

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 015**

51 Int. Cl.:

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/537 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2010 PCT/US2010/028683**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2011 WO11119163**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2010 E 10848598 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2561350**

54 Título: **Método y sistema para analizar una muestra de sangre**

30 Prioridad:

24.03.2010 US 730977

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

07.11.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GODEFROY, CHRISTOPHE, P.;
RILEY, JOHN, STEVEN y
VIDAL, PATRICIO, J.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 641 015 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

Método y sistema para analizar una muestra de sangre

5 **Antecedentes de la invención**

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere en general a los métodos y sistemas para analizar las muestras de sangre utilizando un analizador de partículas, y más concretamente, para determinar reticulocitos y células difíciles de acromizar.

Antecedentes

15 Cada año, millones de americanos se ven afectados por enfermedades de la sangre. Los ejemplos de patologías de la sangre incluyen diversas neoplasias hematológicas malignas, tales como leucemias y linfomas, hemoglobinopatías, que abarcan numerosas anemias de origen genético, tales como talasemia, enfermedad de Cooley, y anemia drepanocítica (enfermedad HbS), así como diversos trastornos de coagulación y hemorragias. Las anomalías sanguíneas pueden ser también una consecuencia secundaria asociada con otras dolencias, tales como VIH/SIDA, tumores malignos, y trastornos autoinmunitarios. La mayoría de estas dolencias tienen una morbilidad y mortalidad significativas y pueden producir normalmente dolor severo en el paciente afectado. El diagnóstico temprano de estos trastornos es crítico para que los pacientes que tengan la enfermedad puedan recibir el tratamiento y la gestión de la enfermedad adecuados.

25 La sangre es un fluido corporal especializado que suministra sustancias necesarias, tales como nutrientes y oxígeno, a las células del cuerpo y transporta productos residuales desde estas mismas células. La célula predominante en sangre es el eritrocito, es decir, los glóbulos rojos sanguíneos o glóbulos rojos. En un frotis de sangre periférica, los eritrocitos derivan su color rojizo de la proteína hemoglobina, y suelen tener un aspecto redondeado u ovalado, con una región central teñida de color pálido. Su morfología bicóncava aumenta el área superficial celular y facilita la difusión del oxígeno y el dióxido de carbono desde la célula. Un eritrocito típico tiene una duración de aproximadamente 120 días.

30 Los eritrocitos se desarrollan a partir de células precursoras nucleadas en la médula ósea. Los eritrocitos inmaduros, es decir, los reticulocitos, tienen orgánulos que contribuyen a aumentar el contenido de hemoglobina y la capacidad de transporte de gases. Los reticulocitos pueden reconocerse en frotis de sangre periférica cuando se usa una tinción especial para teñir su polirribosoma o su ácido ribonucleico (ARN). En condiciones típicas, los reticulocitos representan aproximadamente 1 %-2 % de los glóbulos rojos en una muestra. Sin embargo, en determinados periodos de necesidad física, el recuento de reticulocitos puede aumentar.

35 Se pueden utilizar análisis de sangre para determinar los estados fisiológicos y bioquímicos, tales como enfermedad, contenido de minerales, eficacia del fármaco, y funciones de los órganos. Para confirmar o ayudar a confirmar el diagnóstico de enfermedades tales como, por ejemplo, diversas formas de anemia o hemorragia interna aguda, la determinación de reticulocitos puede ser de importancia fundamental.

40 El análisis de reticulocitos automatizado se puede llevar a cabo utilizando un analizador de partículas tal como un citómetro de flujo o un analizador hematológico. Los analizadores de partículas ilustrativos incluyen el sistema UniCel® DxH 800 de Beckman Coulter y el XT-2000 de Sysmex Corporation. La preparación de una muestra de sangre para citometría de flujo o análisis hematológico implica generalmente tomar una muestra de sangre completa y llevar a cabo uno o ambas etapas de incubar la muestra de sangre con una tinción vital tal como New Methylene Blue (NMB) y diluir la muestra de sangre con un ácido hipotónico que aclara la hemoglobina. La tinción hace precipitar el ARN en el interior de los eritrocitos. La dilución con un ácido hipotónico aclara la hemoglobina, quedando el ARN teñido en el interior de las células. El proceso de eliminar hemoglobina se denomina comúnmente "creación de imágenes acrómicas". La muestra de sangre, o una parte de esta, se somete a continuación a análisis en una celda de flujo de un analizador de partículas. Normalmente, las células en un fluido envolvente atraviesan un punto en la celda de flujo, una por una, donde son examinadas por uno o más haces de luz. Se generan varias mediciones para cada célula que pasa. El examen de una única célula se denomina un evento celular. Las mediciones normalmente registradas por evento celular incluyen, dispersión de luz directa, pérdida de luz axial, y fluorescencia. Algunos analizadores de partículas recogen también una medición de la impedancia de la corriente continua (CC) que es una medida de cuántas impedancias ejerce una célula. La medición de la CC, que se obtiene a partir de la aplicación de la corriente máxima de tal manera que la membrana celular deje de estar permeada y no haya flujo de corriente a través de la célula, se denomina también como volumen Coulter o volumen.

65

Sumario de la invención

La presente solicitud se dirige al análisis de datos de un analizador de partículas. La presente invención se define en las reivindicaciones. En una realización, un método automatizado de enumerar células difíciles de acromizar, que se definen como células que retienen al menos 30 % de su contenido de hemoglobina original después del mezclado con un reactivo acromizante en una muestra de células sanguíneas que comprende: mezclar una muestra de células sanguíneas con un ácido nucleico de tinción y un reactivo acromizante para eliminar hemoglobina de los glóbulos rojos, generando de esta forma una muestra de células sanguíneas acrómicas; pasar la muestra de células sanguíneas acrómicas a través de una celda de flujo citométrico; analizar la muestra de células sanguíneas acrómicas en la celda de flujo citométrico utilizando las mediciones de dispersión de la luz y de la pérdida de luz axial, generando de esta forma datos del evento que comprenden una medición de la pérdida de luz axial y la medición de la dispersión de la luz para cada célula; diferenciar las células difíciles de acromizar en la muestra de células sanguíneas acrómicas de otras células usando el análisis de los datos del evento que comprenden una medición de la pérdida de luz axial y una medición de la dispersión de la luz para cada célula; y enumerar las células difíciles de acromizar.

Se describen en detalle a continuación características y ventajas adicionales de la presente invención, así como la estructura y el funcionamiento de diversas realizaciones de la misma, con referencia a los dibujos acompañantes. Se señala que la invención no se limita a las realizaciones específicas descritas en la presente memoria. Dichas realizaciones se presentan en la presente memoria solo a fines ilustrativos. Las realizaciones adicionales serán evidentes para las personas expertas en la(s) técnica(s) relevante(s) basándose en las enseñanzas contenidas en la presente memoria.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una vista de los datos de eventos procedentes del análisis de una muestra de sangre utilizando un citómetro de flujo, en dos dimensiones.

La Fig. 2 ilustra las etapas del análisis de reticulocitos inmaduros en una muestra de sangre según una realización de la presente invención.

La Fig. 3 muestra detalles adicionales de la etapa de preprocesamiento que se muestra en la Fig. 2, según una realización de la presente invención.

La Fig. 4 muestra detalles adicionales de la etapa de medición que se muestra en la Fig. 2, según una realización de la presente invención.

Las Figs. 5(A) y 5(B) son vistas bidimensionales de datos de eventos procedentes del análisis de una muestra de sangre. La Fig. 5(B) es una vista de los datos de eventos que se muestran en la Fig. 5(A) de la que se ha eliminado la población de células difíciles de acromizar.

La Fig. 6 muestra la misma población del evento que se muestra en la Fig. 5(A), pero utilizando la pérdida de luz axial (ALL) y UMALS en vez de los convencionales CC y UMALS.

Las Figs. 7 (A-C) muestran varias vistas bidimensionales que ilustran datos de eventos con diferente capacidad para identificar la población de células difíciles de acromizar.

La Fig. 8 muestra detalles adicionales de la etapa de medición que se muestra en la Fig. 2, según otra realización de la presente invención.

La Fig. 9 es un sistema para evaluar reticulocitos inmaduros según una realización de la presente invención.

La Fig. 10(A) muestra una vista tridimensional de datos de eventos procedentes del análisis de una muestra de sangre procedente de un individuo sano. En la vista, las células 1010 difíciles de acromizar, los glóbulos rojos 1020 maduros, y los reticulocitos 1030 se diferencian de forma distintiva.

La Fig. 10(B) muestra una vista tridimensional de datos de eventos procedentes de la muestra de sangre de un paciente al que se ha diagnosticado anemia drepanocítica. En la vista, las células 1010 difíciles de acromizar, los glóbulos rojos 1020 maduros, y los reticulocitos 1030 se diferencian de forma distintiva.

La Fig. 10(C) muestra una vista tridimensional de datos de eventos procedentes del análisis de una muestra de sangre de un paciente al que se ha diagnosticado talasemia. En la vista, las células 1010 difíciles de acromizar, los glóbulos rojos 1020 maduros, y los reticulocitos 1030 se diferencian de forma distintiva.

La Fig. 11 ilustra un % promedio de células “difíciles de acromizar” en muestras de sangre extraídas de individuos sanos.

La Fig. 12 ilustra un % promedio de células “difíciles de acromizar” en muestras de sangre extraídas de pacientes que padecen diversas enfermedades.

5 Las características y ventajas de la presente invención serán más evidentes a partir de la descripción detallada que se define a continuación cuando se toma junto con los dibujos. En los dibujos, números de referencia similares indican generalmente elementos idénticos, funcionalmente similares, y/o estructuralmente similares. Generalmente, el dibujo donde un primer elemento aparece en primer lugar se indica por el(los) dígito(s) más a la izquierda en el número de referencia correspondiente.

10

Descripción detallada

15 La presente invención se refiere al procesamiento de datos de análisis de partículas. Aunque la presente invención se describe en la presente memoria con referencia a realizaciones ilustrativas para aplicaciones concretas, debe entenderse que la invención no está limitada a lo anterior. Los expertos en la técnica con acceso a las enseñanzas de la presente memoria reconocerán modificaciones, aplicaciones, y realizaciones adicionales comprendidas en el alcance de la anterior y campos adicionales en los que la invención sería de significativa utilidad.

20 **Panorama general**

25 Como se describe en la sección de antecedentes anterior, la capacidad automatizada para determinar la distribución de glóbulos rojos en una muestra de sangre es una cualidad vital en varias aplicaciones. Los métodos y sistemas descritos en la presente memoria dan como resultado una medida automatizada mejorada de las poblaciones de células en una muestra de sangre. En una realización, las células difíciles de acromizar se diferencian y enumeran utilizando los métodos proporcionados en la presente memoria.

