y de finalización se calibran para detectar el paso del menisco por la superficie de contacto aire/líquido/tubo de dosificación. En la publicación de patente estadounidense n.º 2007/0269882, concedida a Zhang y col., se describe un dispositivo volumétrico para líquidos ilustrativo.

Cuando la superficie del fluido de dosificación pasa por el sensor de inicio, la presencia del menisco del ángulo apropiado ocasiona un cambio en la intensidad lumínica que es detectado por el sensor, lo que genera una señal eléctrica que activa el inicio de un episodio de conteo. Cuando la superficie del líquido alcanza el sensor de finalización, el menisco del ángulo apropiado ocasiona de nuevo un cambio en la intensidad lumínica que es detectado por el sensor de finalización, lo que genera otra señal eléctrica que da lugar a la terminación del episodio de conteo.

Una superficie de contacto fluido de dosificación/tubo de dosificación/aire crea un menisco que puede ser detectado por los sensores en el analizador celular utilizado en cada caso. Generalmente, un fluido de dosificación que produce un menisco con un ángulo de entre aproximadamente 30° y aproximadamente 60° cuando fluye a través de un tubo de dosificación es suficiente para activar el sensor de inicio para comenzar el episodio de conteo y activar el sensor de finalización para detener el episodio de conteo. En una realización, un fluido de dosificación produce un menisco con un ángulo de entre aproximadamente 30° y aproximadamente 60° cuando fluye a través de un tubo de dosificación. En aspectos de esta realización, un fluido de dosificación produce un menisco con un ángulo de, p. ej., entre aproximadamente 30° y aproximadamente 50°, entre aproximadamente 30° y aproximadamente 40°, entre aproximadamente 40° y aproximadamente 60°, entre aproximadamente 50° y aproximadamente 60°, entre aproximadamente 40° y aproximadamente 50°, y entre aproximadamente 35° y aproximadamente 55°, cuando fluye a través de un tubo de dosificación.

La tensión superficial del fluido de dosificación, el diámetro interno del tubo de dosificación, así como el material de que está compuesto el tubo de dosificación determinan el ángulo del menisco. Por lo tanto, se puede utilizar cualquier combinación de tensión superficial del fluido de dosificación, diámetro interno del tubo de dosificación, y/o material del tubo de dosificación siempre y cuando el fluido de dosificación produzca un menisco con un ángulo de entre aproximadamente 30° y aproximadamente 60° a medida que fluye a través del tubo de dosificación. La composición de fluido de dosificación de la realización ilustrada está concebida para usar en un tubo de dosificación de vidrio de un diámetro interno de aproximadamente 2,7 mm. Sin embargo, se entiende que cambios del diámetro del tubo de dosificación, o incluso de la composición del propio tubo, pueden requerir un cambio en la composición de fluido de dosificación para lograr el ángulo de menisco deseado.

Por lo tanto, las composiciones de la presente invención son útiles en métodos de control del inicio y la finalización de un episodio de conteo de un analizador celular automatizado que utiliza dosificación volumétrica de líquidos. Este método comprende: proporcionar a un tubo de dosificación una composición de fluido de dosificación no hemolítica que comprende: un agente quelante, una sal ionizante, un tensioactivo no hemolítico y, de forma opcional, una sal sulfato y/o uno o más agentes antimicrobianos, en donde la composición es no hemolítica, tiene un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5, y en donde la tensión superficial de la composición es de entre aproximadamente 0,04 N/m (40 dinas/cm) y aproximadamente 0,066 N/m (66 dinas/cm); hacer fluir la composición de fluido de dosificación a través del tubo de dosificación; en donde el menisco del fluido de dosificación activa primero el sensor de inicio, comenzando el episodio de conteo, y activa a continuación el sensor de finalización, finalizando el episodio de conteo.

Además de su uso como materiales de dosificación en métodos de control del inicio y finalización de un episodio de conteo, las composiciones de la presente invención son útiles como reactivos de aclarado en métodos de retirada por lavado de células del orificio después de su conteo. Por lo tanto, los términos “fluido de dosificación” y “reactivo de aclarado” se utilizan en la presente memoria de forma intercambiable cuando se describen composiciones de la presente invención. Cuando se utilizan como reactivo de aclarado, los sensores de inicio y de finalización generalmente no se activan.

