

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 391**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 15/10 (2006.01)

G01N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2010 PCT/US2010/046082**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2011 WO11028437**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2010 E 10749716 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2470881**

54 Título: **Método para marcar una muestra**

30 Prioridad:

24.08.2009 US 546552

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

13.02.2018

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (100.0%)
100 Abbott Park Road
Abbott Park, IL 60064-3500, US**

72 Inventor/es:

**KROCKENBERGER, MARTIN;
BORDENKIRCHER, RICHARD, B.;
GARRETT, DIANA, G.;
GLAZIER, JOHN, G.;
BEARDEN, JAMES, C.;
ROEMER, BODO y
VACCA, GIACOMO**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 654 391 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 para marcar una muestra

5 **Antecedentes de la invención**

La citometría de flujo es una técnica para contar, examinar y clasificar partículas microscópicas suspendidas en una corriente de fluido. La citometría de flujo permite el análisis simultáneo y multiparamétrico de las características físicas y/o bioquímicas de células individuales que fluyen a través de un aparato de detección óptico/electrónico. Cuando se utiliza en un analizador hematológico, la citometría de flujo permite el recuento preciso de las células en un volumen medido de sangre u otra muestra de fluido biológico y la identificación de esas células en función del uso de la detección de la dispersión de la luz y/o fluorescencia.

Esta descripción se refiere en parte a un analizador hematológico, y a un método para marcar una muestra de sangre que contiene glóbulos rojos resistentes a lisis o glóbulos blancos frágiles.

Del documento WO9316384 (A1), se conoce un método para identificar, caracterizar, categorizar y enumerar células. El método se basa en la supervivencia de diferentes poblaciones de células en la muestra cuando se cambian las condiciones de la muestra para provocar una respuesta. Las células están siendo controladas por la desaparición directa de células intactas o por la aparición de estructuras celulares, restos, fantasmas o residuos. En una realización, se determina una tasa de reducción de las células leucocitarias en presencia de un agente eritrolítico controlando los recuentos de leucocitos a diversos intervalos de tiempo. La tasa de reducción se utiliza para determinar la presencia de leucocitos frágiles y el número de leucocitos en la muestra. El método corrige los errores en los recuentos de leucocitos que permiten el uso de agentes eritrolíticos fuertes en presencia de eritrocitos resistentes a la lisis. La tasa de reducción de los leucocitos se puede volver a extrapolar a tiempo cero para proporcionar una estimación precisa del recuento de leucocitos presente inicialmente en la muestra.

El documento US2008153170 (A1) describe un método para enumerar glóbulos blancos y glóbulos rojos nucleados. El método comprende las etapas de: (b) proporcionar una muestra lisada de sangre completa; (b) introducir la muestra lisada en un citómetro de flujo despolarizante de múltiples ángulos de dispersión de la luz; (c) eliminar la interferencia de despolarización, p.ej., gotitas de lípidos y otras partículas medidas; (d) diferenciar los glóbulos rojos nucleados y el ruido de los glóbulos blancos en ausencia de interferencia despolarizante; (e) diferenciar glóbulos rojos nucleados del ruido en ausencia de interferencia despolarizante y glóbulos blancos; y (f) diferenciar posibles grupos de plaquetas.

Del documento US4882284 (A) se conoce un método para discriminar glóbulos blancos de glóbulos rojos y plaquetas en una muestra de sangre completa sin lisar. Los glóbulos blancos se pueden discriminar en cinco subpoblaciones: linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Se utiliza un colorante fluorescente adsorbente de luz roja junto con un sistema de medición compuesto por una fuente de luz roja y detectores adecuados para fluorescencia roja, dispersión de luz directa y dispersión en ángulo recto.

Compendio de la invención

Se proporcionan un analizador hematológico, un método para marcar una muestra de sangre y un medio físico legible por ordenador para su uso en un analizador hematológico, de acuerdo con la invención, que tienen las características establecidas en la reivindicación 1, reivindicación 14 y reivindicación 15, respectivamente. En ciertas realizaciones, el analizador hematológico comprende: a) una celda de flujo; b) una fuente de luz para dirigir la luz a la celda de flujo; c) una pluralidad de detectores para detectar una pluralidad de características ópticas de un glóbulo que pasa a través de la celda de flujo; y d) una estación de trabajo de análisis de datos programada para: i. enumerar las células sanguíneas de ensayo que pasan a través de la celda de flujo; y ii. marcar una muestra de sangre que contenga glóbulos rojos resistentes a la lisis o glóbulos blancos frágiles. El marcaje se puede realizar analizando los datos de las células sanguíneas de ensayo para producir un valor que describe una característica de las células sanguíneas de ensayo; comparar el valor con un criterio obtenido a partir del análisis de una pluralidad de muestras de referencia que comprenden células sanguíneas; y marcar la muestra de sangre por contener glóbulos rojos resistentes a la lisis o glóbulos blancos frágiles si el valor cumple el criterio.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una ilustración esquemática del subconjunto óptico de un analizador hematológico ilustrativo. La Figura 2 es un gráfico que muestra el uso de la pendiente del recuento total al marcar una muestra. La Figura 3 es un diagrama que muestra las pendientes de recuento total para un conjunto de muestras de referencia normales y el umbral por debajo del cual se acumula una puntuación de marcaje. La Figura 4 es un diagrama que muestra las pendientes de linfocitos para un conjunto de muestras de referencia normales y el umbral por debajo del cual se acumula una puntuación de marcaje. La Figura 5 es un gráfico que muestra la distribución de las distancias máximas de linfocitos para un conjunto de

muestras de referencia normales y el umbral por encima del cual se acumula una puntuación de marcaje.

La Figura 6 es un gráfico que muestra el posicionamiento ilustrativo de cajas para determinar una razón de recuento de cajas de linfocitos.

5 La Figura 7 es un gráfico que muestra la distribución de las razones de recuento de las cajas para un conjunto de muestras de referencia normales y el umbral por encima del cual se acumula una puntuación de marcaje.

La Figura 8 es un conjunto de tres histogramas que muestran la distribución de linfocitos en el canal de detección de dispersión lateral despolarizada para conjuntos de leucemia linfocítica crónica, muestras de eritrocitos normales y resistentes a la lisis.

10 La Figura 9 es un gráfico que representa el coeficiente de variación y el sesgo de la dispersión lateral despolarizada de varias muestras.

La Figura 10 es un gráfico que muestra los valores de una métrica basada en la dispersión lateral despolarizada para un conjunto de muestras de referencia normales y el umbral por encima del cual se acumula una puntuación de marcaje.

15 La Figura 11 es un gráfico que muestra los valores de categoría cero de dispersión lateral despolarizada a escala para un conjunto de muestras de referencia normales y dos umbrales utilizados para calcular la puntuación de marcaje y establecer la marca.

La Figura 12 es un gráfico que muestra las puntuaciones de marcaje para un conjunto de muestras de referencia normales y el umbral utilizado para establecer la marca.

20 Las Figuras 13A-13C son gráficos que muestran cómo se puede utilizar el signo del coeficiente de segundo orden de una línea de mejor ajuste para determinar si una muestra contiene rRBC o fWBC.

Descripción detallada

25 Las etapas de cualquier método enumerado en la presente memoria se pueden llevar a cabo en cualquier orden de los eventos enumerados que sea lógicamente posible, así como el orden de los eventos enumerados. Además, cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo indicado está incluido dentro de la invención. Además, se contempla que se puede establecer y reivindicar independientemente cualquier característica opcional de las variaciones de la invención descritas, o combinada con una cualquiera o más de las características descritas en la presente memoria.

30 Los ítems mencionados se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente memoria debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no ha adquirido derecho a anteceder a tal material en virtud de una invención anterior,

35 La referencia a un elemento singular incluye la posibilidad de que haya plural de los mismos ítems. Más específicamente, como según se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno", "una", "dicho" y "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, si un valor se compara con "un criterio", el valor se puede comparar con uno o más criterios, es decir, un único criterio o múltiples criterios. Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, se pretende que esta declaración sirva como base previa para el uso de terminología exclusiva como "únicamente", "solamente" y similares en relación con la recitación de elementos de reivindicación, o el uso de una limitación "negativa".

40 En esta descripción se utilizan las siguientes abreviaturas: RCB (glóbulos rojos o eritrocitos), rRCB (glóbulos rojos o eritrocitos resistentes a la lisis), WBC (glóbulos blancos o leucocitos), fWBC (glóbulos blancos o leucocitos frágiles), glóbulos blancos (leucocitos), DSS (dispersión lateral despolarizada), CLL (leucemia linfocítica crónica), ALL (pérdida de luz axial), IAS (dispersión del ángulo intermedio), PSS (dispersión lateral polarizada) y DSS (dispersión lateral despolarizada), NEU (neutrófilos), LYM (linfocitos), MON (monocitos), MCV (volumen celular medio), RDW (ancho de distribución de glóbulos rojos), PLT (plaquetas), CBC (recuento sanguíneo completo), HGB (hemoglobina) y FCS (citometría de flujo estándar).

45 En esta descripción, los autores de la presente invención utilizan el término "archivo FCS" para describir una representación digital de la recopilación de eventos detectados capturados por el analizador y clasificados (como, p.ej., glóbulos rojos, linfocitos, etc.) mediante algoritmos internos automatizados. Los eventos en el archivo FCS también pueden denominarse datos de "modo lista", que reflejan un aspecto del formato de archivo FCS, en el que los eventos se organizan en una lista ordenada secuencialmente en el momento de la detección.

Analizadores de hematología

60 Como se indicó anteriormente, se proporciona un analizador hematológico que es capaz de: a) enumerar células sanguíneas de ensayo y b) marcar una muestra de sangre que contiene glóbulos rojos resistentes a la lisis (rRBC) o leucocitos frágiles (fWBC). La muestra puede marcarse por contener rRBC o fWBC: analizando datos para una muestra de ensayo para producir un valor que describe una característica de las células sanguíneas en la muestra de ensayo; comparando el valor con un criterio obtenido a partir del análisis de una pluralidad de muestras de

referencia que comprenden células sanguíneas; y marcando la muestra de sangre que contiene glóbulos rojos resistentes a la lisis o glóbulos blancos frágiles si el valor cumple el criterio.

La metodología descrita a continuación se puede emplear generalmente en cualquier citómetro de flujo adecuado, incluyendo un analizador hematológico, cuyos ejemplos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.378.633, 5.631.165, 6.524.858, 5.266.269, 5.017.497 y 6.549.876, así como en las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos publicadas Núm. US20080153170, US20080158561 y US20080268494. Los analizadores de hematología analizan muestras de sangre completa para determinar, entre otros resultados, la concentración de glóbulos blancos totales y las concentraciones de subpoblaciones de glóbulos blancos, que incluyen, pero no se limitan a, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos. El subconjunto óptico de un analizador hematológico ilustrativo se ilustra esquemáticamente en la Fig. 1. Un experto en la técnica reconocerá que la elección, el número y el diseño de los componentes (p.ej., el tipo de láser utilizado, el número y las especificaciones de los componentes ópticos, etc.) pueden variar mucho entre analizadores y, como tal, el analizador hematológico de la Fig. 1 se proporciona a modo de ejemplo y no debe usarse para limitar esta descripción. Por ejemplo, en ciertos casos, un analizador hematológico puede detectar fluorescencia o no.

Con referencia ahora a la FIG. 1, analizador hematológico **10** ilustrativo comprende una fuente de luz **12**, un espejo frontal **14** y un espejo trasero **16** para la flexión del haz, un módulo expansor de haz **18** que contiene una primera lente cilíndrica **20** y una segunda lente cilíndrica **22**, una lente de enfoque **24**, un ajustador de haz fino **26**, una celda de flujo **28**, una lente de dispersión frontal **30**, un detector de ojo de buey **32**, un primer tubo fotomultiplicador **34**, un segundo tubo fotomultiplicador **36**, y un tercer tubo fotomultiplicador **38**. El detector de diana **32** tiene un detector interno **32a** para medir la extinción del haz de propagación frontal (los datos producidos a partir del mismo se denominan "pérdida de luz axial" o "ALL") y un detector externo **32b** para la dispersión de la luz en un anillo de 3° a 10° desde adelante (también denominado "dispersión de ángulo intermedio" o "IAS"). La fuente de luz **12** puede ser un láser de iones de argón refrigerado por aire de 488 nm polarizado verticalmente o un láser de estado sólido azul (488 nm) polarizado verticalmente. Detalles adicionales relacionados con el láser, la celda de flujo, las lentes, la lente de enfoque, el mecanismo de ajuste de haz fino y la lente de enfoque láser se pueden encontrar en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.631.165, incorporada la presente memoria como referencia, particularmente en la columna 41, línea 32 a columna 43, línea 11.

El sistema de trayectoria óptica directa del analizador hematológico mostrado en la FIG. 1 incluye una lente planoconvexa esférica **30** y un detector de fotodiodos de dos elementos **32** ubicado en el plano focal posterior de la lente. En esta configuración, cada anillo concéntrico dentro del detector de fotodiodo externo **32b** se asigna a un ángulo de recolección específico de luz de las células que se mueven a través de la celda de flujo **28**. El detector **32** puede ser un detector de ojo de buey capaz de detectar la pérdida de luz axial (ALL) y la dispersión directa de ángulo intermedio (IAS). Patente de Estados Unidos Núm. 5.631.165 describe varias alternativas a este detector en la columna 43, líneas 12-52.

El primer tubo fotomultiplicador **34** (PMT1) mide la dispersión lateral despolarizada (DSS) o la fluorescencia verde (FL1). El segundo tubo fotomultiplicador **36** (PMT2) mide la dispersión lateral polarizada (PSS) o la fluorescencia de amarillo a naranja (FL2) y el tercer tubo fotomultiplicador **38** (PMT3) mide la fluorescencia roja (FL3). La FL1, fluorescencia verde, se detecta entre aproximadamente 515 a 545 nm. La FL2, fluorescencia de amarillo a naranja, se detecta entre aproximadamente 565 a 595 nm. La FL3, fluorescencia roja, se detecta entre aproximadamente 615 a 645 nm. Las emisiones de dispersión lateral y fluorescentes se dirigen a estos tubos fotomultiplicadores mediante los divisores de haz dicróicos **40** y **42**, que transmiten y reflejan de manera eficiente a las longitudes de onda requeridas para permitir una detección eficiente. La Patente de Estados Unidos Núm. 5.631.165 describe diversos detalles adicionales relacionados con los tubos fotomultiplicadores en la columna 43, línea 53 a columna 44, línea 4.