30 Los entornos ilustrativos en los que la presente invención puede llevarse a la práctica incluyen analizadores de partículas tales como el Sistema Beckman Coulter's UniCel® DxH 800. El Sistema Uni Cel® DxH 800, por ejemplo, utiliza la tecnología patentada Coulter de volumen, conductividad, y dispersión de luz (VCS) para evaluar las células centradas hidrodinámicamente dentro de una celda de flujo. La tecnología VCS utiliza tres fuentes de energía independientes que trabajan de forma concertada entre sí para la medición de células: una fuente de alimentación de corriente continua de baja frecuencia para medir el volumen; una fuente de alimentación de alta frecuencia para medir la conductividad, y una fuente de luz láser para medir la dispersión. La medición del volumen se lleva a cabo utilizando el principio Coulter de la impedancia eléctrica para medir físicamente el volumen que desplaza la célula completa en un diluyente isotónico. Este método dimensiona con precisión todos los tipos de células independientemente de su orientación en la trayectoria de la luz. La corriente alterna en el intervalo de radiofrecuencia (RF) cortocircuita la capa lipídica bipolar de la membrana de una célula, permitiendo que la energía penetre en la célula. Este potente método se utiliza para recoger información acerca del tamaño y la estructura interna de la célula, incluidos la composición química y el volumen nuclear. Un láser y detectores de dispersión de luz de ángulo múltiple proporcionan información acerca de la estructura interna, granularidad y morfología superficial de una célula. Además, los dispositivos VCS utilizan la medición de alta precisión mediante CC del volumen para obtener otras mediciones que se ajustan según el tamaño de la célula derivado de la conductividad y la dispersión. Debe señalarse, sin embargo, que las enseñanzas de esta descripción no se limitan a los dispositivos que utilizan la tecnología VCS.

50 La Fig. 1 muestra una gráfica de dispersión bidimensional de una muestra de sangre basada en datos de eventos generados a partir de mediciones de sangre con un analizador de partículas. Cada punto de datos que aparece en la gráfica de dispersión se basa en mediciones seleccionadas obtenidas de un evento celular, es decir, el examen de una célula individual mediante una corriente eléctrica y un haz láser en la celda de flujo. En la gráfica de dispersión se muestran poblaciones de datos de eventos para diferentes tipos de células que se encuentran normalmente en una muestra de sangre. En general, existe separación suficiente entre las poblaciones de glóbulos rojos en su conjunto (es decir, los eritrocitos 102 y los reticulocitos 104), plaquetas 108, y glóbulos blancos 106, que las técnicas conocidas permiten para clasificar la población de glóbulos rojos en su conjunto, por ejemplo, basándose en el área definida por las líneas 122 y 124. Clasificación se refiere al proceso de filtrar mediciones seleccionadas a partir de datos multiparamétricos, por ejemplo como se ha descrito anteriormente, separando los glóbulos rojos (eritrocitos y reticulocitos), las plaquetas y los glóbulos blancos, analizando las mediciones generadas para cada evento celular comparados con valores umbral conocidos. Por ejemplo, la línea 124 puede ser un valor umbral del volumen y la línea 122 puede ser un valor umbral de dispersión de luz, donde los eventos celulares con mediciones de volumen por encima de la línea 124 y un valor de dispersión de luz (utilizado a menudo en la forma de un log de la dispersión de luz) inferior a la línea 122 corresponden tanto a eritrocitos como a reticulocitos. En los sistemas existentes, la población de reticulocitos puede clasificarse también, por ejemplo, por una línea tal como la línea 130. Los eventos a la derecha de la línea 130 son reticulocitos, mientras que los eventos a la izquierda de la línea 130 son glóbulos rojos maduros.

65

Análisis de reticulocitos

En un aspecto, se presentan métodos para analizar reticulocitos en una muestra de sangre. La Fig. 2 es un diagrama de flujo de las etapas para evaluar reticulocitos según una realización de la presente invención. En la etapa 202, una muestra de sangre se prepara para análisis en un analizador de partículas. La preparación puede incluir la acromatización de la muestra de sangre y/o la tinción de la muestra con un tinte o tinte adecuado. La Fig. 3 ilustra la etapa de preparación 202 con más detalle, según una realización. En la etapa 302, la muestra de sangre se puede combinar con una tinción vital para delinear adicionalmente los reticulocitos. Por ejemplo, se puede usar un tinte sin fluorocromos que precipita el ácido ribonucleico intracelular (ARN) del reticulocito. Los ejemplos de tinciones adecuadas incluyen, aunque no de forma limitativa, New Methylene Blue (conocido como Reactivo A del Coulter Retie Pak™), Oxazine 750, y Brilliant Cresyl Blue. El ARN, que ha precipitado, tendrá mayor densidad, lo que potenciará la delimitación del contenido de ARN en cada célula. El uso de un tinte no fluorescente para medir los reticulocitos tiene la ventaja añadida de permitir analizar adicionalmente la muestra de sangre para determinar otros componentes utilizando, si se desea, un tinte fluorescente. Los ejemplos de tintes fluorescentes adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, naranja de tiazol y polimetina. Son posibles etapas preparatorias adicionales en diversas realizaciones de la presente invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones se puede combinar un tinte fluorescente con la muestra de sangre para medir propiedades adicionales de la muestra utilizando una medida de fluorescencia.

Para efectuar además el examen de la composición de una muestra de sangre, la muestra de sangre puede combinarse con un reactivo tal como, por ejemplo, una solución acromizante de reticulocitos que tiene tiocianato de potasio y ácido sulfúrico (etapa 304). Este tipo de reactivo acromizante puede obtenerse como un producto comercial conocido como Reactivo B del Coulter Retie Pak™. Se pueden utilizar otros reactivos acromizantes conocidos por los expertos en la técnica. El proceso de acromización libera la hemoglobina de los glóbulos rojos dando como resultado una célula acromica. El término "célula acromica", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un glóbulo rojo del que se ha eliminado más de 70 % de su contenido de hemoglobina. Preferiblemente, se ha eliminado más de 90 % e incluso de forma más preferida se ha eliminado más de 95 % de la hemoglobina. En otras palabras, la célula detectada retiene menos de 30 % de su hemoglobina original. La reducción del contenido de hemoglobina potencia la definición del retículo para permitir la determinación de los reticulocitos mediante citometría de flujo. Más específicamente, la reducción en el contenido de hemoglobina de los glóbulos rojos permite diferenciar entre reticulocitos y RBC maduros cuando se miden mediante un método no fluorescente que comprende dispersión de luz y CC.

Además de facilitar la liberación de la hemoglobina, el proceso de acromatización también puede esferar los glóbulos rojos, proporcionando a las células una forma más regular, y permitiendo de este modo mediciones de dispersión de luz más previsibles. Los reticulocitos nativos tienen una forma irregular que produce información de dispersión de luz imprevisible cuando se somete a un haz de luz. La esferación del glóbulo rojo proporciona también información reproducible de la dispersión de la luz que constituye la base para determinar los reticulocitos en la muestra. En algunas realizaciones, sería ventajoso combinar la muestra de sangre con un agente de esferación. El agente de esferación se usa en una cantidad eficaz para convertir los eritrocitos reticulados y los glóbulos rojos en esferas isovolumétricas para eliminar artefactos de orientación durante el análisis de los reticulocitos. En algunas realizaciones, el reactivo de esferación es un tensioactivo de ion híbrido que esfera isovolumétricamente los glóbulos rojos. Los ejemplos de agentes de esferación adecuados en la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, lauroamidopropilbetaína, cocoamidopropilbetaína y cocoamidossulfobetaína.

Se había descubierto anteriormente que el proceso de acromización se ve afectado por la temperatura. Las temperaturas por debajo de 12,8 °C (55 °F) parecen retardar el proceso de acromización y son necesarios periodos de tiempo más largos para permitir que se produzca el proceso de acromización. En algunas realizaciones, la muestra de sangre se mezclará con la solución acromizante a una temperatura de al menos 12,8° (55°) durante aproximadamente 30 segundos. En una realización, la acromización de la muestra de sangre se llevará a cabo a 41 °C (106 °F).

En algunas realizaciones, el pH de la solución acromizante no debe ser mayor de 3,0. En una realización, el pH de la solución acromizante es aproximadamente de 1,0 a 2,0. Además, parece que la solución acromizante ácida solubiliza la hemoglobina y facilita su eliminación del glóbulo rojo. Se ha indicado que, cuando se utiliza tiocianato potásico, el ácido sulfúrico es el ácido preferido que se va a utilizar en la combinación. La concentración preferida de tiocianato potásico es aproximadamente de 1,0 a 6,0 gramos por litro, y de ácido sulfúrico es aproximadamente de 0,7 a 3,0 gramos por litros.

La presión osmótica de la solución acromizante debe controlarse para que se produzca un hinchamiento rápido, pero controlado, del glóbulo rojo. La presión osmótica de la solución acromizante debe ser al menos de aproximadamente 75 miliosmoles. La presión osmótica hace que el glóbulo rojo se hinche y libere la hemoglobina en un lapso de tiempo de treinta (30) segundos desde su mezcla con la solución acromizante. Si la presión osmótica es inferior a aproximadamente 75 miliosmoles, entonces el glóbulo rojo no retendrá

una membrana celular intacta y se lisará. Más específicamente, una presión osmótica menor da como resultado glóbulos rojos que están dañados, de tal manera que la enumeración de reticulocitos no es fiable. Si la presión osmótica no es suficiente, los glóbulos rojos retendrán la hemoglobina, lo que obstaculizará la diferenciación de los reticulocitos. En algunas realizaciones, la presión osmótica de la solución acromizante variará de aproximadamente 75 a aproximadamente 110 miliosmoles. En otras realizaciones, la presión osmótica de la solución acromizante estará en el intervalo de aproximadamente 82 a aproximadamente 105 miliosmoles.

Volviendo a la Fig. 2 en la etapa 204, la muestra de sangre se analiza utilizando un analizador de partículas. En una realización, el analizador de partículas es un analizador hematológico. Por ejemplo, la muestra de sangre, o una parte de esta, se introduce en el analizador de partículas. Bajo presión hidrodinámica, la muestra de sangre fluye, célula a célula, a través de una celda de flujo. Dentro de la celda de flujo se miden varios parámetros de las células individuales. Por ejemplo, los analizadores de partículas que utilizan la tecnología VCS pueden llevar a cabo el dimensionamiento volumétrico de una célula, la conductividad de una célula, y la dispersión de la luz, simultáneamente para cada célula. La Fig. 4 es un diagrama de flujo de la etapa 204 con mayor detalle, según una realización de la presente invención.