Como se ha indicado anteriormente en la presente memoria, los analizadores celulares a menudo se disponen de modo que la muestra celular suspendida en un diluyente está contenida en un baño de muestra en una cara del orificio. En la otra cara del orificio se encuentra un reactivo de aclarado que actúa retirando las células del orificio después de su conteo. El reactivo de aclarado está en comunicación de fluidos con el baño de muestra, por lo que se puede producir un flujo de retorno en donde parte del reactivo de aclarado pasa al baño de muestra. Conforme la muestra celular entra en el baño de muestra, el reactivo de aclarado residual puede entrar en contacto con la muestra celular. Por lo tanto, el reactivo de aclarado es no hemolítico. La lisis de células en la muestra celular puede hacer que los desechos celulares obstruyan el orificio, haciendo inutilizable el instrumento o dando lugar a conteos celulares erróneos. Los fluidos de dosificación de la presente invención son isotónicos y no hemolíticos y, por lo tanto, son adecuados para usar como reactivos de aclarado. Los tensioactivos no hemolíticos utilizados en los fluidos de dosificación de la presente invención también transmiten capacidad detergente, lo que contribuye a la deposición de desechos celulares en el orificio o alrededor de este. Por lo tanto, los fluidos de dosificación de la presente invención son útiles en métodos para evitar la deposición de desechos celulares sobre las superficies interiores de los analizadores celulares y en métodos para mejorar el rendimiento de los analizadores celulares.

Incluso cuando el diluyente y el reactivo de aclarado son no hemolíticos, la muestra celular a menudo contendrá proteínas y restos de células lisadas. Dichos materiales se pueden precipitar sobre la superficie de los componentes del instrumento que están en contacto con las mezclas de muestra durante los análisis. Además, dichos materiales pueden también formar complejos insolubles con sustancias químicas presentes en el diluyente, precipitando sobre la superficie de los componentes del instrumento. Sin una limpieza eficaz realizada de forma habitual se puede producir la acumulación de dichos precipitados, ocasionando una obstrucción parcial o completa de las aberturas o del tubo de dosificación, lo que puede hacer que el instrumento quede inutilizable. La composición de fluido de dosificación de la presente invención tiene capacidad detergente y se puede por lo tanto emplear como reactivo eficaz para la limpieza de desechos celulares de las superficies interiores de analizadores celulares automatizados. La composición se puede utilizar para retirar mediante aclarado desechos de las superficies interiores del dispositivo entre análisis de muestras celulares para desobstruir vías de fluido y retirar contaminación que puede alterar el conteo y análisis de células. La naturaleza multiusos de la composición de la presente invención reduce el número de reactivos utilizados en un analizador celular, simplifica su operación, reduce el coste que conlleva analizar muestra a muestra y reduce el coste de mantenimiento.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención como se define en las reivindicaciones anexas.

Ejemplo 1

En la Tabla 1 se ilustra una composición de fluido de dosificación multiusos según la presente invención.

TABLA 1	
Componente	Cantidad/l
EDTA disódico	2,7-3,3 g
sulfato de sodio	12-16 g
cloruro de sodio	0,5-1,5 g
nonilfenol polietoxilado	0,7-1,3 g
sustancias antimicrobianas	0,1-2,0 g

NaOH 50 %	0,6 g
Agua	c.s. hasta 1,0 l
pH final: 7,1-7,2; osmolalidad: 284 mOsm/kg	

Ejemplo 2

En la Tabla 2 se ilustra una composición de fluido de dosificación multiusos según la presente invención.