La sensibilidad se mejora en los tubos fotomultiplicadores **34**, **36**, y **38**, al medir la fluorescencia, mediante el uso de un sistema de recolección de inmersión. El sistema de recolección de inmersión es el que acopla ópticamente la primera lente del ensamblaje del condensador **44** a la celda de flujo **28** mediante una capa de emparejamiento de índice de refracción, que permite la recogida de luz a lo largo de un gran ángulo. La Patente de Estados Unidos Núm. 5.631.165 describe diversos detalles adicionales de este sistema óptico en la columna 44, líneas 5-31.

El condensador **44** es un sistema de lente óptica con corrección de aberración suficiente para la obtención de imágenes limitadas por difracción utilizada en microscopía de alta resolución. La Patente de Estados Unidos Núm. 5.631.165 describe diversos detalles adicionales de este sistema óptico en la columna 44, líneas 32-60.

Las funciones de los otros componentes mostradas en la FIG. 1, es decir, una hendidura **46**, una lente de campo **48**, y una segunda hendidura **50**, se describen en Patente de Estados Unidos Núm. 5.631.165, en la columna **44**, línea 63 a la columna 45, línea 15. Los tubos fotomultiplicadores **34**, **36**, y **38** detectan cualquier dispersión lateral (luz dispersa en un cono cuyo eje es aproximadamente perpendicular al rayo láser incidente) o fluorescencia (luz emitida desde las células a una longitud de onda diferente de la del rayo láser incidente). Un conjunto deslizante colocado delante del fotomultiplicador **34** permite el uso dual del fotomultiplicador **34**: para detectar la dispersión lateral despolarizada (DSS) cuando el polarizador **52** se mueve en la trayectoria de la luz, y para detectar la fluorescencia

verde (FL1) cuando el filtro **54** se mueve en la trayectoria de la luz. Un conjunto deslizante similar (no se muestra) colocado delante del fotomultiplicador **36** permite el uso doble de detección de dispersión lateral polarizada (DSS) y fluorescencia amarillo-naranja (FL2). El fotomultiplicador **38** está configurado con filtro **56** para detectar fluorescencia roja (FL3) solamente.

Como resultaría obvio, son posibles numerosas variaciones del analizador descrito anteriormente. Por ejemplo, las dos lentes cilíndricas pueden reemplazarse por un par de prismas anamórficos, el detector de ojo de buey puede reemplazarse por detectores separados y un espejo perforado, y se pueden emplear otras longitudes de onda de luz.

Un ejemplo de un analizador hematológico que no detecta fluorescencia se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.378.633, particularmente en la col. 24, línea 47 a col. 25, línea 36 y Fig. 6 y 7.

El procedimiento de medición comienza cuando la corriente celular pasa a través de la celda de flujo **28**, habiendo sido diluida con el agente de lisis de modo que las células pasen a través del volumen iluminado por láser sustancialmente en una sola fila, en una corriente de muestra de flujo laminar rodeada por un fluido de envoltura. El volumen iluminado está limitado por la intersección del rayo láser y la corriente de muestra, y en una realización tiene las dimensiones aproximadas de 80 μm a lo largo de la dirección de propagación del láser, 20 μm a lo largo de la dirección de flujo de la muestra y aproximadamente 5-10 μm en una dirección transversal al flujo de muestra y la propagación del rayo láser.

Una muestra de sangre completa se trata con un agente eritrolítico para lisar los eritrocitos (glóbulos rojos) en la muestra y de ese modo producir una muestra de sangre lisada. El analizador hematológico mide a continuación las características de dispersión de la luz de las células en la muestra lisada para producir datos. Los datos pueden analizarse para enumerar los leucocitos en la muestra, así como para enumerar y clasificar las subpoblaciones de leucocitos (es decir, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos), así como para indicar que una muestra tiene glóbulos rojos resistentes a la lisis o glóbulos blancos frágiles.

En su uso, una suspensión de sangre en la que se han lisado los eritrocitos se impulsa a baja velocidad desde una boquilla de muestra donde entra en contacto con una corriente de envoltura de flujo laminar de movimiento rápido. En un procedimiento conocido como enfoque hidrodinámico, la corriente de muestra se comprime en un núcleo central delgado. Esta disposición generalmente asegura que solo un leucocito está en la región de detección del rayo láser en cualquier momento dado.

Un leucocito sobreviviente a la lisis que ingresa al rayo láser concentrado dispersará la luz en todas las direcciones. Dado que la longitud de onda de la luz es pequeña en comparación con el tamaño de la celda, este fenómeno de dispersión es descrito aproximadamente por la teoría Mie. Una parte de la luz dispersada es recogida por los fotodetectores. En una realización, dos fotodiodos de silicio miden la luz dispersada a la mitad de ángulos de aproximadamente 1-3 grados y aproximadamente 3-10 grados con respecto al eje del haz de láser. Estos fotodiodos pueden denominarse respectivamente detectores de "0 grados" y "10 grados". La luz láser directa es bloqueada por una barra de oscurecimiento. La dispersión de la luz en estos ángulos bajos es una función compleja dominada por el tamaño celular y el índice de refracción promedio con alguna contribución de la estructura o la complejidad celular.

La luz dispersa a 90 grados con respecto al eje del rayo láser se puede recoger utilizando fotomultiplicadores (PMT). Los fotomultiplicadores, no los fotodiodos, se utilizan en los canales de 90 grados debido a que se dispersa relativamente poca luz en ángulos altos, y porque también se utilizan para detectar las emisiones de fluorescencia generalmente de mucha menor intensidad. Si la luz polarizada incidente experimenta una dispersión óptica principalmente a partir de la membrana celular y el núcleo (si está presente), generalmente conserva su plano de polarización vertical original. Sin embargo, si interactúa con ciertos componentes subcelulares que pueden estar presentes en el citoplasma, por ejemplo, gránulos o estructuras anisotrópicas, la luz dispersada puede tener un ángulo de polarización alterado. Para explotar este fenómeno, uno de los PMT puede tener un polarizador horizontal frente a él. Este polarizador evita que la luz polarizada verticalmente golpee el fotomultiplicador. Por lo tanto, cualquier luz detectada por el PMT "despolarizado a 90 grados" es luz que se ha despolarizado por su interacción con una subestructura celular, generalmente un leucocito, y particularmente un eosinófilo. El segundo fotomultiplicador (el PMT "polarizado a 90 grados") puede recibir la luz dispersa reflejada de un divisor de haz angulado a 45 grados y diseñado para reflejar principalmente luz polarizada verticalmente y sobre todo transmitir luz polarizada horizontalmente a la longitud de onda de excitación (láser). La mayor parte de la luz detectada por este segundo fotomultiplicador es luz dispersada lateralmente polarizada verticalmente y transporta información correlacionada con la conformación del núcleo. El esquema de detección de la luz de dispersión brevemente resumido aquí es un diseño patentado denominado Separación de Dispersión Polarizada de Múltiples Ángulos ("MAPSS" en sus siglas en inglés), y se describe con más detalle en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.017.497. Esta descripción se incorpora a la presente memoria como referencia.

Los datos obtenidos de los fotosensores se pueden usar para construir un diagrama de dispersión tetradimensional. Esto se puede observar utilizando las capacidades de los gráficos por ordenador del aparato que permiten rotar una

representación tridimensional "sólida" en el espacio, con la cuarta dimensión puesta de manifiesto mediante la selección de diferentes colores para los píxeles que representan diferentes magnitudes de pulso en esa cuarta dimensión. A los efectos de la documentación en papel, el diagrama de dispersión cuatridimensional puede examinarse mediante seis pares seleccionables por el usuario de trazados o proyecciones de dispersión bidimensionales y mediante numerosas proyecciones de histograma unidimensional seleccionables por el usuario.

Se conocen agentes eritrocíticos que lisan glóbulos rojos pero no leucocitos y pueden contener una solución acuosa de un oxialcohol (para proteger a los leucocitos de la lisis), un tampón orgánico (que tiene un pH de 8,5 o cerca de él, que sirve para proporcionar capacidad de amortiguación del pH e incrementar conductividad eléctrica del agente eritrolítico) y un componente tensioactivo (que contribuye a la lisis de los eritrocitos). La combinación del reactivo eritrolítico debe tener baja osmolaridad para aumentar la efectividad del procedimiento de lisis. El oxialcohol utilizado puede ser 2-fenoxietanol. El tampón orgánico puede seleccionarse del grupo que consiste en TRIS/HCl, ácido bórico, glicilglicina y BICENE™. El tensioactivo puede seleccionarse del grupo que consiste en TRITON X-100™, TRITON X-114™ y polioxietileno o tensioactivos derivados de sacáridos. En ciertas realizaciones, el agente eritrolítico contiene 2-fenoxietanol a una concentración entre 20 mM y 80 mM, tampón TRIS™/HCl y TRITON X-100™.

En una realización concreta, el agente eritrolítico contiene una solución acuosa de TRITON X-100™, 2-fenoxietanol y tampón TRIS™/HCl. La sangre completa se mezcla con un exceso (p.ej., treinta a cincuenta veces) de este agente eritrolítico. La lisis de los glóbulos rojos se produce con extrema rapidez debido a la combinación del choque osmótico, la acción del tensioactivo y el pH de aproximadamente 8,5. En la formulación optimizada, el 2-fenoxietanol está presente a una concentración de aproximadamente 41 mM, aunque existe un intervalo útil de concentraciones entre 20 y 80 mM. El pH del tampón TRIS™ puede reducirse a pH 8,1 sin efectos significativos sobre su rendimiento. Si el pH del tampón aumenta por encima de 9,0, el agente eritrolítico se vuelve más eritrolítico y se producirá una lisis más rápida. La presencia de pequeñas cantidades (hasta aproximadamente 5% vol./vol. de TRITON X-100) o un agente tensioactivo similar ayuda a asegurar la eritrolisis completa en muestras que normalmente se consideran difíciles de lisar, pero esto también acelera la lisis.

Otros tampones orgánicos pueden ser sustituidos por TRIS™/HCl. Entre los que tienen un pH cercano a 8,5 se encuentran el ácido bórico, la glicilglicina y BICINE™ (disponible a través de CalBiochem) que pueden usarse en el agente eritrolítico. TRITON X-114™ se puede usar como el componente tensioactivo del agente eritrolítico. Otros tensioactivos hidrófilos se pueden seleccionar de aquellos que tienen grupos de cabeza de polioxietileno o sacárido.

Metodología

A continuación se describen varias realizaciones de un método que emplea datos recogidos de muestras de referencia para marcar muestras que contienen glóbulos rojos resistentes a la lisis (rRBC) o leucocitos frágiles (fWBC). En ciertas realizaciones, este método incluye: a) lisar glóbulos rojos en una muestra de sangre completa para producir una muestra de sangre lisada; b) someter la muestra de sangre lisada a análisis utilizando un analizador hematológico para obtener datos para las células en la muestra lisada; c) analizar datos para proporcionar un valor que describa una característica de las células; d) comparar el valor con un criterio obtenido a partir del análisis de una pluralidad de muestras de referencia de sangre lisada; y e) marcar la muestra de sangre lisada por contener glóbulos rojos resistentes a la lisis o glóbulos blancos frágiles si el valor cumple el criterio. Además de lo anterior, el analizador hematológico puede producir un informe que indique que la muestra de sangre lisada contiene marcadores de glóbulos rojos resistentes a la lisis o glóbulos blancos frágiles, si el valor cumple el criterio. El método puede ser ejecutado automáticamente por el analizador hematológico.

Como se mencionó anteriormente y como se describirá con mayor detalle a continuación, una muestra de sangre puede marcarse si un valor "cumple" un criterio. Dado que algunos de los métodos descritos a continuación pueden requerir la comparación de un número (el valor) con otro número (el criterio) para determinar si se cumple un criterio, se puede cumplir un criterio si: a) el valor es el mismo que el criterio, b) el valor es mayor que el criterio o c) el valor está por debajo del criterio, dependiendo de la relación entre el valor y el criterio.

Ciertas partes de esta descripción se refieren a células sanguíneas de "ensayo", donde las células sanguíneas de "ensayo" son las células de una muestra de sangre que está siendo analizada por un analizador hematológico.

En ciertas realizaciones y como se describirá con mayor detalle a continuación, los datos para una muestra de ensayo se analizan para proporcionar un valor que describe una característica de la muestra de ensayo, y ese valor se compara con un criterio obtenido a partir de una pluralidad de muestras de referencia. En esencia, el valor que describe una característica de las células de la muestra de ensayo se evalúa para determinar si se trata de un valor atípico estadístico con respecto a las muestras de referencia, donde el criterio es un umbral que determina si el valor es significativamente diferente del que se esperaría si la muestra fuera "normal" en el sentido de que no contiene rRBC ni fWBC.

En realizaciones concretas, el valor se basa en un número que describe la característica de la muestra (p.ej., la

pendiente de una línea de mejor ajuste, distancia de dos puntos en un gráfico, razón de recuadro, ancho de distribución, asimetría, etc.) más o menos una medida de la variación que se esperaría para ese número en función de una serie de muestras anteriores que se ejecutaron previamente en la misma máquina. En estas realizaciones, el valor utilizado puede ser el número antes mencionado, más o menos al menos uno (p.ej., al menos 2, al menos 2,5, al menos 3 hasta 4, 5 o 6 o más) desviaciones típicas de ese número, basándose en la variación de las muestras anteriores. Asimismo, el criterio con el que se compara el valor puede basarse en un número que describa la misma característica de las muestras de referencia (p.ej., la pendiente de una línea de mejor ajuste, distancia de dos puntos en un gráfico, razón de recuadro, ancho de distribución, asimetría, etc.), más o menos una medida de la variación de ese número en las muestras de referencia. En estas realizaciones, el criterio utilizado puede ser un número que describe la misma característica en las muestras de referencia, más o menos al menos uno (por ejemplo, al menos 2, al menos 2,5, al menos 3 hasta 4, 5 o 6 o más) desviaciones típicas de ese número.