En la etapa 402, la muestra de sangre preparada en la etapa 202 se introduce en una celda de flujo para el análisis. En la etapa 404, en una realización, la muestra se examina mediante la energía procedente de tres fuentes independientes a medida que fluye, célula a célula a través de un punto de examen en la celda de flujo. En la etapa 406, la medición de la dispersión de luz se registra para cada evento celular. A medida que el contenido de ARN disminuye con la madurez del reticulocito, puede esperarse que disminuya la medición de la dispersión de la luz. Pueden estar disponibles varias mediciones de dispersión de luz, por ejemplo, y sin limitación, incluyen las mediciones de dispersión de luz directa. La dispersión directa mide la luz que pasa a través de la célula que se examina y que se desvía desde el eje del haz de luz. Los ejemplos de dispersión de luz directa incluyen, aunque no de forma limitativa, dispersión de la luz de ángulo medio inferior (LMALS), dispersión de la luz de ángulo medio superior (UMALS), y dispersión de la luz de ángulo bajo (LALS). La LMALS se refiere a la luz dispersada en un ángulo de 9°-19° desde el eje del haz, UMALS se refiere a la luz dispersada en un ángulo de 20°-43° desde el eje del haz, y LALS se refiere a la luz dispersada en un ángulo de aproximadamente 5,1° desde el eje del haz. Otra medición de la dispersión de luz, la dispersión de luz de ángulo lateral (SALS), puede medir la luz dispersada en un ángulo de 90°. En algunas realizaciones, los análisis de muestras de sangre incluirán una medición de la pérdida de luz axial (ALL). ALL es la cantidad de luz perdida en un ángulo de aproximadamente 0° a 0,5° con respecto al eje del haz.

En la etapa 408 se recoge otra medición que es indicativa de la madurez de los reticulocitos. Por ejemplo, en una realización de la presente invención, se puede medir el tamaño de la célula. Se sabe que el tamaño de la célula disminuye con la madurez del reticulocito, en general, a medida que disminuye el contenido de ARN. Como ejemplo, el tamaño de la célula, o el volumen de la célula, puede medirse utilizando la medición de CC. La amplitud del pico del pulso de CC es función del volumen de la célula. En esta etapa se pueden usar otras mediciones indicativas de la madurez del reticulocito, que incluye medios directos o indirectos para medir el volumen de la célula. Por ejemplo, la medición de la fluorescencia indica la cantidad de ARN en la célula, o se pueden utilizar otros modos para medir el volumen de la célula. Como otro ejemplo, se puede utilizar también la dispersión directa para indicar el tamaño de la célula.

Volviendo a la Fig. 2, en la etapa 206 se identificó una población de reticulocitos a partir de la población completa de eventos de células. Las gráficas de dispersión de datos de eventos, utilizando varios ejes, ayudan a identificar los modelos de distribución de células sanguíneas. Como ejemplo, se pueden visualizar los datos de eventos en una gráfica de dispersión, tal como, por ejemplo, la Fig. 1 donde la dispersión de la luz está en el eje x y el volumen (CC) está en el eje y. Como se ha indicado anteriormente con respecto a la Fig. 1, la población 104 de reticulocitos puede identificarse por separado de los eritrocitos 102, las plaquetas 108 y los glóbulos blancos 106. La precisión de la población de reticulocitos es especialmente dependiente de cuan definitivamente se puede determinar la línea 130 que separa los reticulocitos de los glóbulos rojos. Por ejemplo, en una realización, aunque la línea 130 puede superponerse sobre la gráfica 100 de dispersión basándose en el umbral de dispersión de luz y los valores de medición del volumen derivados empíricamente de colecciones de mediciones anteriores, la línea 130 puede fracasar en separar correctamente los eritrocitos 102 de los reticulocitos (104), especialmente con respecto a los eventos de células que se encuentran muy cerca de la línea 130 en la gráfica 100 de dispersión.

Volviendo de nuevo ahora a la Fig. 2, en la etapa 207 se pueden notificar una o más medidas de reticulocitos. En una realización, la fracción de reticulocitos se notifica como la relación de un número predeterminado de regiones definidas sobre la función de cartografía de la población completa de glóbulos rojos. En otra realización, los reticulocitos se pueden notificar como un porcentaje o número absoluto. La generación de informes implica la salida de una o más mediciones en una pantalla u otro dispositivo de salida tal como un archivo informático.

Detección de las células difíciles de acromizar

En un aspecto, el método de la presente invención permite la exactitud de la detección de reticulocitos que se informa que ha mejorado teniendo unos datos de las muestras más exactos basándose en los cuales calcular la información de los reticulocitos. Se ha observado, en algunas muestras de sangre, que tras el proceso de acromización inicial, quedan células que bien no se han acromizado o que solamente se han acromizado parcialmente, es decir, células “difíciles de acromizar”. Para los fines de la presente invención, el término “célula difícil de acromizar” se referirá a una célula que ha retenido al menos 30 % de su contenido de hemoglobina original. En otras palabras, en una célula difícil de acromizar se ha eliminado menos de 70 % de su hemoglobina original. Preferiblemente, se mantiene más de 50 % e incluso de forma más preferida se mantiene más de 70 % del contenido de hemoglobina original. Se pretende que el proceso de acromización, por ejemplo, combinando una solución ácida hipotónica con la muestra de sangre, aclare la hemoglobina de las células. Sin acromización, o con una acromización poco eficaz (es decir, cuando las células pierden menos de 30 % de su contenido de hemoglobina), es posible que los eritrocitos no se diferencien claramente de los reticulocitos. Otra visión de la diferencia entre las células acrómicas en comparación con las células difíciles de acromizar puede observarse en la Fig. 6, que muestra que la población 610 de las células difíciles de acromizar se coloca en la parte superior de la gráfica de dispersión de la pérdida de luz axial frente a UMALS. Cuando las células difíciles de acromizar están presentes en la muestra de sangre, y la muestra de sangre se analiza utilizando dispersión de luz y CC, la diferenciación entre reticulocitos y glóbulos rojos maduros puede fracasar porque la población de células difíciles de acromizar es densa y se coloca generalmente dentro de la región de los reticulocitos. Algunas realizaciones de la presente invención implican detectar las células difíciles de acromizar en la población total de células sanguíneas.

Las Figs. 5(A) y 5(B) muestran el contraste presentado en las gráficas de dispersión para los datos del mismo evento con y sin eventos de células difíciles de acromizar, utilizando la dispersión de luz convencional o la dispersión de luz de ángulo medio superior (UMALS), y el eje de CC. En la Fig. 5(A), la gráfica de dispersión incluye eventos de células difíciles de acromizar. La frontera 510 muestra la localización de una población de eventos de células difíciles de acromizar. La Fig. 5(B) muestra la misma población de eventos una vez que se han eliminado los eventos de células difíciles de acromizar, incluida la población definida por la frontera 510. En ambas Figs. 5(A) y 5(b), los eventos por debajo de la frontera 530 corresponden a plaquetas y los eventos a la derecha de la frontera 520 corresponden a glóbulos blancos. Como se puede observar por la localización de la frontera 510, la población de eventos de células difíciles de acromizar abarca la separación entre la población de glóbulos rojos maduros y la población de reticulocitos, dificultando de esta forma distinguir claramente entre glóbulos rojos maduros y reticulocitos. En contraste, cuando se elimina la población de eventos de células difíciles de acromizar, como se muestra en la Fig. 5(B), se puede definir una frontera clara 511 entre los glóbulos rojos maduros y los reticulocitos. Una comparación visual de las Figs. 5(A) y 5(B) ilustra la dificultad de identificar y separar los glóbulos rojos maduros de los reticulocitos cuando están presentes las células difíciles de acromizar.

En esta realización, la medición de la pérdida de luz axial permite discriminar la población difícil de acromizar del resto de la muestra. Los inventores de la presente invención han descubierto de forma inesperada que la misma población de eventos que no puede identificar la población difícil de acromizar basándose en la medición de la dispersión de la luz utilizada convencionalmente puede ahora distinguir la población utilizando una medición de la pérdida de luz axial. Por ejemplo, la Fig. 6 muestra la misma población del evento que se muestra en la Fig. 5(A), pero utilizando la pérdida de luz axial (ALL) y UMALS en vez de los convencionales CC y UMALS. Utilizando ALL, los eventos de células difíciles de acromizar pueden identificarse claramente, como se muestra por la superficie comprendida por la frontera 610.

Las Figs. 7(A-C) ilustran la eliminación del evento de células difíciles de acromizar de otra muestra de sangre utilizando ALL en una realización de la presente invención. La gráfica 710 de dispersión muestra los UMALS y la CC generalmente utilizados. En la gráfica 710 de dispersión, están presentes las células difíciles de acromizar (como se muestran en la frontera 711) pero no se pueden distinguir con claridad de otros glóbulos rojos. Sin embargo, cuando se muestran los mismos datos en la gráfica 720 de dispersión, que tiene la pérdida de luz axial (ALL) y UMALS como eje, la capacidad de detectar las células difíciles de acromizar mejora en gran medida. Basándose en ALL, la población 721 difícil de acromizar es claramente discernible de las otras poblaciones de eventos.

En una realización de la presente invención, los eventos de células que corresponden a la población difícil de acromizar pueden eliminarse mediante filtración, y los eventos de células restantes pueden presentarse en una gráfica de dispersión, por ejemplo, tal como 730, utilizando el eje UMALS y el eje CC. La filtración de los eventos que corresponden a la población de células difíciles de acromizar puede llevarse a cabo clasificando la población difícil de acromizar bien de forma automática, por ejemplo, los valores umbral de ALL y UMALS determinados empíricamente, o bien mediante la asistencia de un operario manual. Una comparación visual de las gráficas de dispersión 730 y 710 ilustra la distinción más clara entre la población de glóbulos rojos maduros a la izquierda de la frontera 731 y la población de reticulocitos a la derecha de la frontera 731.

Como se muestra en la Fig. 6 (específicamente el área comprendida dentro de la frontera 610) y las Figs. 7(A-C) (específicamente el área comprendida dentro de la frontera 721) cuando se utiliza ALL, las células difíciles de acromizar pueden identificarse como una población distinta de otras poblaciones tales como glóbulos rojos maduros, reticulocitos, plaquetas y glóbulos blancos. Las células difíciles de acromizar presentan generalmente un ALL mayor que los otros tipos de células sanguíneas excepto los glóbulos blancos. Los glóbulos blancos pueden distinguirse debido a sus elevadas mediciones de dispersión de luz con respecto a otros tipos de células sanguíneas. El ALL elevado de la población de células difíciles de acromizar puede atribuirse a la absorción de luz relativamente elevada de la hemoglobina. A una longitud de onda láser de 488 nm (la longitud de onda utilizada en el analizador que produjo los resultados que se muestran en las Figs. 5(A), 5(B), 6 y 7(A-C)), la hemoglobina presenta una absorción óptica muy alta que conduce a un nivel elevado de ALL. En general, la hemoglobina muestra una mayor absorción de luz cuando la luz tiene una longitud de onda entre 400-500 nm.

La detección de las células difíciles de acromizar en una muestra de sangre que se está analizando puede llevarse a cabo mediante la realización de la presente invención que se muestra en la Fig. 8. En la Fig. 8, la etapa 202 de la Fig. 2 se disecciona adicionalmente para incluir etapas para detectar las células difíciles de acromizar. En la etapa 802, una muestra de sangre preparada; es decir, una muestra que se ha acromizado y teñido, puede introducirse en una celda de flujo para el análisis. En la etapa 804, se examina la muestra, célula a célula, utilizando mediciones que incluyen un haz de luz como se explica con respecto a la Fig. 2 anterior. En la etapa 806 se recoge la medición de ALL, junto con una o más mediciones de la dispersión de la luz en la etapa 810. Pueden encontrarse descripciones de la medición de la dispersión de la luz anteriormente con respecto a la Fig. 2.