TABLA 2	
Componente	Cantidad/l
EDTA disódico	2,7-3,3 g
sulfato de sodio	12-16 g
cloruro de sodio	0,5-1,5 g
dodecil nonaetilen glicol éter	1,6-2,4 g
sustancias antimicrobianas	0,1-2,0 g
NaOH 50 %	0,65 g
Agua	c.s. hasta 1,0 l
pH final: 7,1-7,2; osmolalidad: 284 mOsm/kg	

Ejemplo 3

Se midieron las tensiones superficiales de varios reactivos comerciales utilizados en analizadores celulares automatizados (comercializados todos por Beckman Coulter, Inc., Brea, CA) y de un fluido de dosificación de la invención, como se describe en la Tabla 1 anterior, utilizando el método del ascenso capilar. Los resultados se indican a continuación en la Tabla 3:

TABLA 3	
Reactivo analizado Coulter®	Tensión superficial (N/m [dinas/cm])
Diluyente I	0,072 (72,4)
Diluyente II	0,07 (70,4)
Diluyente III	0,074 (74,4)
Reactivo lítico I	0,054 (54,7)
Composición de fluido de dosificación de la Tabla 1	0,057 (57,4)

Ejemplo 4

Para analizar la eficacia de una composición de la presente invención como fluido de dosificación, se analizaron muestras celulares de control (células de control celular COULTER® 4C-ES Cell Control, Beckman Coulter, Inc.) en el analizador celular Mindray BC3000 (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co.) utilizando la composición descrita en la Tabla 1 anterior como fluido de dosificación. El Mindray BC3 000 es un instrumento de hematología diferencial en 3 partes que utiliza dosificación volumétrica de líquidos.

Las células de control celular 4C-ES Cell Control son un producto de control de calidad preparado a partir de células de sangre humana estabilizadas, diseñado para confirmar y analizar la precisión de analizadores celulares automatizados. Se encuentran disponibles tres tipos diferentes de reactivos de control celular 4C-ES Cell Control: conteo celular de glóbulos blancos (WBC) anormalmente bajo, WBC normal (un conteo WBC normal está en el intervalo de $4,3-10,8 \times 10^3$ células/mm³), y WBC anormalmente alto. Para este análisis se utilizaron los tres tipos de células de control. Si el fluido de dosificación no actúa de forma adecuada el inicio y la finalización de un episodio de conteo, se puede producir un “descarte”. Los “descartes” se producen cuando el *software* analizador de células automatizado detecta una discrepancia entre todos los períodos de conteo o el conteo no satisface criterios internos y los datos se descartan. Cuando se produce un descarte, no se recogen datos para esa determinada aspiración de la muestra.

Se llevaron a cabo dos ciclos de análisis de muestra con cada muestra de células, generando un total de seis ciclos. Cada ciclo consistió en 20 aspiraciones de la muestra de células. Se registró el número de aspiraciones en cada ciclo que dio lugar a un descarte. A modo de comparación, se analizaron dos reactivos comerciales (Diluyentes I y H de la Tabla 3) como fluidos de dosificación utilizando el procedimiento arriba descrito. Se analizó cada uno de dichos reactivos en un ciclo de muestra y se registró el número de aspiraciones que dio lugar a un descarte. Los resultados se indican a continuación en la Tabla 4:

Tabla 4			
Fluido de dosificación	Muestra de células	Número de ciclo	Descartes/aspiraciones

Composición de la invención descrita en la Tabla 1	Anormalmente bajo	1	0/20
		2	0/20
	Normal	1	0/20
		2	0/20
	Anormalmente alto	1	0/20
		2	0/20
Diluyente II	Anormalmente bajo	1	2/3
Diluyente I	Normal	1	7/20