Dependiendo de la metodología empleada, el criterio puede ser un criterio estático o continuamente actualizado. Un criterio estático es un criterio que no se actualiza continuamente cada vez que se ejecuta una muestra en el analizador, sino que se basa en datos obtenidos de una pluralidad de muestras (p.ej., al menos 5, 10, 20, 50, 100, 500, 1.000, 10.000 o 100.000 muestras) que anteriormente se ejecutaban en una máquina diferente. Un criterio continuamente actualizado se actualiza cada vez que una muestra normal (es decir, una muestra que cumple los criterios predeterminados de normalidad) se ejecuta en el analizador, donde el criterio es un criterio actualizado continuamente obtenido a partir de al menos las 5, 10, 50, 100, 200, 500, 1.000 o 10.000 muestras anteriores analizadas por medio del mismo analizador hematológico. Un criterio estático se puede describir como "programado" en el analizador y se mantiene constante durante la vida útil de la máquina, mientras que el criterio actualizado dinámicamente se actualiza continuamente a medida que se ejecutan nuevas muestras. En ciertas realizaciones, el criterio estático se puede actualizar periódicamente (por ejemplo, según sea necesario cada año o cada pocos años) si el criterio estático cambia, o si un cambio en el soporte lógico del analizador o el soporte lógico de la estación de datos altera el criterio estático.

En realizaciones concretas, los datos para una muestra de ensayo se pueden analizar primero en el contexto de datos de muestras actualizadas continuamente (es decir, datos de al menos las 5, 10, 50, 100, 200, 500, 1.000 o 10.000 muestras analizadas previamente) por medio del analizador hematológico) para proporcionar un valor que indique cuán similar es una característica de la muestra de ensayo a la de muestras anteriores analizadas en la misma máquina. Una vez que se ha determinado ese valor, se puede comparar con un criterio estático para determinar si la muestra de ensayo contiene rRBC o fWBC. Como tal, en ciertas realizaciones, el valor se puede obtener comparando los datos para las células sanguíneas de ensayo con los datos obtenidos a partir de una pluralidad de muestras de referencia que se ejecutaron previamente en la misma máquina. En ciertos casos, esta realización puede controlar la variabilidad de máquina a máquina, particularmente cuando se evalúan los parámetros ópticos de una muestra. En otras realizaciones, el valor para una muestra de ensayo puede obtenerse mediante análisis solo de los datos para la muestra de ensayo (es decir, sin el uso de datos de muestras actualizadas dinámicamente). Una vez que se ha determinado ese valor, se puede comparar con un criterio, ya sea un criterio actualizado dinámicamente o un criterio estático, para determinar si la muestra de ensayo contiene rRBC o fWBC.

En ciertos casos, la estación de trabajo de análisis de datos del analizador hematológico puede contener una memoria que contiene datos obtenidos a partir de una pluralidad de muestras de referencia anteriores analizadas por esa máquina, así como un criterio. La estación de trabajo de análisis de datos se puede programar para actualizar esos datos continuamente a medida que se analizan muestras de sangre en el analizador. El analizador hematológico puede programarse adicionalmente para ajustar los datos obtenidos para una muestra de células (es decir, ajustar los números de un tipo de célula particular) de acuerdo con el análisis descrito anteriormente y a continuación. Por ejemplo, si se identifican rRBC, se puede disminuir el número de células identificadas como leucocitos o linfocitos.

Las características de las células ilustrativas y los métodos para proporcionar un valor que describe tales características celulares se describen a continuación.

Disminución del recuento de células

En una realización, la característica de las células es la tasa de disminución del recuento de células durante un período de tiempo. Como tal, en ciertas realizaciones, el analizador hematológico mide la tasa de disminución de un número de células contadas en las muestras de ensayo de sangre sometida a lisis durante un período de tiempo (típicamente unos pocos segundos, por ejemplo, al menos 2 segundos, al menos 5 segundos, al menos 10 segundos, al menos 20 segundos, o más) contando el número de células por unidad de tiempo (p.ej., a intervalos de al menos 10 ms, al menos 50 ms, al menos 100 ms o al menos 200 ms, o más) durante el período de tiempo. La muestra de sangre lisada puede marcarse si la tasa de disminución del número de células contadas es significativamente mayor que la tasa de disminución del número de células contadas en las muestras de referencia de sangre sometida a lisis.

En ciertas realizaciones, los datos temporales obtenidos a partir de una muestra pueden analizarse utilizando

métodos estadísticos convencionales para proporcionar la pendiente de la línea de mejor ajuste para las células, así como una medida de la variabilidad de los datos (p.ej., la desviación típica o "sigma" de los datos) con respecto a la línea de mejor ajuste. En estas realizaciones, el valor que se compara con el criterio puede ser la pendiente de la línea de mejor ajuste para las células de ensayo, más al menos una desviación típica (p.ej, al menos 2, al menos 2,5, al menos 3 hasta 4, 5 o 6 o más desviaciones típicas) de la pendiente de la línea de mejor ajuste para las células.

En esta realización, el criterio con el que se compara el valor obtenido de las células de ensayo puede basarse en la pendiente de las líneas de mejor ajuste para las muestras de referencia, donde, en ciertos casos, se emplea la pendiente media de las líneas de mejor ajuste para las muestras de referencia. En realizaciones concretas, los datos temporales obtenidos a partir de una pluralidad de muestras de referencia pueden analizarse para proporcionar una pluralidad correspondiente de líneas de mejor ajuste para las muestras de referencia. El criterio empleado en esta realización puede basarse en la pendiente media de las líneas de mejor ajuste para las células de referencia, así como una medida de la variabilidad de las pendientes de las líneas de mejor ajuste (p.ej., la desviación típica de las pendientes de las líneas de mejor ajuste). En estas realizaciones, el criterio con el que se compara el valor puede ser la pendiente media de las líneas de mejor ajuste para las células de referencia, menos al menos una desviación típica (por ejemplo, al menos 2, al menos 2,5, al menos 3 hasta 4, 5 o 6 o más desviaciones típicas) de la pendiente media de las líneas de mejor ajuste para las células de referencia.

En una realización ejemplar ilustrada en la Fig. 2, el valor para los datos de la muestra de ensayo es la pendiente de la muestra de la línea de mejor ajuste más tres desviaciones típicas, y el criterio es la pendiente media de la línea de mejor ajuste para las muestras de referencia, menos tres desviaciones típicas. Si el valor cumple el criterio, la muestra puede ser marcada.

En realizaciones concretas, si el valor cumple el criterio, puede proporcionarse una "puntuación" que indique la distancia numérica entre el valor y el criterio. En la realización mostrada en la Fig. 2, la puntuación cumple el criterio (es decir, es más negativa que el criterio) y, por lo tanto, la muestra puede marcarse. Cuanto más diferente es el valor del criterio, más alto es la puntuación.

En estas realizaciones, el criterio puede ser continuamente actualizado o estático. Sin embargo, dado que la velocidad de disminución del recuento celular no debe variar significativamente de una máquina a otra, el criterio empleado en muchas realizaciones puede ser un criterio estático. Por ejemplo, el criterio que se muestra en el gráfico de la Fig. 3 se calculó utilizando los datos temporales para más de 2.000 muestras ejecutadas en múltiples máquinas diferentes.

El analizador hematológico mide la tasa de disminución en el número total de células o el número de células clasificadas como linfocitos contado en las muestras de ensayo de sangre sometida a lisis durante un período de tiempo. Si el valor indica la tasa de disminución del número total de células contadas en la muestra lisada durante un período de tiempo, la muestra de sangre lisada puede marcarse si la tasa de disminución para la muestra de ensayo es significativamente mayor que la tasa de disminución del número total de células contadas en las muestras de referencia de sangre lisada. Del mismo modo, si el valor indica la tasa de disminución del número de células clasificadas como linfocitos contados en la muestra lisada durante un período de tiempo, la muestra de sangre lisada puede marcarse si la tasa de disminución es significativamente mayor que la tasa de disminución del número de células clasificadas como linfocitos contados en las muestras de referencia de sangre lisada. En ciertos casos, el método puede proporcionar una puntuación que indique la velocidad de disminución de las células totales, y una puntuación que indique la velocidad de disminución de las células clasificadas como linfocitos.

En realizaciones concretas, los datos temporales pueden analizarse adicionalmente para determinar si la tasa de disminución del número de células contadas (células totales en la muestra, o células clasificadas como linfocitos) está aumentando o disminuyendo, donde una tasa creciente de disminución sugiere que la muestra de sangre lisada contiene glóbulos blancos frágiles; y una tasa decreciente de disminución sugiere que la muestra de sangre lisada contiene glóbulos rojos resistentes. En estas realizaciones, se puede realizar un análisis polinómico de segundo orden no lineal de los datos, y el signo del coeficiente de segundo orden de la línea de mejor ajuste indica si la tasa de disminución del número de células contadas está aumentando o disminuyendo. Un coeficiente positivo de segundo orden sugiere que la muestra contiene rRBC, mientras que un coeficiente negativo de segundo orden sugiere que la muestra contiene fWBC. Como tal, en ciertas realizaciones, además de marcar una muestra que contiene rRBCs o fWBCs, el analizador también puede indicar qué células contiene una muestra. En ciertos casos, dado que las muestras que contienen rRBC son más comunes que las muestras que contienen fWBC, una muestra puede marcarse como probable que contenga rRBC en lugar de fWBC sin realizar ningún análisis polinómico de segundo orden. En tales casos, se puede recomendar un ensayo de seguimiento para identificar la sustancia que interfiere.

Distancia geométrica de los linfocitos

En otra realización, los datos comprenden los valores de pérdida de luz axial (ALL) y de dispersión de ángulo

intermedio (IAS) para las células de la muestra de ensayo que se clasifican como linfocitos, el valor se basa en los valores de ALL media y de IAS media para las células de ensayo, y el criterio se basa en la mediana de las medias de los valores de ALL e IAS para las células de referencia.

5 En esta realización, el analizador puede calcular y almacenar de manera independiente los valores de ALL media y de IAS media para una pluralidad de muestras previas ejecutadas en el analizador (p.ej., datos de al menos las 5, 10, 50, 100, 200, 500, 1.000, o 10.000 muestras normales anteriores analizadas por el analizador hematológico). A medida que se analiza una muestra de ensayo, se calculan los valores ALL media y de IAS media para las células que se clasifican como linfocitos y se determina la distancia geométrica (es decir, la distancia Euclidiana en el espacio ALL-IAS bidimensional) entre: a) los valores medios de ALL e IAS para las células que se clasifican como linfocitos en la muestra de ensayo y b) la mediana de los valores medios de ALL e IAS para la pluralidad de muestras anteriores. Si bien la distancia calculada puede indicar que la muestra puede ser "atípica" si es suficientemente grande (lo que sugiere que la muestra de ensayo contiene rRBC), la distancia calculada puede compararse con un criterio estático basado en las distancias geométricas (la distancia entre los valores de ALL media e IAS media para una muestra, y la mediana de la ALL y la IAS medias para las células de referencia) para las células que se clasifican como linfocitos en cada una de las muestras de referencia más al menos una desviación típica (p.ej. al menos 2, al menos 2,5, al menos 3 hasta 4, 5 o 6 o más desviaciones típicas) de la media.

20 En el ejemplo mostrado en la Fig. 5, el criterio estático se establece en 4,0, que representa la distancia geométrica media (1,1) más aproximadamente 3,6 desviaciones típicas (0,8), y si la distancia geométrica para una muestra de ensayo excede de 4,0, la muestra puede marcarse por contener rRBC. De nuevo, en esta realización, puede proporcionarse una "puntuación" que indique la distancia numérica entre el valor y el criterio si el valor ha cumplido el criterio. En la realización mostrada en la Fig. 5, si el valor cumple el criterio (es decir, es al menos 4,0), la muestra puede marcarse. Cuanto mayor sea la diferencia entre el valor y el criterio, mayor será la puntuación.

25

Proporción de recuento del recuadro de linfocitos

30 En una realización adicional, los datos comprenden los valores de pérdida de luz axial (ALL) y de dispersión de ángulo intermedio (IAS) para las células de la muestra de ensayo que se clasifican como linfocitos. En esta realización, el valor es el inverso de la relación compuesta por: a) el número de células clasificadas como linfocitos definidos por los límites de ALL e IAS predeterminados, dividido por b) el número de células clasificadas como linfocitos definidos por los límites de ALL e IAS que son adyacentes a los límites predeterminados de ALL e IAS para la muestra de ensayo. En esta realización, el criterio se basa en la inversa de la relación entre el número de células clasificadas como linfocitos definidos por los límites de ALL e IAS predeterminados, dividido por el número de células clasificadas como linfocitos definidos por los límites de ALL e IAS que son adyacentes a los límites de ALL e IAS predeterminados para las muestras de referencia.

35

40 Como se ilustra en el diagrama de dispersión esquemático de la Fig. 6, las células clasificadas como linfocitos definidos por límites predeterminados de ALL e IAS se indican en el recuadro inferior izquierdo que contiene una mancha. El número de células clasificadas como linfocitos dentro del recuadro (los linfocitos "verdaderos") se compara con el número de células en uno o más recuadros adyacentes, es decir, los linfocitos "no verdaderos". Como se muestra en la Fig. 6, los linfocitos no verdaderos están definidos por un recuadro adyacente a la izquierda del recuadro de linfocitos verdaderos, un recuadro adyacente debajo del recuadro de linfocitos verdadero y/o un recuadro adyacente que está a la derecha del recuadro de linfocito verdadero) para definir una o más relaciones de número de celda. Como se indicó, todas las casillas adyacentes tienen límites de IAS y ALL superiores e inferiores definidos, cuyos límites comparten un lado, parte de un lado o una esquina con el recuadro de linfocitos "verdaderos".

45

50 Los límites predeterminados de ALL e IAS para el recuadro de linfocitos verdaderos se definen por la mediana de los valores de IAS media y de IAS media para las células clasificadas como linfocitos en una pluralidad de muestras previas ejecutadas en el analizador (utilizando, por ejemplo, datos de al menos 5, 10, 50, 100, 200, 500, 1.000 o 10.000 muestras normales previas analizadas por el analizador hematológico, más y menos al menos 1 desviación típica (p.ej., al menos 2, al menos 2,5, al menos 3 hasta 4, 5 o 6 o más desviaciones típicas) de las medias. Como se muestra en la Fig. 6, la mediana del valor medio de IAS para las células clasificadas como linfocitos en las muestras anteriores es de aproximadamente 19 y, dado que la desviación típica es de aproximadamente 3, los límites de IAS inferiores y superiores para las células clasificadas como linfocitos son aproximadamente 16 y 22, respectivamente. Asimismo, la mediana del valor medio de ALL para los linfocitos en las muestras anteriores es de aproximadamente 25 y, dado que la desviación típica es de aproximadamente 4, los límites de IAS inferior y superior para los linfocitos son aproximadamente 21 y 29, respectivamente. Dado que el tamaño del recuadro de linfocitos verdaderos puede cambiar y la posición del recuadro puede moverse dependiendo de las muestras anteriores, el tamaño y la posición de los recuadros adyacentes también pueden cambiar para mantener una esquina o borde en común con el recuadro de linfocitos; esto está indicado esquemáticamente por el segundo recuadro de linfocitos con bordes discontinuos en la Fig. 6, y sus correspondientes recuadros adyacentes.