En una realización, una vez que se detectan las células difíciles de acromizar, estos datos de eventos pueden utilizarse para analizar con más precisión los reticulocitos. Por ejemplo, la población de células difíciles de acromizar puede eliminarse mediante filtración utilizando los valores de ALL de los eventos de reticulocitos, como en la etapa 812. En esta realización, los datos de eventos estarán disponibles para un análisis adicional para determinar la información de los reticulocitos o cualquier otra información sobre glóbulos rojos, como en la etapa 814. En general, la eliminación de la población de eventos de las células difíciles de acromizar aumentaría la exactitud de la mayoría de parámetros notificados que se refieren a glóbulos rojos y/o reticulocitos. El cálculo y la notificación de la información de los reticulocitos se ha descrito anteriormente con respecto a la Fig. 2.

Enumeración de las células difíciles de acromizar

Un aspecto de la presente invención se refiere a la enumeración de las células difíciles de acromizar en la muestra de sangre. Los inventores de la presente invención han descubierto de forma inesperada que existe una correlación entre la población de células difíciles de acromizar en una muestra de sangre y una patología de la sangre. Específicamente, se ha descubierto que el número de células difíciles de acromizar está aumentado en las muestras de sangre analizadas recogidas de pacientes que padecen diversas enfermedades, cuyos ejemplos incluyen, aunque no de forma limitativa, enfermedades tales como hemoglobinopatía (p. ej., anemia drepanocítica y talasemia), neoplasias hematológicas (p. ej., leucemias y linfomas), trastornos de coagulación y hemorragias, así como VIH/SIDA, tumores malignos, y trastornos autoinmunitarios. Además, puede obtenerse información adicional acerca de estas enfermedades cuando se compara la posición de las células difíciles de acromizar en el diagrama de dispersión con las muestras normales. Volviendo a la Fig. 8, tras la detección pueden enumerarse las células difíciles de acromizar, como en la etapa 813. El recuento o la enumeración de células es una técnica bien establecida para poblaciones de células bien definidas, tales como las células difíciles de acromizar actualmente definidas. En una realización, la fracción difícil de acromizar se notifica como la relación de células difíciles de acromizar respecto a la población completa de glóbulos rojos. En otra realización, las células difíciles de acromizar se pueden notificar como un porcentaje o número absoluto. Dicho valor se puede utilizar como un parámetro solo de uso para investigación (RUO), o puede desarrollarse para obtener un parámetro de diagnóstico *in vitro* (IVD). Las Figs. 10 (A-C) ilustran la diferencia en el tamaño de poblaciones 1010 de células difíciles de acromizar derivadas de individuos sanos (Fig. 10(A)) y de pacientes que padecen de anemia drepanocítica (Fig. 10(B)) y talasemia (Fig. 10(C)). Como se ilustra en las Figs. 10(A) y 11 el % de células difíciles de acromizar en una población de RBC total es poco importante; es decir, inferior a aproximadamente 0,01 % en muestras de sangre donadas por individuos sanos. Se ha determinado también que las muestras de sangre de pacientes que padecen numerosas patologías determinadas contienen una población aumentada de células difíciles de acromizar (ilustrada en la Fig. 12). Dichas patologías incluyen insuficiencia renal, cáncer de hígado, VIH, anemia drepanocítica, y talasemia. El % de células difíciles de acromizar de una población de RBC total en una muestra de sangre de un paciente con una determinada patología diagnosticada está aumentado en al menos diez veces el tamaño de una población de células difíciles de acromizar de un individuo sano. En algunas muestras de sangre, la población de células difíciles de acromizar de un paciente que padece una enfermedad o trastorno es al menos 100 veces mayor que la de un individuo sano. El descubrimiento de esta tendencia por los inventores de la presente invención puede ser útil para determinar la existencia

de una población anómala de células difíciles de acromizar, que puede estar relacionada además con la presencia de determinadas patologías.

5 Se pueden emplear métodos alternativos para enumerar las células difíciles de acromizar. Más concretamente, un experto en la técnica puede analizar una muestra de sangre detectando la muestra y midiendo la hemoglobina célula a célula de la muestra de sangre utilizando la medición de la dispersión de la luz como saben los expertos en la técnica. Aquellas células que tienen al menos 30 % de la hemoglobina original se consideran células difíciles de acromizar. En otras palabras, las células difíciles de acromizar tendrán mayor dispersión de la luz que las células acrómicas en el diagrama de dispersión. En este método alternativo, un experto en la técnica podría emplear también un tinte fluorescente para diferenciar los reticulocitos de las células difíciles de acromizar.

15 El técnico experto entenderá que los entornos en los que la presente invención se puede llevar a la práctica, tales como los citómetros de flujo y los analizadores hematológicos, pueden programarse para notificar un valor numérico para la población de células difíciles de acromizar. Este valor numérico puede estar correlacionado con un estado bioquímico y/o fisiológico de un individuo. Por ejemplo, se puede ajustar un valor umbral para el % de células difíciles de acromizar de los glóbulos rojos totales en una muestra de sangre que corresponde al número de células difícil de acromizar presente en un individuo sano. Cuando el número de células difíciles de acromizar en una muestra de sangre de un paciente supera dicho valor umbral, se puede sospechar la presencia de una patología, y la muestra de sangre se puede señalar, garantizando una evaluación diagnóstica adicional del paciente. Un médico que evalúa el resultado del recuento de la sangre determinará el ensayo adicional adecuado basándose en los síntomas del paciente, el estado de salud general, la enfermedad o trastorno, el género, y la edad. En una realización, se puede señalar una muestra de sangre para evaluación adicional si el % de células difíciles de acromizar en una muestra de sangre excede el valor umbral en al menos 10 veces. En otra realización, se puede señalar una muestra de sangre para evaluación adicional si el % de células difíciles de acromizar en una muestra de sangre excede el valor umbral en al menos 100 veces.

30 Sistema para determinar la información de células sanguíneas

La Fig. 9 muestra un sistema para analizar muestras de sangre según una realización de la presente invención. Un analizador 910 de partículas se acopla utilizando el vínculo 940 a un ordenador 901. El ordenador 901 se acopla opcionalmente utilizando el vínculo 950 a una pantalla 920, y/o un dispositivo 921 de almacenamiento externo. El ordenador 901 puede incluir un procesador 902, una memoria 903, un almacenamiento interno 904, un módulo 905 de entrada, un módulo 906 de salida, y un módulo 907 de reticulocitos. El módulo 907 de reticulocitos puede incluir un módulo detector 961, un módulo analizador 963, un módulo diferenciador 965, y un módulo indicador 967.

40 El analizador 910 de partículas puede incluir un analizador hematológico, un citómetro de flujo, o dispositivo similar que sea capaz de examinar una muestra de sangre con el uso de un haz de luz. Se preparó una muestra de sangre como entrada a un analizador 910 de partículas para el análisis. Los datos de eventos generados por el analizador 910 de partículas se comunican a un ordenador 901, sobre el vínculo 940. El vínculo 940 puede ser una conexión interna al dispositivo tal como un bus que interconecta un componente periférico (PCI), o una conexión de red. Los eventos generados por el análisis de muestras de sangre en el analizador 910 de partículas pueden comunicarse al ordenador 901 en tiempo real o en modo discontinuo.

50 Los datos de eventos, posteriores a cualquier procesamiento en el ordenador 901, se presentan a continuación a un usuario sobre la pantalla 920, o se almacenan en un dispositivo 921 de almacenamiento externo. Por ejemplo, las gráficas de dispersión generadas por el procesamiento en el ordenador 901 pueden presentarse al usuario utilizando la pantalla 920. Los datos de eventos procesados pueden almacenarse también para el análisis y presentación posteriores. El dispositivo 921 de almacenamiento externo puede incluir un disco duro, u otro tipo de almacenamiento portátil.

55 El procesador 902 puede ejecutar instrucciones que permiten el procesamiento de los módulos 905, 906 y 907. La memoria interna 903 proporciona la memoria temporal requerida para dicho procesamiento, y el almacenamiento interno 904 puede proporcionar el almacenamiento de datos temporal o intermedio y los resultados asociados con dicho procesamiento. El almacenamiento interno 904 puede almacenar también el control lógico basado en las instrucciones y/o el código de módulos del programa incluidos los módulos del componente del módulo 907 de reticulocitos en las formas que incluyen un código de programa informático legible.

65 El módulo 905 de entrada recibe los datos de eventos generados por el analizador 910 de partículas. El módulo 905 de entrada puede incluir cualquier procesamiento que se requiera para transformar los datos de eventos de entrada del analizador 910 de partículas a un formato comprensible por el módulo 907 de reticulocitos. El módulo 906 de salida recoge los datos de eventos procesados por el módulo 907 de reticulocitos, lleva a cabo cualquier conversión necesaria, y sale a cualquier pantalla 920 o

almacenamiento 920 utilizando el vínculo 950. El vínculo 950 puede ser una conexión interna al dispositivo tal como PCI, o una conexión de red. La pantalla 920 puede ser un dispositivo de pantalla que está personalizado para la visión de los datos de un analizador de partículas, una pantalla genérica, o cualesquiera otros medios capaces de emitir resultados del análisis de partículas.

5

El módulo detector 961 puede incluir instrucciones para determinar las mediciones o parámetros de los eventos de células que pertenecen a la dispersión lateral incluidos UMALS, dispersión directa, pérdida de luz axial, y CC. Señalar que cada realización de la presente invención puede no tener acceso a todas las mediciones anteriores. Puede existir alguna configuración requerida en el analizador 910 de partículas que permita la recogida de todas las mediciones anteriores.

10

El módulo analizador 963 incluye instrucciones para identificar la población de reticulocitos y/o la población de células difíciles de acromizar, y el aislamiento de esta población de otros tipos de células sanguíneas. En otra realización, el módulo analizador 963 puede incluir instrucciones para eliminar mediante filtración los eventos de células que corresponden a células difíciles de acromizar, como se ha explicado anteriormente. En otra realización más, el módulo analizador 963 puede incluir instrucciones para enumerar la población de células difíciles de acromizar.

15

El módulo diferenciador 965 puede incluir instrucciones que hacen que el ordenador determine la información de los reticulocitos inmaduros de la muestra que se está analizando. Por ejemplo, la población de eventos de reticulocitos identificada utilizando el módulo 963 puede ahora investigarse utilizando la medición de la dispersión de la luz así como una segunda medición de la madurez de los reticulocitos tal como el volumen, para diferenciar los reticulocitos maduros de los inmaduros.

20

El módulo indicador 967 incluye instrucciones que permiten al ordenador 901 presentar gráficas de dispersión a la pantalla 920 y notificar también cuantificaciones útiles de los reticulocitos en la muestra de sangre. La fracción de reticulocitos o el porcentaje de reticulocitos son algunas cuantificaciones que se pueden notificar mediante el módulo indicador 967. El módulo indicador 967 puede incluir también instrucciones para notificar la información acerca de las poblaciones de células difíciles de acromizar.