- 5 Los datos anteriores indican que la composición de la invención como se describe en la Tabla 1 es mejor que los diluyentes comerciales como fluido de dosificación. En 6 ciclos utilizando la composición de la invención como fluido de dosificación, no tuvo lugar un solo descarte. Como se puede ver en las tablas anteriores, los diluyentes comerciales dieron lugar a una alta frecuencia de fallo en la activación de los puntos de inicio y finalización del episodio de conteo, generando descartes. Por lo tanto, dichos reactivos se consideraron no adecuados para usar como fluido de dosificación. Estos resultados muestran que las tensiones superficiales de los diluyentes comerciales son demasiado altas y, por lo tanto, estos reactivos no crean meniscos con ángulos que los sensores de inicio y finalización puedan detectar.
- 10 Aunque el Reactivo Lítico tiene una tensión superficial que creará meniscos que los sensores de inicio y finalización pueden detectar, también lisará células, creando desechos celulares que pueden precipitar sobre las superficies internas del analizador celular y ocasionar una mala eficacia, por lo que no es adecuado para usar como fluido de dosificación. El Reactivo Lítico contiene una sal de amonio cuaternario como reactivo lítico y un cianuro de metal alcalino.
- 15 Aunque en la presente memoria se han descrito diversas realizaciones de la presente invención, debe entenderse que estas se han presentado a modo de ejemplo y no de limitación. Se entenderá que la fraseología o terminología utilizada en la presente memoria tiene fines descriptivos y no limitativos, por lo que el experto en la técnica deberá interpretar la terminología o fraseología de la presente memoria descriptiva a la luz de las enseñanzas y directrices.
- 20 La presente invención se define según las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para usar en un analizador celular automatizado que utiliza dosificación volumétrica de líquidos, comprendiendo la composición:
 - a) un agente quelante presente a una concentración de 0,05 g/l a 6,0 g/l,
 - b) una sal ionizante presente a una concentración de 0,1 g/l a 5 g/l, y
 - c) un tensioactivo no hemolítico presente a una concentración de 0,1 g/l a 3,0 g/l,en donde la composición es no hemolítica, tiene un pH de 6,5 a 7,5, y en donde:
 - i) la tensión superficial de la composición es de entre 0,04 N/m (40 dinas/cm) y 0,066 N/m (66 dinas/cm); o
 - ii) la composición produce un menisco con un ángulo de entre 30° y 60° cuando fluye a través de un tubo de dosificación; o
 - iii) la composición produce un menisco con un ángulo de entre 30° y 60° en un capilar de vidrio de borosilicato con un diámetro interno de 2,7 mm.
2. La composición según la reivindicación 1, en donde el agente quelante es ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), EDTA disódico, EDTA dipotásico, ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetileter)N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), o combinaciones de los mismos.
3. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la sal ionizante es un cloruro de metal alcalino.
4. La composición según la reivindicación 3, en donde el cloruro de metal alcalino es cloruro de sodio, cloruro de potasio, o combinaciones de los mismos.
5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además un ion estabilizante.
6. La composición según la reivindicación 5, en donde el ion estabilizante es proporcionado por un sulfato de metal alcalino.
7. La composición según la reivindicación 6, en donde el sulfato de metal alcalino es sulfato de sodio, sulfato de potasio, o combinaciones de los mismos.
8. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el tensioactivo no hemolítico es nonilfenol polietoxilado, polioxietileno 9 lauril éter, glicol éter etoxilado, monododecil éter etoxilado, dimetilsiloxano etoxilado, dodecil nonaetilen glicol éter, o combinaciones de los mismos.
9. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además uno o más agentes antimicrobianos.
10. La composición según la reivindicación 9, en donde el agente antimicrobiano es 1,2-benzisotiazolin-3-ona, 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona, 2-metil-4-isotiazolin-3-ona, hidrocloreto de éster 2-(dimetilamino)etilico del ácido 4-butilaminobenzoico, 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxano, 1,2 dibromo -2,4 dicianobutano, o combinaciones de los mismos.
11. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la tensión superficial de la composición es de entre 0,047 N/m (47 dinas/cm) y 0,064 N/m (64 dinas/cm).
12. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la tensión superficial de la composición es de entre 0,052 N/m (52 dinas/cm) y 0,062 N/m (62 dinas/cm).
13. Un método de control del inicio y la finalización de un episodio de conteo de un analizador celular automatizado que utiliza dosificación volumétrica de líquidos, comprendiendo el método:
 - a) proporcionar a un tubo de dosificación una composición de fluido de dosificación, la composición de fluido de dosificación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12; y
 - b) hacer fluir la composición de fluido de dosificación a través del tubo de dosificación; en donde el menisco del fluido de dosificación activa primero el sensor de inicio, comenzando el episodio de conteo, y activa a continuación el sensor de finalización, finalizando el episodio de conteo.

Figura 1