60

65 En una realización concreta, el número total de linfocitos definidos por los límites adyacentes de ALL e IAS (es decir,

el número total de células en uno o más recuadros de linfocitos no verdaderos adyacentes) se divide por el número de linfocitos en los límites de ALL e IAS predeterminados (es decir, el número de células en el recuadro de linfocitos verdaderos) para definir una relación única que describe la razón de recuento del recuadro de linfocitos.

5 Si bien esta razón puede indicar que la muestra puede ser un valor atípico si fuera suficientemente grande en relación con otras muestras anteriores (lo que indica que la muestra contiene rRBC), la razón puede compararse con un criterio estático que está basado en la razón media de recuento del recuadro de linfocitos para las células que se clasifican como linfocitos en cada una de las muestras de referencia más al menos una desviación típica (por ejemplo, al menos 2, al menos 2,5, al menos 3 hasta 4, 5 o 6 o más desviaciones típicas) de la media.

10 De nuevo, en esta realización, se puede proporcionar una puntuación que indique la distancia numérica entre el valor (que es la razón comentada anteriormente) y el criterio (que puede basarse en la media y la desviación típica de la razón de una colección de muestras de referencia).) En la realización mostrada en la Fig. 7, si el valor cumple el criterio (es decir, es al menos 0,8), la muestra puede marcarse. Cuanto mayor sea el valor relativo al criterio, mayor será la puntuación.

DSS de linfocitos

20 En otra realización, los datos comprenden valores de dispersión lateral despolarizada (DSS) para células clasificadas como linfocitos, el valor comparado con el criterio indica el grado de distribución y/o sesgo de los valores de DSS para la muestra de ensayo, y el criterio se basa en el grado de distribución y/o sesgo de los valores de DSS para las muestras de referencia. En esta realización, los valores de DSS para las células clasificadas como linfocitos se agrupan, y los compartimientos se analizan para determinar el ancho de distribución de los valores de DSS. Como se muestra en la Fig. 8, los rRBC tienen una distribución más amplia que las células normales, mientras que las células de leucemia linfocítica crónica (CLL) tienen una distribución más estrecha. De manera similar (utilizando diferentes métodos estadísticos), las categorías de DSS pueden analizarse para determinar el sesgo de los valores de DSS, donde, como se muestra en la Fig. 8, los linfocitos de muestras normales y de CLL tienen una distribución relativamente normal en relación con la de una muestra que contiene rRBC.

30 En una realización, ilustrada en la Fig. 9, el valor utilizado para la comparación con el criterio se basa en la distribución de DSS y el sesgo de DSS, donde las muestras se trazan en un diagrama de dispersión donde la distribución de DSS y el sesgo de DSS forman dos ejes, y el valor es distancia geométrica señalada de una línea predeterminada ("línea") en este diagrama de dispersión (es decir, positivo si la muestra está por encima de la línea y negativo si está debajo de ella). En este gráfico se trazan varios tipos de muestras, incluidos los conjuntos de muestras que incluyen muestras predominantemente normales ("Norma", "Norma121"), conjuntos que incluyen muestras predominantemente negativas (es decir, que no contienen rRBC) ("Neg", "JNeg"), y otros conjuntos que incluyen muestras predominantemente anormales (es decir, que contienen rRBC) ("Pos", "JPos"). En otras realizaciones, la distribución de DSS y el sesgo de DSS pueden usarse independientemente para marcar una muestra.

40 Si bien este valor puede indicar por sí mismo que la muestra es un valor atípico si fuera suficientemente grande en relación con otras muestras anteriores (lo que indica que la muestra contiene rRBC), el valor puede compararse con un criterio estático basado en la distribución media de DSS y/o el sesgo medio de DSS para las células que se clasifican como linfocitos en cada una de las muestras de referencia más al menos una desviación típica (p. ej., al menos 2, al menos 2,5, al menos 3 hasta 4, 5 o 6 o más desviaciones típicas) de la media. En la realización mostrada en la Fig. 10, la media y la desviación típica de los valores derivados de DSS son -6,6 y 2,2, respectivamente, lo que proporciona un criterio de 0.

50 De nuevo, en esta realización, se puede proporcionar una "puntuación" que indique la diferencia numérica entre el valor y el criterio si el valor cumple el criterio. En la realización mostrada en la Fig. 10, si el valor cumple el criterio (es decir, es al menos 0), la muestra puede marcarse. Cuanto mayor sea el valor relativo al criterio, mayor será la puntuación otorgada.

55 En otra realización, los datos comprenden los valores de dispersión lateral despolarizada (DSS) para células clasificadas como linfocitos, el valor indica el número de eventos de categoría cero en la distribución de los valores de DSS (donde un "evento de categoría cero" es un evento clasificado en la primera categoría de digitalización, es decir, categoría "cero", del intervalo disponible para la digitalización) y el criterio se basa en el número de eventos de categoría cero en la distribución de valores de DSS para las muestras de referencia. De nuevo, se puede proporcionar una puntuación que indique la diferencia numérica entre el valor y el criterio, si el valor cumple el criterio.

Puntuaciones combinadas, ponderación y verificación cruzada

65 Como se señaló anteriormente, cada uno de los métodos puede generar una puntuación numérica que describe la diferencia entre la muestra de ensayo y la muestra de referencia. En ciertas realizaciones, estas puntuaciones

pueden sumarse, y la muestra de sangre puede marcarse si la puntuación sumada excede un umbral. Las puntuaciones individuales se pueden ponderar antes de sumar. En realizaciones concretas, si un valor no cumple un criterio, puede marcarse como un "0" y, como tal, no contribuirá a la suma de las puntuaciones.

- 5 En ciertas realizaciones, además de detectar directamente rRBC, el método también puede estimar la precisión del recuento de WBC utilizando el ensayo de RBC de impedancia (RBCi) y el ensayo de reticulocitos (RETC).

10 En una realización, el histograma de RBC de impedancia contiene principalmente WBC en las categorías de digitalización superiores (por ejemplo, última categoría, últimas 5 categorías, etc.) del intervalo de digitalización, y esta verificación cruzada asegura que la razón WBC/RBC, que puede ser obtenida a partir del histograma, no es significativamente menor que la obtenida a partir de la concentración de WBC (del ensayo WBC) y la concentración de RBC (del ensayo RBCi). Si la razón WBC/RBC del histograma RBCi es significativamente menor que la razón WBC/RBC de los ensayos WBC y RBCi, se eleva la marca de rRBC.

15 En otras realizaciones, las células en la muestra se separan en WBC, RBC y PLT en el ensayo RETC sobre la base de patrones de dispersión en FL1. vs. IAS. La verificación cruzada utiliza la razón de los WBC a los RBC en este ensayo, que se compara con la razón WBC/RBC de los ensayos WBC y RBCi descritos anteriormente. Si la razón del ensayo RETC es significativamente menor que la razón de los ensayos WBC y RBCi, se eleva la marca de rRBC.

20

Programación

25 En una realización, se proporciona una memoria física que contiene instrucciones (es decir, "programación") para realizar el método descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la memoria puede comprender un medio físico legible por ordenador que comprende programar marcar una muestra de sangre que contiene glóbulos rojos resistentes o glóbulos blancos frágiles: analizando los datos para células sanguíneas de ensayo analizadas mediante dicho analizador hematológico para producir un valor que describe una característica de dichas células sanguíneas de ensayo; comparando el valor con un criterio obtenido a partir del análisis de una pluralidad de muestras de referencia que comprenden células sanguíneas de referencia; y marcando la muestra de sangre por

30 contener glóbulos rojos resistentes o glóbulos blancos frágiles si el valor cumple el criterio, como se describió anteriormente.

35 La programación se puede proporcionar en un medio físico de almacenamiento o transmisión. Un ordenador que recibe las instrucciones puede ejecutar el algoritmo y/o los datos de procedimiento obtenidos del método sujeto. Los ejemplos de los medios de almacenamiento legibles por ordenador incluyen disquetes, cinta magnética, CD-ROM, unidad de disco duro, ROM o circuito integrado, un disco magnetoóptico o una tarjeta legible por ordenador tal como una tarjeta PCMCIA y similares, sean esos dispositivos internos o externos a la computadora o no. Un archivo que contiene información puede ser "almacenado" en un medio legible por ordenador, donde "almacenar" significa registrar información de manera que sea accesible y recuperable en una fecha posterior por un ordenador en una

40 red local o remota.

El método descrito anteriormente se puede ejecutar automáticamente cada vez que se ejecuta una muestra.

Utilidad

45 El analizador hematológico descrito anteriormente se puede emplear para identificar y marcar muestras que contienen leucocitos frágiles (fWBC) o glóbulos rojos resistentes a la lisis (rRBC).

Leucocitos frágiles

50 En ciertos casos, los leucocitos en una muestra de sangre son particularmente frágiles a la lisis, y pueden ser lisados en su totalidad o en parte por el agente eritrolítico. Como se indicó anteriormente, el método descrito anteriormente puede usarse para marcar una muestra de sangre que contiene glóbulos blancos frágiles.

55 En unos pocos trastornos clínicos raros pero muy importantes, ciertas subpoblaciones leucocíticas circulantes pueden contener miembros extremadamente sensibles a la lisis. Los "linfocitos frágiles", como en ciertos casos de leucemia linfocítica crónica y en mononucleosis infecciosa, son un paradigma para esta situación. En tales condiciones clínicas, los morfólogos del siglo pasado identificaron "sombras de Gumprecht" en el análisis microscópico de la película sanguínea. (Véase H. Begemann, J. Rastetter, Atlas of Clinical Hematology, 4ª edición

60 1989, pág. 227, Springer-Verlag). Los tecnólogos actuales reconocen las "células de frotis" (J. Cross, C. A. Strange, "Erroneous Ortho ELT 800/WS WBC in chronic lymphatic leukaemia", Clin. Lab. Hematol. 1987, 9, 371-375) o "células difuminadas" (National Committee for Clinical Laboratory Standards, *Reference Leukocyte Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Method*, Approved Standard, NCCLS Document H20-A 1992, Villanova, Pa.). Las poblaciones de células leucocíticas afectadas pueden contener células tan frágiles que ni siquiera pueden

65 conservarse en la película sanguínea sin la adición de una alta concentración de un coloide (como la albúmina) a la

gota de sangre antes del estrés de que se imponga a las células el procedimiento de fabricación de la película. (Véase, por ejemplo, Documento H20-A de NCCLS; Densmore, C. M., "Eliminating disintegrated cells on hematologic films," Lab. Med. 12:640-41, 1981).

5 Tales leucocitos muy frágiles también son difíciles de conservar cuando la sangre se diluye en gran medida y se procesa vigorosamente en contadores de células sanguíneas automatizados por citometría de flujo. Esto se verifica incluso cuando el diluyente es una solución salina fisiológica aparentemente equilibrada (sin proteínas) que está destinada a preservar en lugar de lisar los numerosos eritrocitos interferentes. Por lo tanto, cuando estos leucocitos frágiles están presentes en una muestra, a veces es prácticamente imposible conocer la concentración correcta de leucocitos circulantes (o el recuento total de glóbulos blancos) y el recuento numérico correcto para las subpoblaciones de leucocitos. (Véanse, p.ej., J. Cross, C. A. Strange, "Erroneous Ortho ELT 800/WS WBC in chronic lymphatic leukaemia", Clin. Lab. Hematol. 1987, 9, 371-76; J. B. Dixon et al., "Electronic Counting of Dog Leukocytes Discrepancies Arising From Calibration With Coulter Standard 4C and With the Hemocytometer," Res. Vet. Sci. 31 (2), 1981, 249-252; y J. M. England, et al., "An assessment of the Ortho ELT-8," Clin. Lab. Hematol. 1982, 4, 187-99.)

Eritrocitos resistentes

20 En ciertos casos, los glóbulos rojos en una muestra de sangre son particularmente resistentes a la lisis y el agente eritrolítico no los lisa por completo. Como se indicó anteriormente, el método descrito anteriormente se puede utilizar para marcar una muestra de sangre que contiene glóbulos rojos resistentes a la lisis.

25 En un grupo de afecciones bien conocidas que conducen a eritrocitos supervivientes a la lisis, los propios eritrocitos parecen difíciles de lisar mediante las técnicas aplicables a muestras humanas típicas; los ejemplos de estas afecciones incluyen enfermedades de células falciformes, enfermedades hepáticas, talasemias y otras poblaciones de eritrocitos fisiológicos de mamíferos atípicos y aberrantes. Los eritrocitos de neonatos y lactantes normales y sanos también exhiben grados significativos de resistencia a la lisis. En otro grupo de afecciones o trastornos, la presencia de sustancias interferentes opuestas a la lisis hace que los eritrocitos sean difíciles de lisar en condiciones eritrocíticas que son efectivas para muestras humanas típicas. Por ejemplo, una concentración anormalmente alta de proteínas sanguíneas tiende a neutralizar algunos de los agentes eritrolíticos y a contrarrestar oncológicamente algunos de los enfoques físicos eritrolíticos. (Véanse, p.ej., A. Bremmelgaard, J. Nygard, "Interference by Cryoglobulins with White Blood Cell Measurements on Coulter Counter," Scand. J. Clin. Lab. Invest. 51 (5) 1991, 489-492). Las soluciones de alimentación parenteral, ciertos trastornos de los lípidos en la sangre y los medicamentos terapéuticos también pueden actuar creando condiciones eritroprotectoras, ya sea solos o combinados con otros agentes o con eritrocitos anómalos.

35 En presencia de eritrolisis fallida o parcial como resultado del problema de los eritrocitos resistentes a la lisis, todo el procedimiento de recuento de leucocitos puede quedar invalidado para las muestras afectadas. Los eritrocitos sobrevivientes a la lisis interfieren con la visualización de los leucocitos. Si un uno por ciento de cinco millones de eritrocitos no puede lisarse por cada microlitro de sangre humana, quedan cincuenta mil eritrocitos sin lisar para oscurecer los cinco mil leucocitos nucleados presentes en ese microlitro de sangre humana representativo.