25

30

En esta descripción se describen métodos que pueden aumentar la exactitud del análisis de muestras de sangre mediante medidas tales como la fracción de reticulocitos y de células difíciles de acromizar. Los métodos descritos dan como resultado mejoras sustanciales sobre los métodos actuales y pueden conducir a mejoras significativas en la detección y el tratamiento de numerosas patologías de la sangre. Las personas expertas en la técnica entenderán que las técnicas descritas en la presente memoria pueden ser aplicables para tipos de células diferentes de los eritrocitos que se describen en la presente memoria.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1.Un método para detectar células difíciles de acromizar, que se definen como células que retienen al menos 30 % de su contenido de hemoglobina original tras la mezcla con un reactivo acromizante, en una muestra de sangre que comprende:
- (a) mezclar la muestra de sangre con un reactivo acromizante para eliminar hemoglobina de los glóbulos rojos, generando de esta forma una muestra de sangre acrómica;
- 10 (b) evaluar la muestra de sangre acrómica en una celda de flujo citométrico mediante una detección que comprende una medición de la pérdida de luz axial y una medición de la dispersión de luz, generando de esta forma datos de eventos que comprenden una pérdida de luz axial y una medición de la dispersión de la luz para cada célula; e
- (c) identificar las células difíciles de acromizar utilizando los datos de eventos que comprenden una medición de la pérdida de luz axial y una medición de la dispersión de la luz para cada célula.
- 15 2.El método de la reivindicación 1, en donde la identificación de las células difíciles de acromizar utilizando la medición de la pérdida de luz axial comprende comparar la medición de la pérdida de luz axial frente a un primer umbral y una medición de la dispersión de la luz frente a un segundo umbral, en donde las células difíciles de acromizar se identifican por tener una medición de la pérdida de luz axial superior a la del primer umbral y una medición de la dispersión de la luz inferior a la del segundo umbral.
- 20 3.El método de la reivindicación 1, en donde la medición de la dispersión de luz comprende o se selecciona de la dispersión de luz de ángulo medio superior (UMALS), la dispersión de luz de ángulo medio inferior (LMALS), y la dispersión de luz de ángulo bajo (LALS).
- 25 4.El método de la reivindicación 1, que además comprende recoger mediciones de impedancia de la corriente continua.
- 30 5.El método de la reivindicación 1 utilizado para enumerar células difíciles de acromizar en una muestra de sangre y que además comprende:
- (d) enumerar la población de células difíciles de acromizar utilizando datos de eventos que comprenden una medición de la pérdida de luz axial y una medición de la dispersión de la luz para cada célula; y
- 35 (e) notificar la población de células difíciles de acromizar en la muestra de sangre.
- 40 6.El método de la reivindicación 5, en donde la notificación de la población de células difíciles de acromizar incluye notificar una relación de la población de células difíciles de acromizar respecto a los glóbulos rojos totales o notificar un % de células difíciles de acromizar de población de glóbulos rojos totales.
- 45 7.El método de la reivindicación 1 utilizado para detectar una población anómala de células difíciles de acromizar en una muestra del paciente, que comprende:
- (a) mezclar la muestra de sangre de un paciente con un reactivo acromizante para eliminar hemoglobina de los glóbulos rojos, generando de esta forma una muestra de sangre acrómica;
- 50 (b) evaluar la muestra de sangre acrómica en una celda de flujo citométrico mediante una detección que comprende una medición de la pérdida de luz axial y una medición de la dispersión de luz, generando de esta forma datos de eventos que comprenden una pérdida de luz axial y una medición de la dispersión de la luz para cada célula;
- (c) identificar las células difíciles de acromizar utilizando la medición de la pérdida de luz axial y una medición de la dispersión de la luz de los datos de eventos;
- (d) enumerar la población de células difíciles de acromizar utilizando la medición de la pérdida de luz axial y una medición de la dispersión de la luz; y
- (e) determinar la existencia de una población anómala de células difíciles de acromizar cuando el número de células difíciles de acromizar excede un valor umbral.
- 55 8.El método de la reivindicación 7, en donde la población anómala de células difíciles de acromizar se asocia con una hemoglobinopatía, opcionalmente en donde la hemoglobinopatía comprende anemia drepanocítica o talasemia.
- 60 9.El método de la reivindicación 1 utilizado para analizar una muestra de sangre, que comprende:
- (a) mezclar la muestra de sangre con un reactivo acromizante para eliminar hemoglobina de los glóbulos rojos, generando de esta forma una muestra de sangre acrómica;
- 65 (b) medir la muestra de sangre acrómica en una celda de flujo citométrico mediante una detección que comprende una medición de la pérdida de luz axial y una medición de la dispersión de luz para generar datos de eventos que comprenden una medición de la pérdida de luz axial y una medición de la dispersión de la luz para cada célula;

(c) identificar una población de células difíciles de acromizar utilizando datos de eventos, basándose en dicha medición de la pérdida de luz axial y una medición de la dispersión de la luz;
 (d) eliminar mediante filtración la población de células difíciles de acromizar de dichos datos de eventos; y
 (e) analizar los datos de eventos sin la población de células difíciles de acromizar para identificar los modelos de distribución de las células sanguíneas.

10.Un medio informático legible que almacena instrucciones en donde dichas instrucciones cuando se ejecutan dan lugar al menos a un procesador para analizar una muestra de sangre utilizando un método que comprende:

(a) generar datos de eventos que comprenden una medición de la pérdida de luz axial y una medición de la dispersión de luz para cada célula basándose en una detección que comprende una medición de la pérdida de luz axial y una medición de la dispersión de la luz de una muestra de sangre acromica en una celda de flujo citométrico; e

(b) identificar una población de células difíciles de acromizar que se definen como células que retienen al menos 30 % de su contenido de hemoglobina original tras la mezcla con un reactivo acromizante, utilizando los datos de eventos, basándose en dicha medición de la pérdida de luz axial y una medición de dispersión de la luz.

11.El medio informático legible de la reivindicación 10, en donde el método además comprende:

(c) eliminar mediante filtración la población de células difíciles de acromizar de dichos datos de eventos; y
 (d) analizar los datos de eventos sin la población de células difíciles de acromizar para identificar los modelos de distribución de las células sanguíneas; o en donde el método además comprende:

(c) enumerar la población de células difíciles de acromizar utilizando la medición de la pérdida de luz axial y una medición de la dispersión de la luz;

y

(d) determinar la existencia de una población anómala de células difíciles de acromizar cuando el número de células difíciles de acromizar excede un valor umbral; o en donde el método además comprende:

(c) enumerar la población de células difíciles de acromizar utilizando la medición de la pérdida de luz axial y una medición de la dispersión de la luz;

y

(c) notificar la población de células difíciles de acromizar en la muestra de sangre.

12.Un sistema para analizar una muestra de sangre, que comprende:
 al menos un procesador;

un analizador de partículas acoplado con el al menos un procesador y que comprende una celda de flujo citométrico;

un módulo detector acoplado al al menos un procesador y configurado para generar datos de eventos que comprenden una medición de la pérdida de luz axial y una medición de la dispersión de luz para cada célula basándose en una detección que comprende una medición de la pérdida de luz axial y una medición de la dispersión de la luz de una muestra de sangre acromica en una celda de flujo; y

un módulo analizador acoplado al al menos un procesador y configurado para identificar una población de células difíciles de acromizar que se define como células que retienen al menos 30 % de su contenido de hemoglobina original tras la mezcla con un reactivo acromizante utilizando los datos de eventos, basándose en dicha medición de la pérdida de luz axial y una medición de dispersión de la luz.

13.El sistema de la reivindicación 12, en donde el módulo analizador se configura además para enumerar la población de células difíciles de acromizar utilizando la medición de la pérdida de luz axial y una medición de la dispersión de luz; o en donde el módulo analizador se configura además para:

eliminar mediante filtración la población de células difíciles de acromizar de dichos datos de eventos; y
 analizar los datos de eventos sin la población de células difíciles de acromizar para identificar los modelos de distribución de las células sanguíneas.

14.Un método automatizado de enumerar células difíciles de acromizar que se definen como células que retienen al menos 30 % de su contenido de hemoglobina original tras la mezcla con un reactivo acromizante, en una muestra de células sanguíneas que comprende:

(a) mezclar la muestra de células sanguíneas con un ácido nucleico de tinción y un reactivo acromizante para eliminar hemoglobina de los glóbulos rojos en la muestra de células sanguíneas, generando de esta forma una muestra de células sanguíneas acromicas;

(b) pasar la muestra de células sanguíneas acromicas a través de una celda de flujo citométrico;

(c) analizar la muestra de células sanguíneas acromicas en la celda de flujo citométrico utilizando las mediciones de dispersión de la luz y de la pérdida de luz axial generando de esta forma datos del evento que comprenden una medición de la pérdida de luz axial y la medición de la dispersión de la luz para cada célula

ES 2 641 015 T3

(d) diferenciar las células difíciles de acromizar en la muestra de células sanguíneas acrómicas de otras células usando el análisis de los datos del evento que comprenden una medición de la pérdida de luz axial y una medición de la dispersión de la luz para cada célula; y
(e) enumerar las células difíciles de acromizar.

5

15.El método de la reivindicación 14, en donde la mezcla de la muestra de sangre con el tinte de tinción del ácido nucleico y el reactivo acromizante se lleva a cabo por separado; o en donde la tinción es fluorescente o no fluorescente, o además comprende determinar una existencia de una población anómala de células difíciles de acromizar comparando el número de células difíciles de acromizar en la

10

muestra de células sanguíneas a un valor umbral y notificar el número de células difíciles de acromizar que excede el valor umbral.

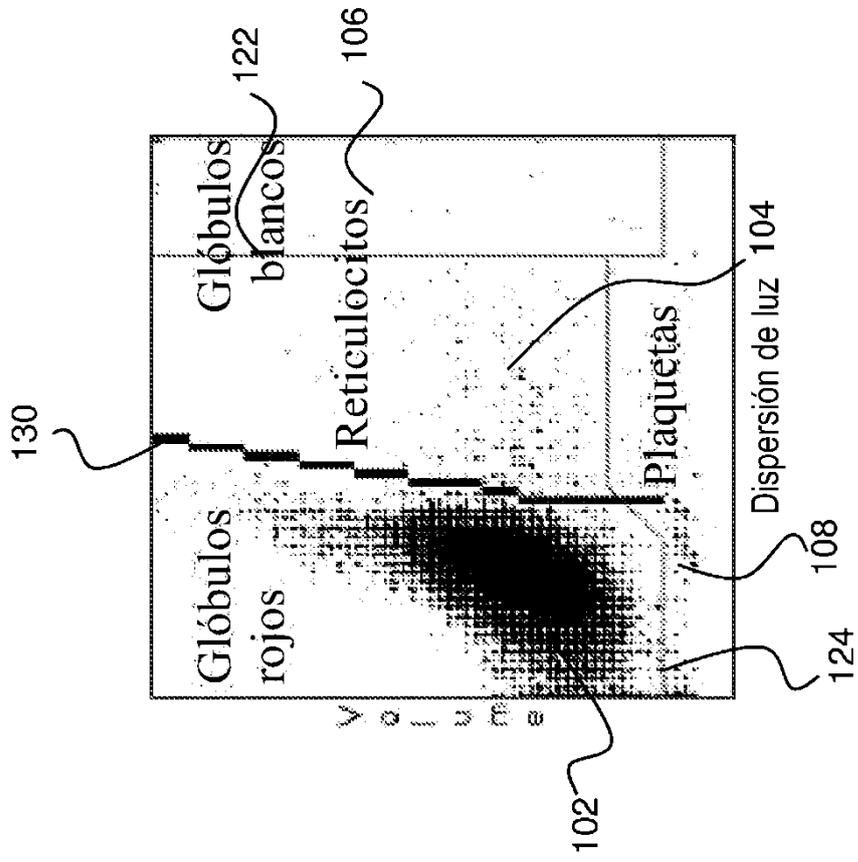


FIG. 1

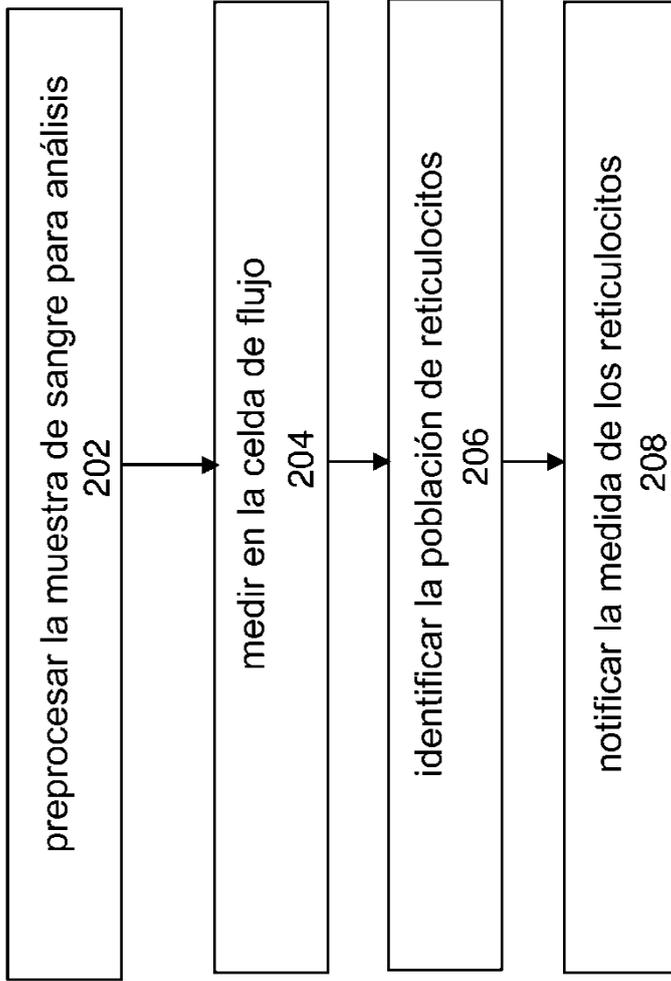


FIG. 2

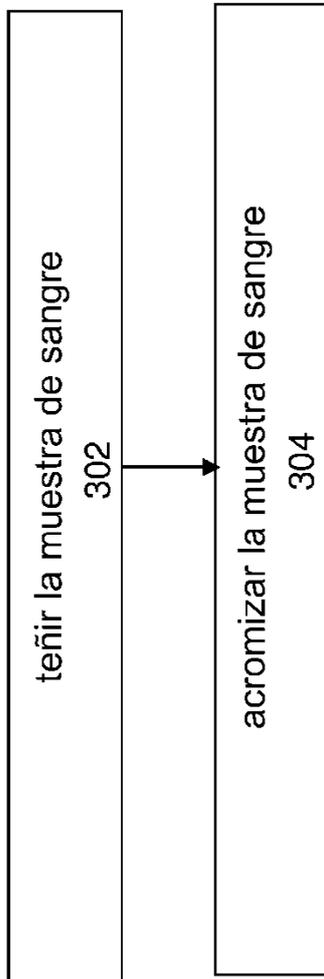


FIG. 3

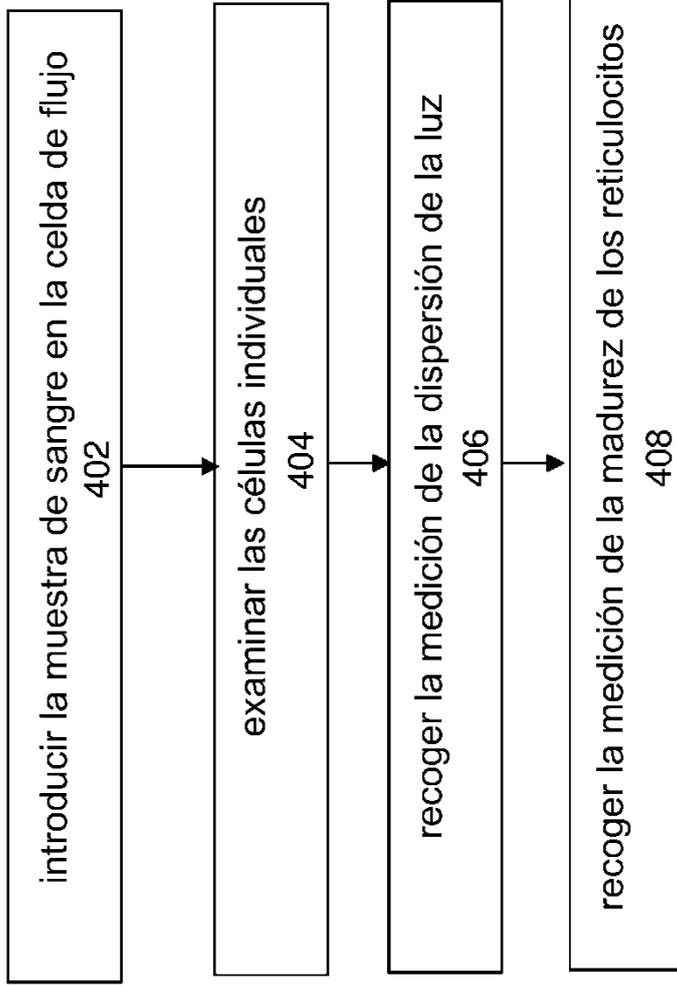


FIG. 4