Ejemplos

45 El método actual para determinar la concentración y el diferencial de Glóbulos Blancos (WBC) en el analizador hematológico CELL-DYN Sapphire® requiere la lisis de glóbulos rojos (RBC). Un agente de lisis, la saponina, es un componente del reactivo de la parte A de WBC. En muestras normales, este agente es eficaz para lisar los RBC, por lo que la concentración y el diferencial de WBC son precisos. Sin embargo, algunos datos demográficos (neonatales/pediátricos) y patologías (anemia falciforme, enfermedad hepática) pueden provocar cambios en los RBC que los hacen resistentes al agente de lisis. Cuando esto ocurre, la concentración aparente de WBC, la concentración de linfocitos y el porcentaje de linfocitos pueden elevarse falsamente. Si se detecta esta afección, los WBC y los resultados diferenciales en el informe del paciente se invalidan y se establece la marca "RBC resistente" (rRBC). A continuación se describe un algoritmo para detectar rRBC.

55 1. Algoritmo de marcaje de rRBC

El algoritmo de marcaje de rRBC utiliza uno o más criterios para determinar si se debe establecer la marca. Los criterios son:

- 60
- 1) Disminución de la tasa de recuento total de células durante un primer período establecido del ensayo de WBC, p.ej., "los primeros 9 segundos".
 - 2) Disminución de la tasa de recuento de linfocitos ("linf") sobre el ensayo WBC. Se utilizan los eventos de linf del archivo FCS, hasta la marca de tiempo 1126 después de la hora de inicio. (En esta realización, las marcas de tiempo del modo lista de archivos FCS están separadas por 8 milisegundos (ms); intervalos de 8 ms * 1126 ~ 9 segundos).
- 65

Para todos los siguientes criterios, se utiliza todo el conjunto de datos del modo lista.

- 3) Posición de población de linfocitos del aparato en el espacio (IAS, ALL) en comparación con una mediana estimada de los últimos 51 pacientes normales en la selección de ensayo de CBC o CBC+RETC (una selección de ensayo configura el analizador para ejecutar una determinada combinación de ensayos; la selección de ensayo CBC, por ejemplo, incluye, entre otros, la ejecución del ensayo de RBCi y el ensayo de WBC con resistencia a la lisis convencional; la selección de ensayo de CBC+RETC incluye adicionalmente el ensayo de RETC).
- 4) Proporción de linfocitos dentro del área esperada del diagrama de dispersión a linfocitos en áreas vecinas.
- 5) Distribución de linfocitos en DSS. Las muestras de leucemia linfocítica normal y crónica (CLL) tienen una distribución más estrecha con menor sesgo.
- 6) Número de recuentos en el contenedor cero en DSS. Una muestra de rRBC tiene más recuentos en este recipiente que una muestra normal.

El algoritmo de marcaje de rRBC se ejecuta antes de ejecutar el algoritmo RBC nucleado (NRBC). El algoritmo NRBC a veces puede cambiar la clasificación de eventos de linf a NRBC y viceversa. Todos los eventos que se ven afectados por el algoritmo NRBC son positivos en FL3. El algoritmo rRBC está principalmente relacionado con partículas rRBC que son débiles en FL3 y, por lo tanto, pueden no ser consideradas por el algoritmo NRBC. El objetivo del algoritmo rRBC es emitir una marca invalidante si hay una fuerte evidencia de que están presentes las partículas de rRBC.

Además de las medidas directas para determinar la presencia de rRBC, el algoritmo comprueba el recuento final de WBC al observar un recuento de WBC estimado del ensayo RBCi y el ensayo RETC, si forma parte de la selección de ensayo para la muestra en cuestión.

2. Datos para la calibración

Todos los datos utilizados para desarrollar y someter a ensayo el algoritmo se recopilaron en 14 analizadores ubicados en Japón y 3 analizadores ubicados en los Países Bajos.

Los datos de dos analizadores se utilizaron para determinar los valores normales para todos los criterios de marcaje de rRBC. Los datos para 1031 muestras normales se recogieron utilizando un analizador en los Países Bajos, y se recogieron datos para 2063 muestras utilizando otro analizador en Japón. Los criterios para las muestras normales fueron:

- Tipo de espécimen = paciente
- Sin datos invalidados
- Resultados numéricos dentro de los siguientes intervalos:

3,9	<	WBC	<	10,0	k/ μ L
38,0	<	%NEU	<	80,0	
15,0	<	%LYM	<	40,0	
0,0	<	%MON	<	13,0	
4,2	<	RBC	<	5,7	M/ μ L
2,36	<	MCV	<	2,87	L
11,0	<	RDW	<	15,0	%CV
140,0	<	PLT	<	390,0	k/ μ L
13,2	<	HGB	<	16,9	g/dL

3. Criterios del algoritmo

3.1 Pendiente de la tasa total de recuento

Durante la porción de WBC de un ciclo de ensayo, el sistema CELL-DYN Sapphire® registra el número total de eventos (señales que califican en función de la configuración triple del activador) en el contador del equipo. A intervalos de 100 milisegundos (ms), el recuento de eventos totales acumulados se captura para formar una serie de datos conocida como datos de recuento de eventos del equipo de WBC, que se denominará aquí "datos de recuento total" (donde el total se refiere a la totalidad de WBC, en oposición a subpoblaciones de los mismos, tales como, por ejemplo, linfocitos). La porción de WBC de un ciclo de ensayo varía en duración de acuerdo con la selección de ensayo, pero es de al menos 9 segundos de duración en todos los casos.

El criterio de pendiente de la tasa de recuento total se basa en los primeros 9 segundos de los datos del recuento total. En estos datos, se busca una tasa decreciente: se traza una pendiente significativamente negativa cuando el recuento total instantáneo (delta entre los valores sucesivos de datos de recuento total) frente a los intervalos incrementales de 100 ms. La pendiente de un ajuste rectilíneo a través de los datos instantáneos de recuento total de 9 segundos debe ser significativamente menor que cero. El umbral real (que se interpreta como 'significativo') antes de generar una puntuación proviene de la distribución de muestras normales en el conjunto de datos de desarrollo del algoritmo. Las muestras normales tienen una pendiente de datos de recuento total de WBC de $0,02 \pm 0,03$ (media \pm desviación típica). El algoritmo utiliza el nivel de 3-sigma por debajo de la media normal de las células de referencia, $-0,07$, como el umbral por debajo del cual se acumula la puntuación de contribución del criterio de pendiente de la tasa de recuento total. Esto se ilustra en la Fig. 2.

Para cada muestra medida, el algoritmo utiliza un ajuste rectilíneo para obtener la pendiente y su desviación típica, o sigma, una medida de la incertidumbre del valor de la pendiente. El algoritmo utiliza la pendiente más 3 veces su sigma como el valor utilizado para la pendiente de la tasa de recuento total para comparar con el umbral. El algoritmo normaliza la pendiente por el número total de recuentos del equipo. La puntuación para este criterio es proporcional a la diferencia entre la pendiente final y el valor umbral, si la pendiente final es más negativa que el umbral, y cero si la pendiente final no es más negativa que el umbral.

El gráfico de la Fig. 3 muestra todas las pendientes de recuento total para muestras normales en un conjunto de entrenamiento y el umbral por debajo del cual se acumula una puntuación de rRBC. Hay algunas muestras por debajo del umbral, que acumularán una puntuación de rRBC.

3.2 Pendiente de la tasa de recuento de linfocitos

La pendiente total incluye todos los eventos contados, incluidos los neutrófilos y los glóbulos rojos (RBC) supervivientes, que hacen que la pendiente no sea tan sensible para detectar la interferencia de RBC en los linfocitos. La pendiente total puede ser negativa debido a eventos de rRBC que ya se han clasificado como RCB (y por lo tanto no interfieren en el recuento de linfocitos ni en el recuento de leucocitos). Por otro lado, la pendiente total puede ser cercana a cero debido, por ejemplo, a altos porcentajes de neutrófilos u otra población celular, incluso mientras los rRBC alteran el recuento de linfocitos. Por lo tanto, el algoritmo está interesado en cuál es la pendiente de la tasa de recuento para los eventos clasificados como linfocitos. El algoritmo toma esos eventos y utiliza la variable de tiempo en los datos de FCS para crear un histograma de tasa de recuento solo para los linfocitos. En esta realización, cada marca de tiempo en el archivo FCS es 8 ms. Se utiliza un intervalo de 0-1125 marcas de tiempo, lo que corresponde a un total de 9 segundos. Esos 9 segundos de datos de linf en modo lista se categorizan en 30 categorías y se determina una tasa de recuento de linf para cada categoría. Luego se coloca una línea en todas las categorías (excluyendo aquellas que contienen recuentos de cero para evitar sesgos espurios del ajuste).

Las muestras normales tienen una pendiente de linf de $0,04 \pm 0,15$; el algoritmo utiliza el nivel 3-sigma por debajo de la media normal, es decir, $-0,41$, como umbral. Se estima la pendiente para cada muestra y se agregan tres desviaciones típicas del ajuste de la línea de muestra a la pendiente estimada de la muestra. Finalmente, la pendiente de la muestra de linf se normaliza por el número total de linfocitos. Esto se muestra en la Fig. 4.

3.3 Posiciones de linfocitos

Los dos controles posicionales de linfocitos apuntan a detectar una población de rRBC que se fusiona y se cuenta junto con los linfocitos. A menudo, la contaminación por rRBC cambia la ubicación de la población de linf. El primer control posicional analiza la posición media en ALL e IAS de toda la población de linfocitos.

3.3.1 Historial de valores medios de linfocitos

Las posiciones de linf (es decir, los números de los intervalos de ALL e IAS de la media de todos los eventos de linfocitos para cada muestra) se rastrean en las 51 muestras normales más recientes. Todas las muestras que entran en el conjunto de 51 deben cumplir todos los criterios siguientes:

- Tipo de muestra = paciente
- Selección de ensayo = CBC o CBC + RETC
- No hay marcas de linf
- Resultados numéricos dentro de los siguientes intervalos:

3,9	<	WBC	<	10,0	k/ μ L
38,0	<	%NEU	<	80,0	
15,0	<	%LYM	<	40,0	
0,0	<	%MON	<	13,0	

Obsérvese que el resto de los resultados del hemograma no se utilizan aquí debido a que solo los resultados del WBC están disponibles para el algoritmo en el momento en que se utiliza y actualiza el historial de posición de linf.

5 Para una muestra ejecutada en las selecciones de ensayo de CBC y CBC+RETC, la mediana de cada historial (ALL e IAS) se calcula y se utiliza para compararla con la muestra actual. Para una muestra ejecutada en selecciones de ensayo CBC+RETC+R y CBC+R (la selección de ensayo CBC+RETC+R es análoga a la selección de ensayo CBC+RETC, excepto que el ensayo WBC se ejecuta con una fuerza lítica mayor; la selección de ensayo CBC+R es análoga a la selección de ensayo, excepto que el ensayo WBC se ejecuta con una fuerza lítica aún mayor que en la
10 selección de ensayo CBC+RETC+R), el algoritmo resta 9 categorías (en una escala de 256 categorías) de la mediana de ALL almacenada y 14 categorías (también en una escala de 256 categorías) de la mediana de IAS almacenada. La diferencia se debe a las diferencias en las posiciones medias de ALL e IAS de linf entre las selecciones de ensayo de nivel de lisis normal (CBC, CBC+RETC) y la selección de ensayo de nivel de lisis más alta (CBC+RETC+R, CBC+R) . El algoritmo solo rastrea las posiciones en las selecciones de ensayo de CBC y
15 CBC+RETC debido a que las otras selecciones de ensayo no se utilizan con tanta frecuencia.

El archivo de historial de ubicación de la media de linfocitos consta de 51 pares de valores medios de ALL e IAS. Los valores medios del historial de IAS media y del historial de ALL media también se almacenan en el archivo de historial. Las medianas se calculan de forma independiente en IAS y ALL. Por lo tanto, el valor de la mediana en IAS
20 puede verse afectado de manera diferente al valor de la mediana en ALL a medida que el archivo de historial se actualiza progresivamente.

Cuando el archivo de configuración del historial de linfocitos no existe durante la instalación o el inicio del soporte lógico (o después de ciertos eventos de servicio), el archivo de configuración del historial de ubicaciones de linfocitos
25 se crea utilizando el soporte de archivos de configuración existente del soporte lógico de la estación de datos. Los valores predeterminados para ALL e IAS se establecen en los valores posicionales predeterminados actuales de ALL e IAS, respectivamente. Los valores predeterminados de las categorías son ALL linf = 100 e IAS linf = 75 (ambos en una escala de 256 categorías).

30 Los pares de valores medios de ALL o IAS se restablecen a los valores de posición predeterminados actuales (valores para ALL e IAS) si se realiza alguna de las siguientes acciones:

- a) se ejecuta una muestra después de que los puntos de ajuste de Ganancia Pre-Amp o Ganancia de Amplificación de ALL o IAS para WBC óptico se cambien y se activen;
- 35 b) se ejecuta una muestra después de que se cambien los valores de posición predeterminados para IAS o ALL.

Los valores medios de localización de linfocitos se calculan para cada ejecución de ensayo de WBC. Si el tipo de muestra es Paciente (es decir, antecedentes y otras pruebas especiales excluidas) y la selección de ensayo es CBC
40 o CBC+RETC sin errores para los datos notificables de linfocitos, los valores medios actuales de linfocitos se almacenan en el archivo de configuración media de historial de linfocitos. Una vez que se llenan los 51 pares, se elimina el par más antiguo, siguiendo el formato primero en entrar, primero en salir.

45 Las medianas de los valores medios de linfocitos del archivo de historial se almacenan en el encabezado del archivo FCS.

3.3.2 Distancia geométrica de los linfocitos

El algoritmo compara las posiciones de linf., en el espacio (IAS, ALL), de cualquier muestra dada con la mediana de las últimas 51 muestras normales. El primer ensayo es el valor de la distancia euclidiana entre la ubicación mediana
50 en el espacio (IAS, ALL) del archivo de historial y la ubicación de la posición de linf de la muestra actual (es decir, la posición media, en IAS y ALL, de todos los eventos de linf en la muestra actual). La Figura 5 es la distribución de esta distancia para las muestras normales del conjunto de entrenamiento. El umbral es 4,0, que es una aproximación a la media del conjunto (1,1) más el nivel 3-sigma (0,8). Todos los cálculos de distancia se realizan en
55 una escala de 64 categorías para limitar el uso de la memoria. Esto conduce a una resolución bastante baja, que es visible en la distribución de los datos.