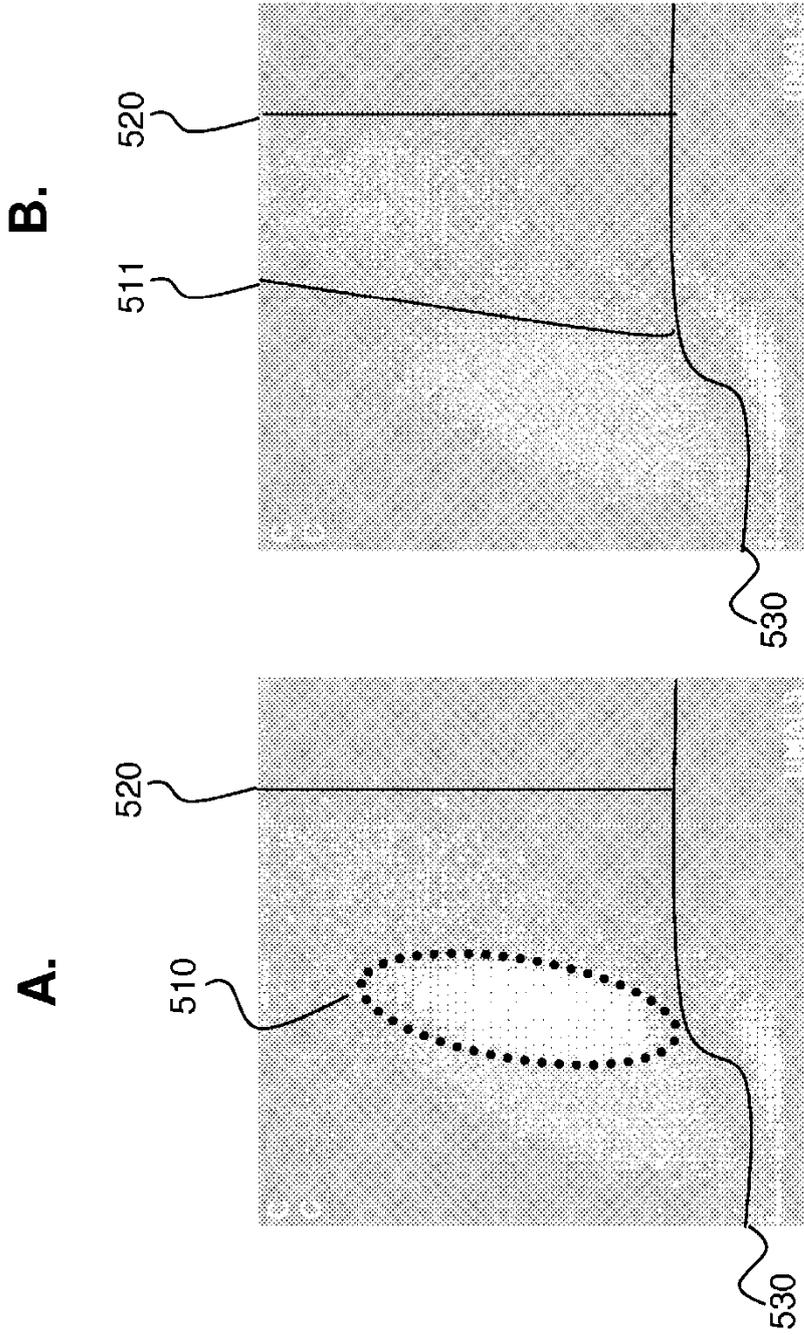


FIG. 5

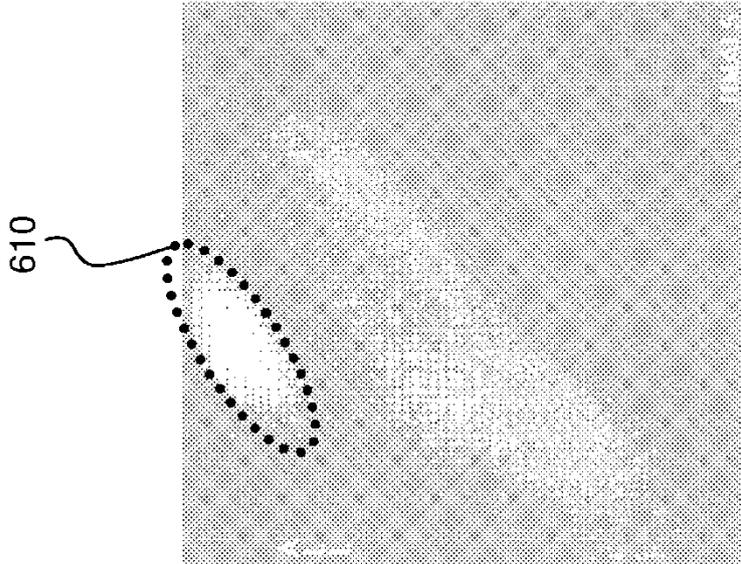


FIG. 6

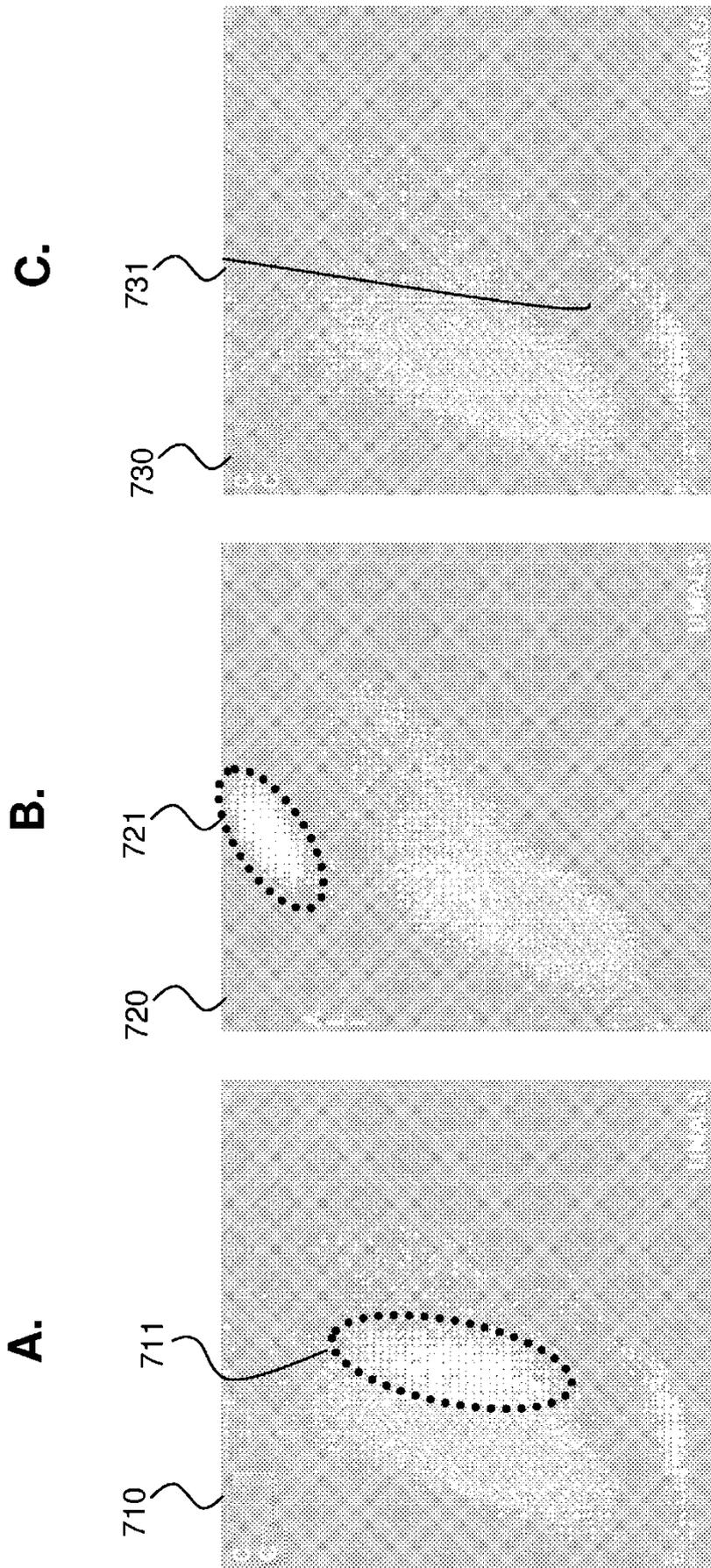


FIG. 7

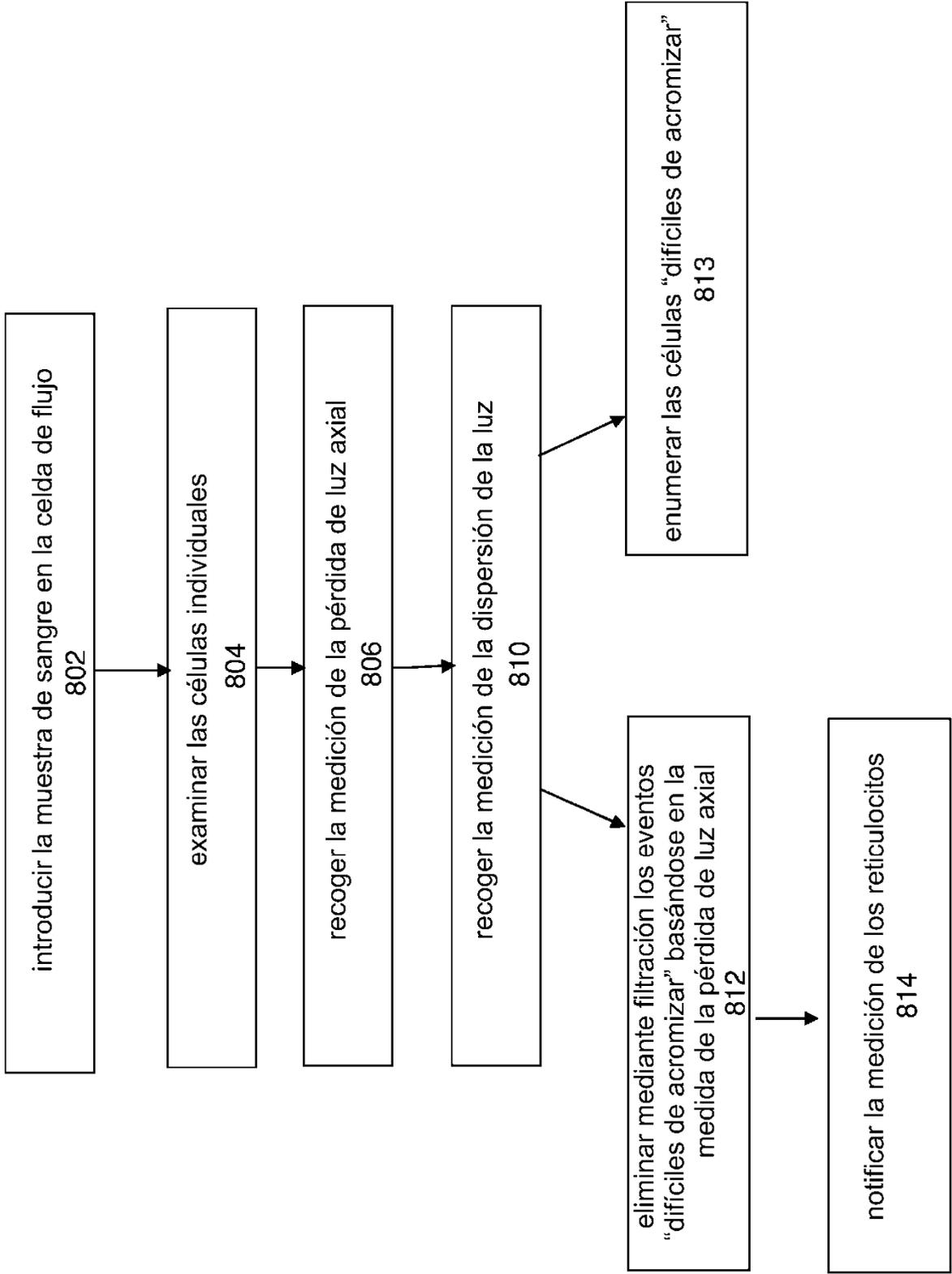


FIG. 8

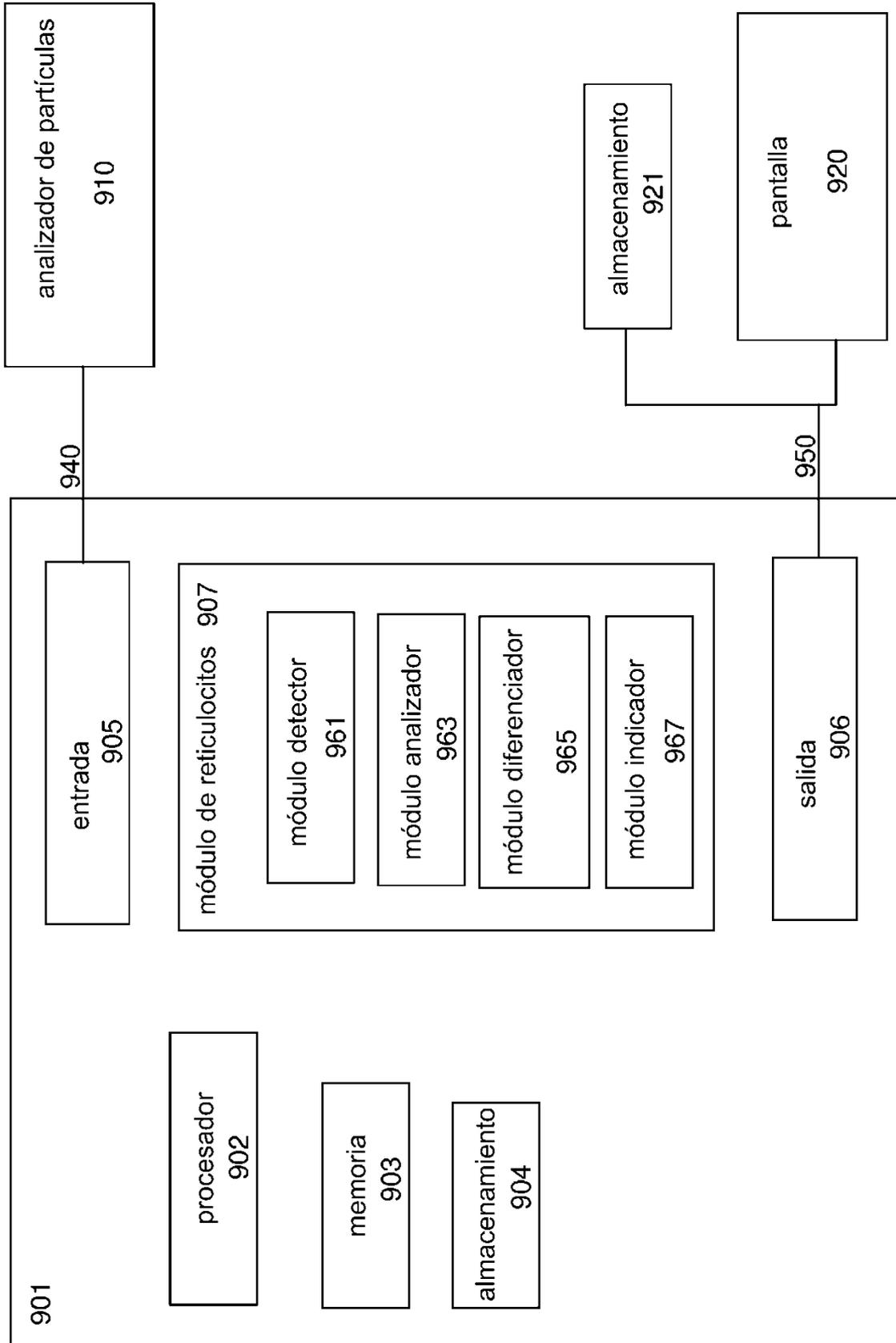


FIG. 9

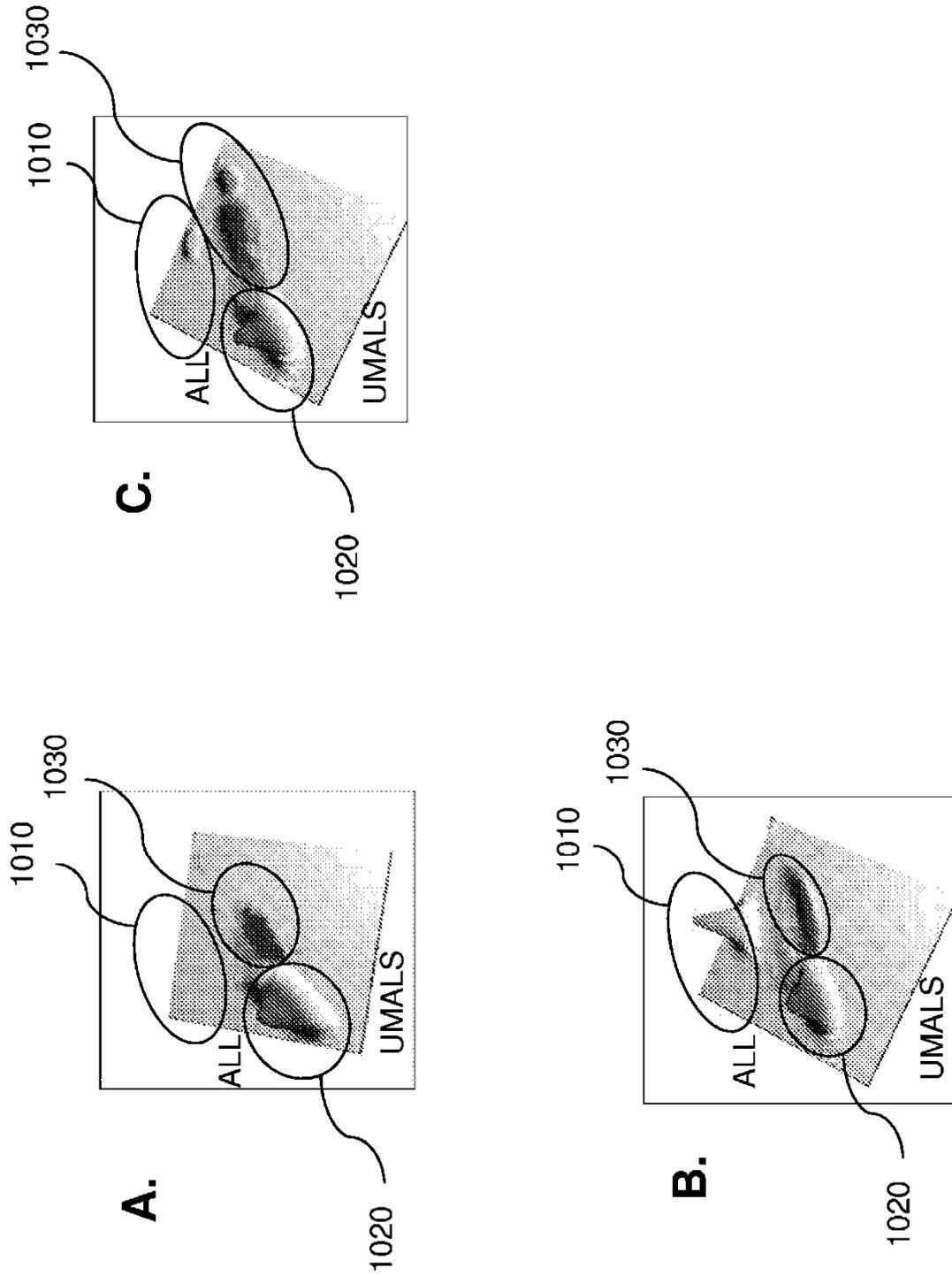


FIG. 10

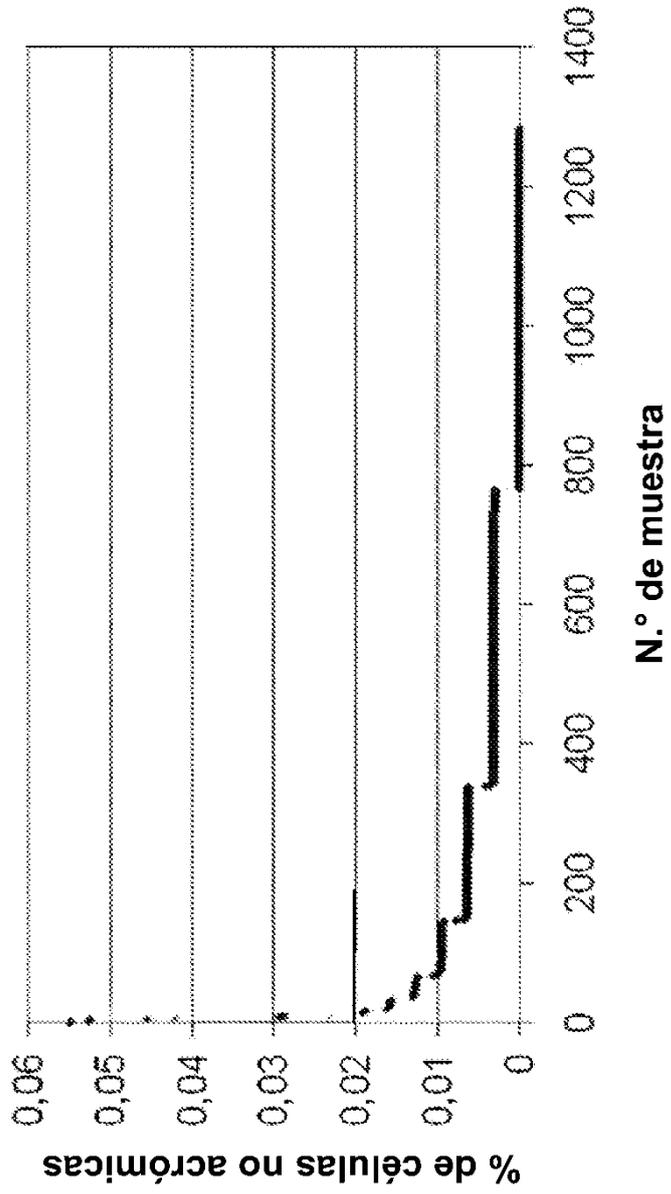
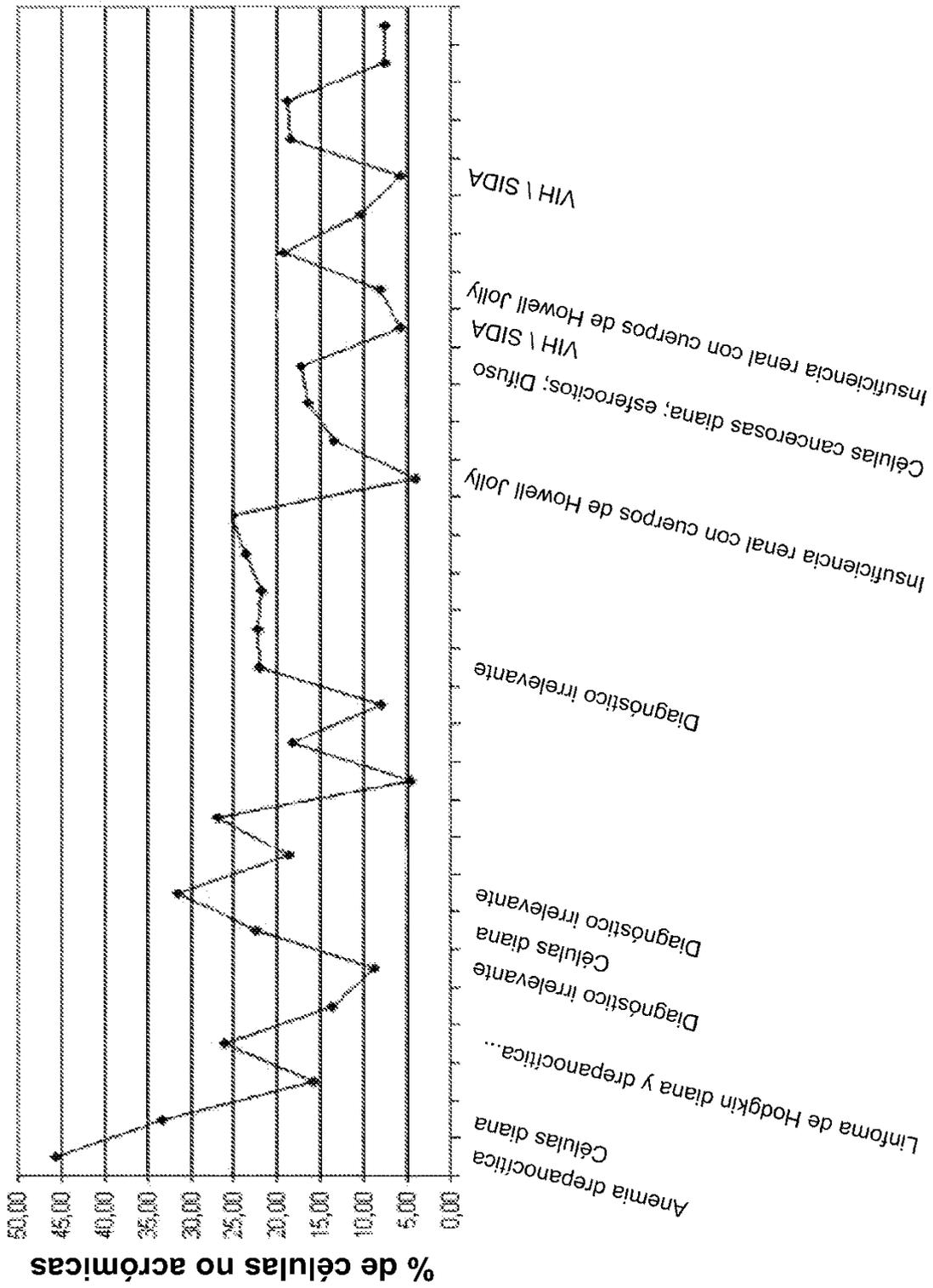


FIG. 11



Diagnóstico

FIG. 12