Otras opciones para la implementación incluyen el empleo de canales de detección adicionales junto a ALL e IAS (p.ej., PSS, DSS o canales de fluorescencia) para describir las posiciones de los linfocitos en el espacio
60 multidimensional; en este caso, la distancia geométrica entre la posición de la mediana de los linfocitos de referencia y la posición de los linfocitos de la muestra de ensayo se calcula nuevamente como una distancia euclídea, pero en tantas dimensiones como el número de canales de detección empleados para describir tales posiciones.

3.4 Índice de recuento del recuadro de linfocitos

El segundo ensayo basado en la información de la posición de linf compara los recuentos en un recuadro donde normalmente se espera que los linfocitos estén con los recuentos en una serie de recuadros alrededor de la posición de linf esperada. En la Fig. 5, se ilustran los recuadros y posiciones relevantes. Todas las esquinas del recuadro que son ajustables están marcadas con un punto sólido. Los otros límites del recuadro se ajustan solo para seguir las esquinas ajustables. La ubicación mediana del historial de las medias de linf, según lo rastreado por las últimas 51 normales. Para mostrar cómo se mueven los otros recuadros cuando se mueve la ubicación media de linf, los autores de la presente invención muestran una segunda ubicación mediana de linf marcada con un punto de color verde. Las 4 esquinas del recuadro de linfocitos "verdaderos" (esperados) se calculan a partir de la ubicación de la mediana, convertida a un valor en una escala de 64 categorías para limitar el uso de memoria, sumando o restando 3,0 (también en una escala de 64 categorías) IAS y 4,2 (nuevamente en una escala de 64 categorías) en ALL. Esos números son los valores 3-sigma de la distribución de normales en IAS y ALL del conjunto de muestras de desarrollo del algoritmo. Esto determina la ubicación esperada del recuadro de linfocitos, que se muestra en color negro.

La razón de puntuación del recuadro es el recuento de linfocitos en los recuadros de color azul (linfocito "no verdadero") dividido por el recuento en el recuadro de color negro (linfocito "verdadero"). Esto se ilustra en la Fig. 6.

Los dos analizadores utilizados para establecer el umbral de criterio muestran una distribución notablemente diferente de las proporciones de recuento de recuadros. El analizador 42841AZ tiene proporciones de no linfocitos a linfocitos constantemente mayores que el analizador 42121AZ. Esto es muy probablemente debido a una diferencia en la alineación óptica entre los dos analizadores en el conjunto de entrenamiento. El analizador 42841AZ tiene más poblaciones diseminadas, lo que da como resultado más recuentos en los recuadros que no contienen linfocitos. Se verificaron otros analizadores y se encontró que el analizador 42841AZ tiene una relación promedio de recuento de recuadros más alta que la mayoría. Por lo tanto, el valor umbral se basó en su rendimiento, para evitar el marcaje excesivo en analizadores con un rendimiento similar. La media y la desviación típica de la distribución de las proporciones de recuento de recuadros para el analizador 42841AZ son 0,39 y 0,11, respectivamente. El valor umbral del algoritmo se estableció en 0,8, que es una aproximación del valor medio más 3-sigma. Esto se ilustra en la Fig. 7.

3.5 DSS

Se empleó un histograma de DSS lineal de los eventos de linfocitos. Este histograma se analiza para determinar su mediana, SD robusta ($rSD = \text{mediana}(|x - \text{mediana}(x)|)$), y los percentiles 10 y 90. También se utilizan los recuentos normalizados en la categoría cero (es decir, el número de eventos clasificados en la primera categoría de digitalización del intervalo disponible, graduado por el número total de eventos en la distribución). En la Figura 8 se muestra el histograma de DSS para muestras de CLL conocidas, normales y rRBC.

Los histogramas muestran que:

- la muestra de rRBC tiene una distribución mucho más amplia;
- la muestra de rRBC tiene mayor sesgo; y
- la muestra de rRBC tiene un mayor número normalizado de recuentos en la categoría cero.

3.5.1 Amplitud y sesgo de la distribución de DSS

La amplitud de la distribución se parametriza mediante la medida robusta de CV (rCV), definida como $rCV = (100 * rSD / \text{mediana})$. La medida de asimetría es sesgo = $(2 * \text{mediana} - \text{percentil } 10 - \text{percentil } 90)$. Utilizando esos dos números, el algoritmo calcula la primera puntuación para la sección de DSS: Ésta es la distancia geométrica de una línea en el espacio (sesgo, rCV). El valor numérico para esta distancia es $d = (0,4 * \text{sesgo} + rCV - 25)$. En el gráfico de la Fig. 9, la línea se muestra junto con los conjuntos de muestras normal, positivo y negativo.

En la Fig. 10 se muestran los valores para d para el conjunto de muestras normales. La media y la SD para este conjunto de muestra normal son -6,6 y 2,2, respectivamente, lo que lleva a un umbral de cero.

3.5.2 Medida de la categoría cero de DSS

La segunda medida de DSS es una medida basada en los recuentos de eventos en la categoría cero de DSS. La medida de la categoría cero es "categoría cero a escala" = $[\text{recuentos de la categoría cero} * \text{mediana} * \text{mediana} / (\text{recuento total de linfocitos})]$. El escalamiento mediante la mediana es un intento de corregir los cambios en la categoría cero simplemente atribuibles a los cambios de ganancia, o derivaciones medias, en DSS. Otras opciones de escalamiento son posibles e incluyen, además, la contabilización de la desviación típica de la distribución de DSS para modelar con mayor precisión el cambio previsto en el valor de la categoría cero debido únicamente a los cambios de ganancia.

La mediana y la desviación típica para la medida de la categoría cero en el analizador 42121AZ son 0 y 3,3, respectivamente, lo que da como resultado un umbral de aproximadamente 10. Debido a que con este umbral se observó que la medida de la categoría cero causaba resultados falsos positivos más probablemente que las otras cinco medidas, se estableció un segundo umbral de 20. Para cualquier muestra que dé como resultado un valor de categoría cero graduado por debajo de 10, el criterio no contribuye a la puntuación general para la marca de rRBC. Entre 10 y 20, el criterio contribuye a la puntuación general, pero no al recuento general de los criterios cumplidos. Por encima de 20, el criterio contribuye a la puntuación y al recuento general de criterios cumplidos.

En la Figura 11, se muestran los valores de la categoría Cero a escala para los conjuntos de muestras normales. El analizador 42121AZ tiene muchas menos normales que el analizador 42841, e incluso esas muestras llamadas normales pueden incluir algunos rRBC. La muestra que tiene una puntuación de 70 en la medida de la categoría cero acumula más puntuación de otro criterio y activan realmente la marca de rRBC.

4. Puntuación combinada

Las puntuaciones de los seis criterios detallados anteriormente se multiplican por sus pesos respectivos y a continuación se suman para la puntuación final. Los pesos se han determinado identificando 100 muestras positivas y 100 negativas y a continuación optimizando los pesos para maximizar el número de clasificaciones correctas.

Característica	Peso
Pendiente HW	122,5
Pendiente de Linf	404,8
Posición Máxima de Linf	16,0
Recuento de Recuadros de Linf	36,6
CV y sesgo de DSS	Núm. de linfocitos/200
Categoría Cero de DSS	1,0

El ensayo final de los pesos se realiza ejecutando el algoritmo en grandes conjuntos de datos y comparando los resultados con otro algoritmo de marcaje de rRBC. Esto se ha realizado exhaustivamente y los resultados muestran convincentemente que el nuevo algoritmo funciona mejor que el otro algoritmo.

5. Mecanismos de activación

Este algoritmo requiere que al menos dos criterios estén por encima de sus respectivos umbrales. A continuación, el algoritmo calcula la puntuación combinada como se indicó anteriormente, y la marca se establecerá si se alcanza una puntuación ponderada superior a 85. La marca también se establecerá, independientemente de la puntuación general, si 3 o más criterios están por encima de sus respectivos umbrales.

6. Puntuaciones para todas las muestras normales

El gráfico de la Fig. 12 muestra las puntuaciones de rRBC para todas las muestras normales. Todas las puntuaciones son cero excepto cinco muestras. Una de las cinco muestras acumuló suficientes puntuaciones para activar la marca de rRBC.

7. Verificación cruzada de RBCi

El histograma RBC de impedancia (modo lista) contiene principalmente WBC en su última categoría. La verificación cruzada asegura que la razón WBC/RBC, que puede obtenerse del histograma de impedancia, no es mucho menor que la obtenida utilizando la concentración de WBC del ensayo de WBC y la concentración de RBC a partir de los recuentos de impedancia. El número de RBC en la última categoría aumenta a medida que aumenta el MCV de los RBC. Por lo tanto, el algoritmo solo utiliza el histograma de RBC como verificación cruzada si el MCV es menor que 2,96 L. Para las muestras con un MCV menor, la contribución de RBC a la última categoría se estima como $(MCV - 83) * 0,7$ recuentos normalizados. No hay contribución si el MCV es menor que 83. El algoritmo realiza una estimación del número de WBC en el histograma de RBC y compara ese número con el número de WBC referido. Si el número del histograma RBC es considerablemente más bajo que el número del ensayo de WBC, se eleva la marca de rRBC. A medida que aumenta el MCV, aumenta el listón de la marca. La verificación cruzada de RBCi nunca borra la marca de rRBC.

Otras opciones para la implementación incluyen el uso de la amplitud de distribución de los glóbulos rojos (tamaño)

medidos, RDW, como un parámetro en la verificación cruzada además del MCV; dado que un RDW grande podría poblar la última categoría con eventos de RBC, la verificación cruzada incluiría un umbral de RDW, que se debe utilizar junto con el valor de MCV medido, para determinar la probabilidad de que los RBC estén presentes en la última categoría y solo activando la verificación cruzada si la probabilidad es suficientemente baja. Otra opción es utilizar una pluralidad de categorías superiores del histograma RBCi para estimar el número de WBC.

8. Verificación cruzada de RETC

El algoritmo RETC separa WBC, RBC y PLT en función de los patrones de dispersión en FL1 vs. IAS. La verificación cruzada utiliza la razón de los eventos de WBC a eventos de RBC en el ensayo RETC, que se compara con la razón de la concentración de WBC a la concentración de RBC del ensayo CBC. Si la razón del ensayo RETC es significativamente menor que el número del ensayo CBC, se eleva la marca de rRBC en el ensayo CBC.

El algoritmo RETC utiliza el recuento de modo lista de RBC (del ensayo RBCi) y el recuento de modo lista WBC (del ensayo WBC). La verificación cruzada de rRBC en el algoritmo RETC calcula el límite superior del recuento del modo lista de WBC tomando el número n de eventos de modo lista de WBC, calculando su sigma como \sqrt{n} , y a continuación agregando 3 sigma a la cantidad de eventos de modo lista de WBC. Este aumento del número de eventos de modo lista de WBC se utiliza para calcular la razón de WBC/RBC. Se pretende que sea un límite superior para la razón real de WBC/RBC. Esta razón se denomina WR_RETC. La razón CBC WBC/RBC (que sería susceptible de contar de manera excesiva los WBC si están presentes rRBC no detectados) se denomina WR_CBC.

El algoritmo calcula la razón de diferencia $D = 100 * (WR_CBC - WR_RETC)/(WR_CBC + WR_RETC)$. Si D es mayor que 50, se establece la marca de rRBC. Esta elección del límite en D significa que la razón CBC WBC/RBC debe ser al menos 3 veces mayor que el límite superior de la razón RETC WBC/RBC antes de que se establezca la marca de rRBC.

9. Coeficientes de segundo orden

Las Figuras 13A-13C ilustran cómo se puede utilizar el signo del coeficiente de segundo orden de la línea de mejor ajuste para determinar si una muestra contiene rRBC o fWBC. La Figura 13A muestra un gráfico que ilustra la disminución en el número total de células antes, durante y después del período en el que se lisan los glóbulos rojos, y adicionalmente antes, durante y después del período en que se lisan los glóbulos blancos. Después de la adición del agente eritrolítico, los glóbulos rojos se lisan en el período de tiempo indicado por las líneas de color rojo verticales. Después de un período en el que los glóbulos blancos no se lisan (en el período entre la línea de color rojo vertical derecha y la línea de color azul vertical izquierda), los glóbulos blancos comienzan a lisarse (en el período de tiempo entre las líneas de color azul verticales). La Fig. 13B ilustra la disminución en el número total de células en el período de tiempo en el que los RBC son lisados. En este período, la línea de mejor ajuste tiene un coeficiente positivo de segundo orden (es decir, la tasa de disminución del número de células está disminuyendo). La Fig. 13C ilustra la disminución del número total de células en el período de tiempo en el que los glóbulos blancos son lisados. En este período, la línea de mejor ajuste tiene un coeficiente negativo de segundo orden (es decir, la tasa de disminución del número de células está aumentando).

REIVINDICACIONES

1. Un analizador hematológico que comprende:

- 5 a) una celda de flujo (28);
- b) una fuente de luz (12) para dirigir la luz a dicha celda de flujo (28);
- c) una pluralidad de detectores (32, 34, 3, 6, 38) para detectar una pluralidad de características ópticas de una muestra de sangre que pasa a través de dicha celda de flujo; y
- 10 d) una estación de trabajo de análisis de datos que comprende un procesador, en donde el procesador comprende un medio físico legible por ordenador programado con instrucciones que, cuando son ejecutadas por el procesador, hacen que el analizador hematológico:

- i) pase la muestra de sangre a través de la celda de flujo (28) y dirija la fuente de luz (12) a la celda de flujo para generar una pluralidad de datos ópticos utilizando la pluralidad de detectores (32, 34, 36, 38);
- 15 ii) analice los datos ópticos para determinar uno o más valores para la muestra de sangre, en donde el valor se selecciona del grupo que comprende: una distancia geométrica de linfocitos, en donde la distancia geométrica de linfocitos se basa en una medición media de pérdida de luz axial (ALL) y una medición media de la dispersión del ángulo intermedio (IAS) de una célula en la muestra de sangre que se clasifica como un linfocito, razón de recuento del recuadro de linfocitos, en donde la razón de recuento del recuadro de linfocitos comprende un valor que es el inverso de la razón de: (A) el número de células clasificadas como linfocitos en la muestra de sangre como se define por un límite de ALL predeterminado y un límite de IAS predeterminado; dividido por (B) el número de células clasificadas como linfocitos en la muestra de sangre definida por un límite de ALL predeterminado que es adyacente al límite de ALL en (A) y un límite de IAS predeterminado que es adyacente al límite de IAS en (A), o un valor de dispersión lateral despolarizada (DSS) de linfocitos; y
- 20 iii) calcular la diferencia entre cada valor y un criterio de referencia que se basa en datos obtenidos de una pluralidad de muestras de referencia, en donde si el valor difiere del criterio de referencia en una cantidad predeterminada, la muestra de sangre se marca por contener glóbulos rojos resistentes a la lisis (rRBC) o glóbulos blancos frágiles (fWBC).

2. El analizador hematológico de la reivindicación 1, en donde dicha pluralidad de detectores comprende uno o más detectores de pérdida de luz axial (ALL) (32a), un detector de dispersión de ángulo intermedio (IAS) (32b) y un detector de dispersión lateral despolarizada (DSS) (34).

35 3. El analizador hematológico de la reivindicación 1, en donde dicho criterio de referencia es un criterio estático.

4. El analizador hematológico de la reivindicación 3, en donde el criterio estático se basa en datos obtenidos a partir de varias muestras de referencia que varían de 5 a 100.000.

40 5. El analizador hematológico de la reivindicación 4, en donde las muestras de referencia se ejecutaron previamente en un analizador hematológico diferente.

6. El analizador hematológico de la reivindicación 1, en donde el criterio de referencia es un criterio continuamente actualizado que se actualiza cada vez que se analiza una muestra normal mediante el analizador hematológico.

45 7. El analizador hematológico de la reivindicación 6, en donde dicho criterio continuamente actualizado se basa en datos obtenidos a partir de varias de muestras normales que varían de 5 a 10.000.

50 8. El analizador hematológico de la reivindicación 7, en donde dicha pluralidad de muestras normales comprende al menos 50 muestras normales.

9. El analizador hematológico de la reivindicación 1, donde el método comprende adicionalmente la determinación de un valor para (a) una tasa de disminución del número total de células en la muestra de sangre durante un período de tiempo o (b) una tasa de disminución del número de células en la muestra de sangre clasificada como linfocitos durante un período de tiempo y en donde la diferencia entre el valor de (a) o (b) y los criterios de referencia correspondientes indica una tasa decreciente de disminución del número total de células o células clasificadas como linfocitos en la muestra de sangre, y en donde la tasa decreciente indica que la muestra de sangre contiene rRBC,

55 10. El analizador hematológico de la reivindicación 1, donde el método comprende adicionalmente la determinación de un valor para (a) una tasa de disminución del número total de células en la muestra de sangre durante un período de tiempo o (b) una tasa de disminución del número de células en la muestra de sangre clasificada como linfocitos durante un período de tiempo y en donde la diferencia entre el valor de (a) o (b) y los correspondientes criterios de referencia indica una tasa creciente de disminución del número total de células o células clasificadas como linfocitos en la muestra de sangre; y en donde la tasa creciente indica que la muestra de sangre contiene fWBC.

60 11. El analizador hematológico de la reivindicación 1, donde uno o más valores comprenden una distancia

geométrica de linfocitos que se basa en una medición ALL media y una medición de IAS media de una célula en la muestra de sangre que se clasifica como un linfocito, y en donde los uno o más criterios de referencia correspondientes comprenden una mediana de las mediciones de ALL media y de IAS media en una pluralidad de muestras de referencia.

5 12. El analizador hematológico de la reivindicación 1, en donde los uno o más valores comprenden una razón de recuento del recuadro de linfocitos que es la inversa de la razón de:

(A) el número de células clasificadas como linfocitos en la muestra de sangre como se define por un límite predeterminado de ALL y un límite predeterminado de IAS; dividido por

(B) el número de células clasificadas como linfocitos en la muestra de sangre como se define por un límite predeterminado de ALL que es adyacente al límite ALL en (A) y un límite predeterminado de IAS que es adyacente al límite de IAS en (A); y en donde un criterio de referencia se basa en el inverso de la razón de:

(C) el número de células clasificadas como linfocitos en una pluralidad de muestras de referencia como se define por un límite predeterminado de ALL y un límite predeterminado de IAS; dividido por

(D) el número de células clasificadas como linfocitos en una pluralidad de muestras de referencia como se define por un límite predeterminado de ALL que es adyacente al límite de ALL en (C) y un límite predeterminado de IAS que es adyacente al límite de IAS en (C).

13. El analizador hematológico de la reivindicación 1, donde los uno o más valores comprenden un valor de DSS de linfocito que se basa en una medición de dispersión lateral despolarizada (DSS) de una distribución de células en la muestra de sangre que se clasifican como linfocitos, y en donde los uno o más criterios de referencia correspondientes se basan en una distribución de DSS y un sesgo de DSS para una pluralidad de muestras de referencia.

14. Un método para marcar una muestra de sangre que contiene glóbulos rojos resistentes a la lisis o glóbulos blancos frágiles, que comprende:

(i) pasar la muestra de sangre a través de una celda de flujo de un analizador hematológico para generar una pluralidad de datos ópticos utilizando una pluralidad de detectores para detectar una pluralidad de características ópticas de la muestra de sangre, en donde el analizador hematológico comprende una fuente de luz para dirigir la luz a la celda de flujo;

(ii) analizar los datos ópticos para determinar uno o más valores para la muestra de sangre, en donde el valor se selecciona del grupo que comprende: una distancia geométrica de linfocitos, en donde la distancia geométrica de linfocitos se basa en una medición media de pérdida de luz axial (ALL) y una medición media de dispersión de ángulo intermedio (IAS) de una célula en la muestra de sangre que se clasifica como un linfocito, una razón de recuento del recuadro de linfocitos, en donde la razón de recuento del recuadro de linfocitos comprende un valor que es el inverso de la razón de: (A) el número de células clasificadas como linfocitos en la muestra de sangre como se define por un límite predeterminado de ALL y un límite predeterminado de IAS; dividido por (B) el número de células clasificadas como linfocitos en la muestra de sangre como se define por un límite predeterminado de ALL que es adyacente al límite de ALL en (A) y un límite predeterminado de IAS que es adyacente al límite de IAS en (A), o un valor de dispersión lateral despolarizada (DSS) de linfocitos; y

(iii) calcular la diferencia entre cada valor y un criterio de referencia que se basa en datos obtenidos de una pluralidad de muestras de referencia, en donde si el valor difiere del criterio de referencia en una cantidad predeterminada, la muestra de sangre se marca por contener glóbulos rojos resistentes a la lisis o glóbulos blancos frágiles.

15. Un medio físico legible por ordenador para su uso en un analizador hematológico, que comprende programación para; marcar una muestra de sangre por contener glóbulos rojos resistentes a la lisis o glóbulos blancos frágiles de la siguiente manera:

(i) pasar la muestra de sangre a través de una celda de flujo de un analizador hematológico para generar una pluralidad de datos ópticos utilizando una pluralidad de detectores para detectar una pluralidad de características ópticas de la muestra de sangre, donde el analizador hematológico comprende una fuente de luz para dirigir la luz a la celda de flujo;

(ii) analizar los datos ópticos para determinar uno o más valores para la muestra de sangre, en donde el valor se selecciona del grupo que comprende: una distancia geométrica de linfocitos, en donde la distancia geométrica de linfocitos se basa en una medición media de pérdida de luz axial (ALL) y una medición media de dispersión de ángulo intermedio (IAS) de una célula en la muestra de sangre que se clasifica como un linfocito, una razón de recuento del recuadro de linfocitos, en donde la razón de recuento del recuadro de linfocitos comprende un valor que es el inverso de la razón de: (A) el número de células clasificadas como linfocitos en la muestra de sangre como se define por un límite predeterminado de ALL y un límite predeterminado de IAS; dividido por (B) el número de células clasificadas como linfocitos en la muestra de

sangre como se define por un límite predeterminado de ALL que es adyacente al límite de ALL en (A) y un límite predeterminado de IAS que es adyacente al límite de IAS en (A), o un valor de dispersión lateral despolarizada (DSS) de linfocitos; y

- 5 (iii) calcular la diferencia entre cada valor y un criterio de referencia que se basa en datos obtenidos de una pluralidad de muestras de referencia, en donde si el valor difiere del criterio de referencia en una cantidad predeterminada, la muestra de sangre se marca por contener glóbulos rojos resistentes a la lisis o glóbulos blancos frágiles.

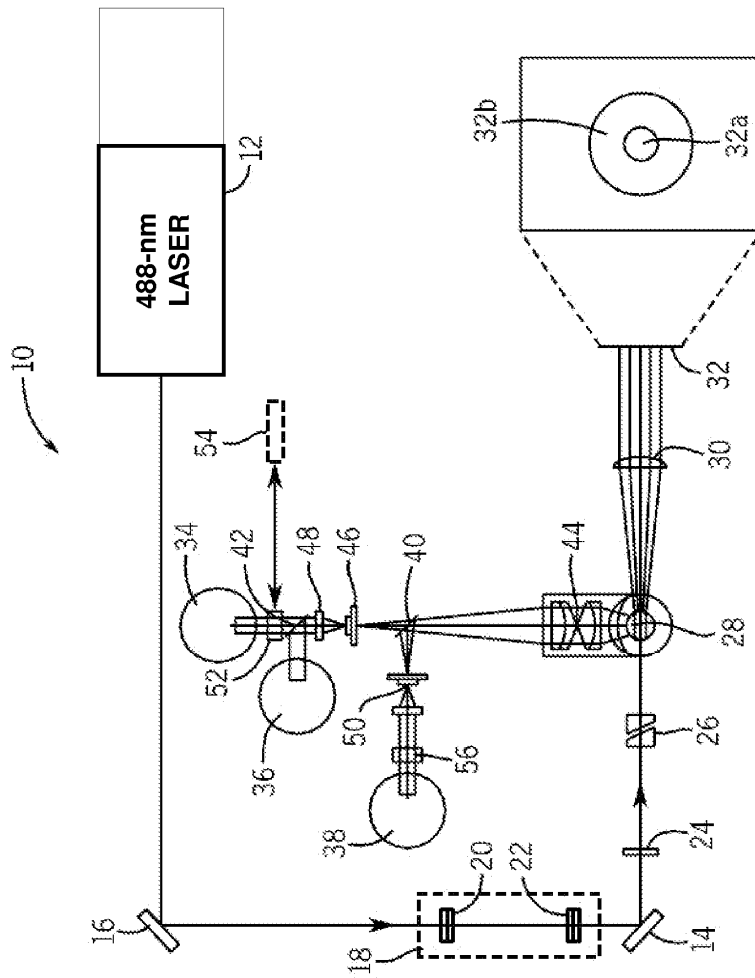


Fig. 1

Ejemplo de una muestra que genera una puntuación de pendiente que contribuirá a la determinación del marcaje de rstrBC

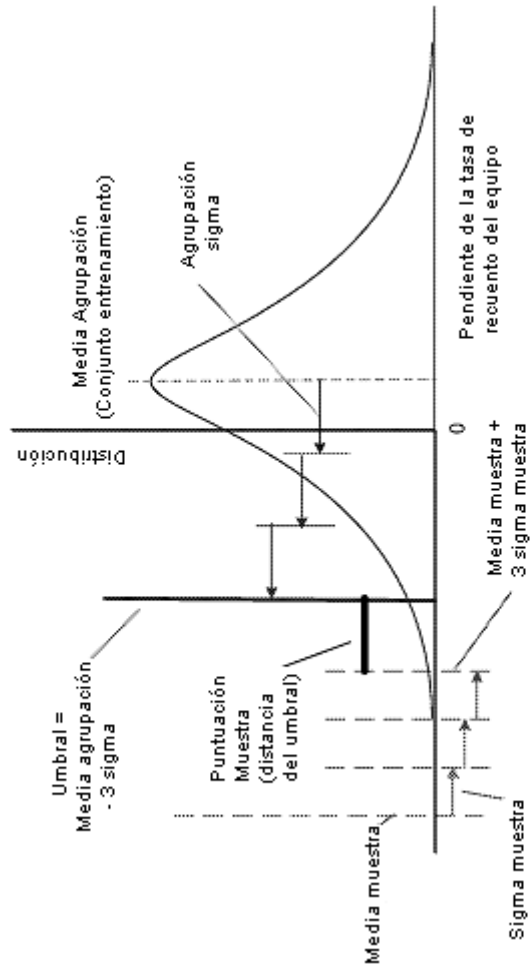


Fig. 2

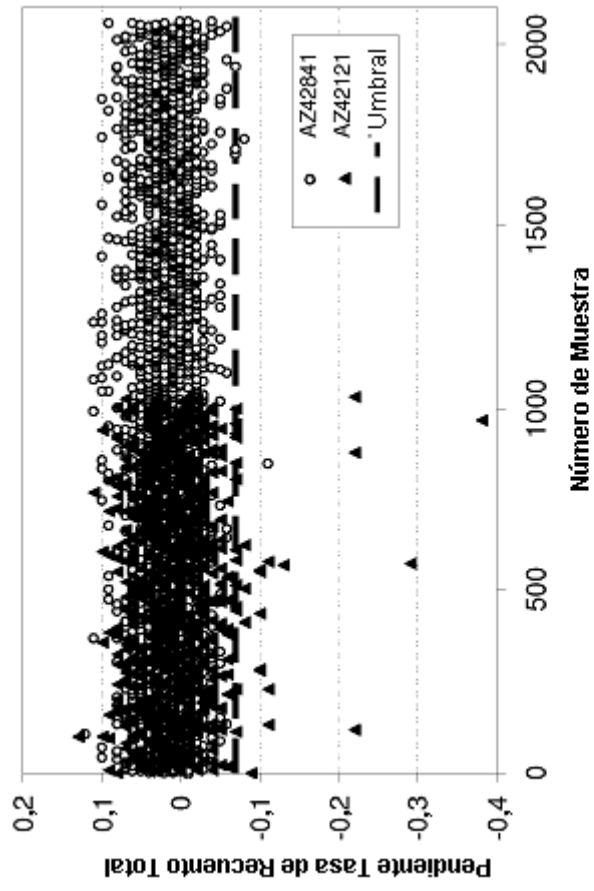


Fig. 3

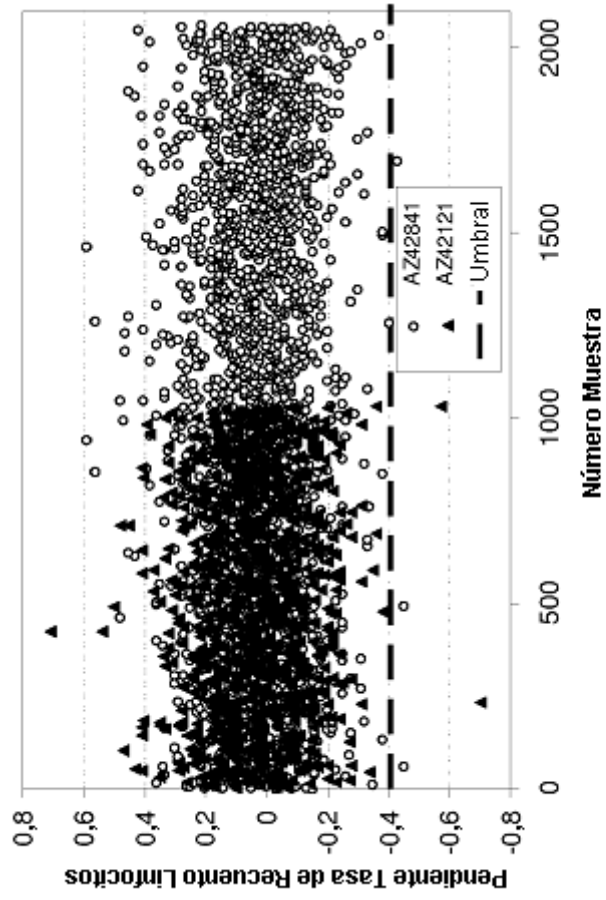


Fig. 4

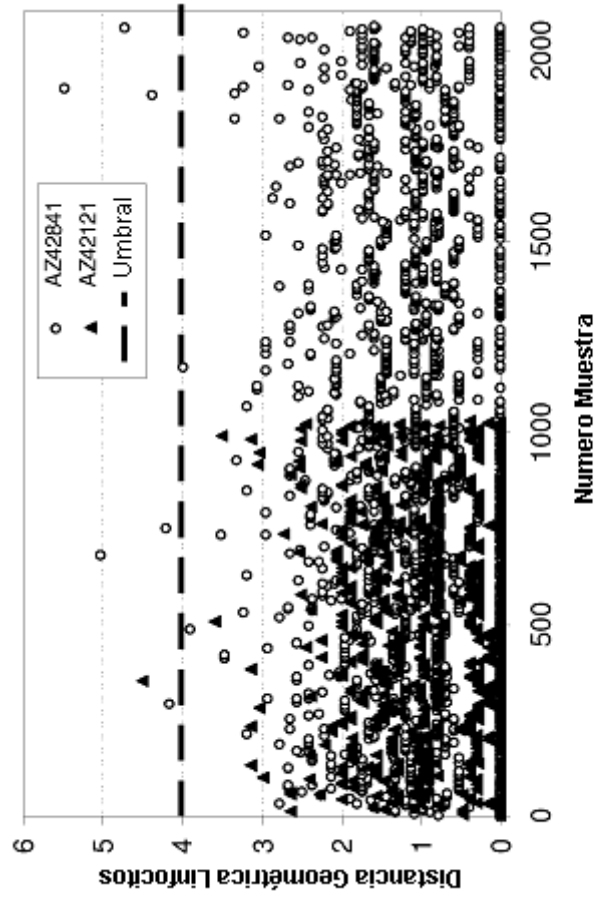


Fig. 5

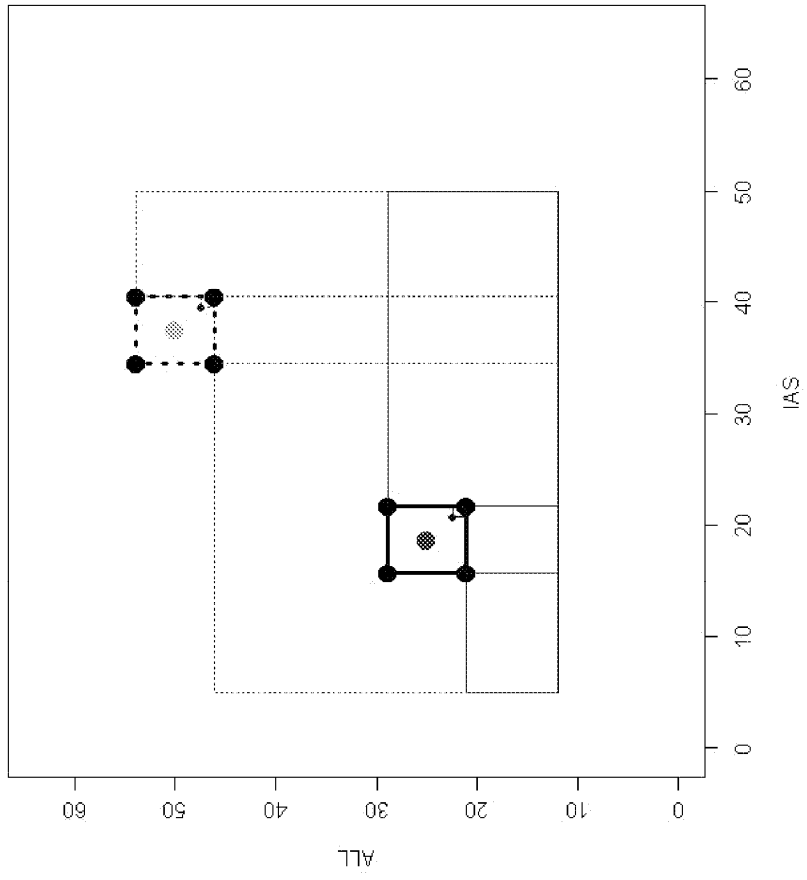


Fig. 6

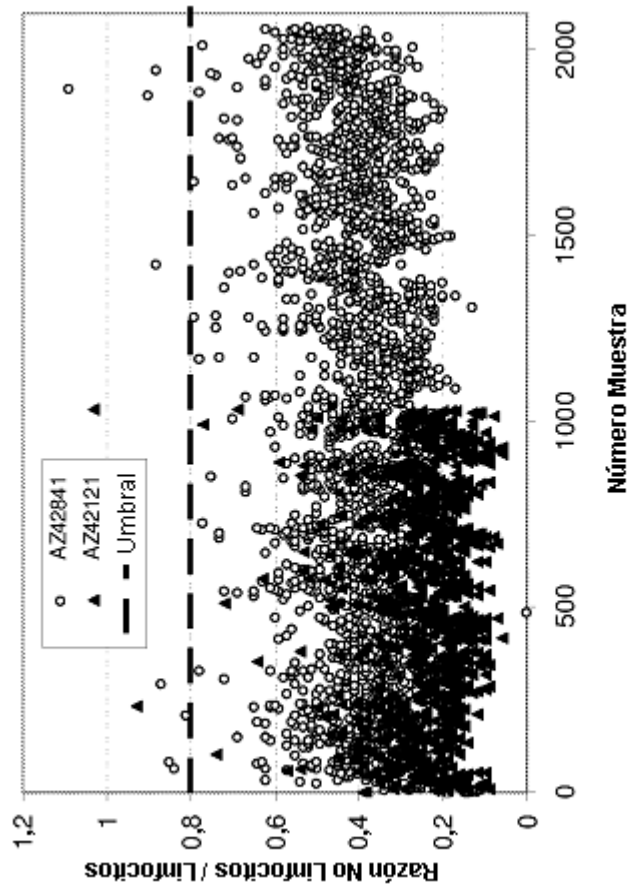


Fig. 7

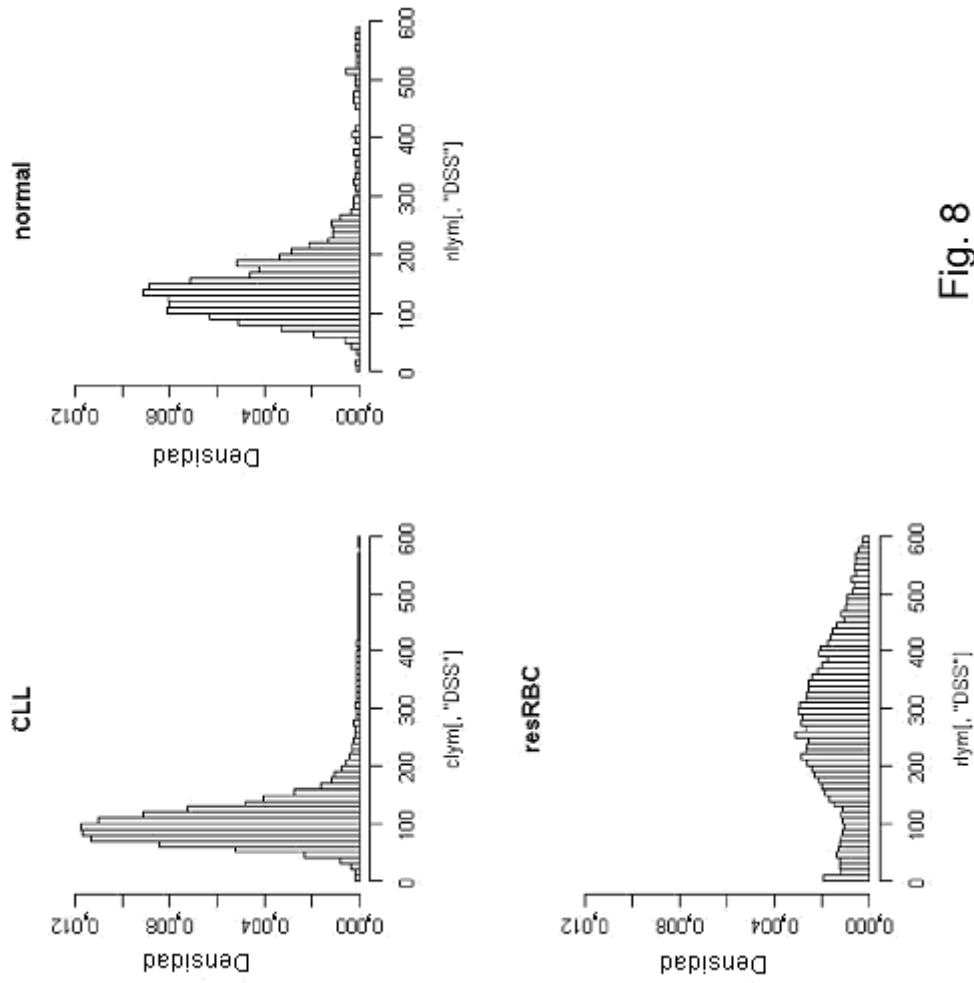


Fig. 8

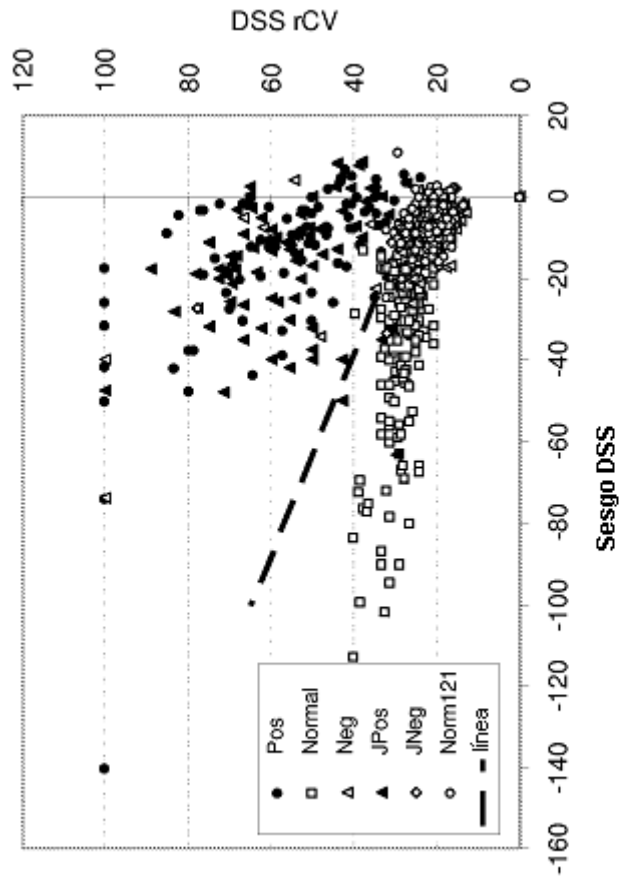


Fig. 9

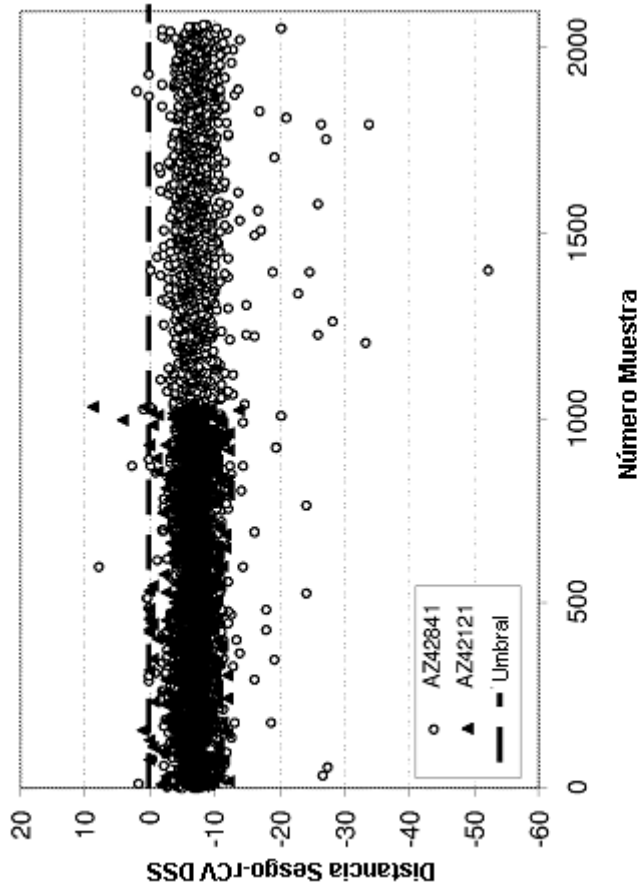


Fig. 10

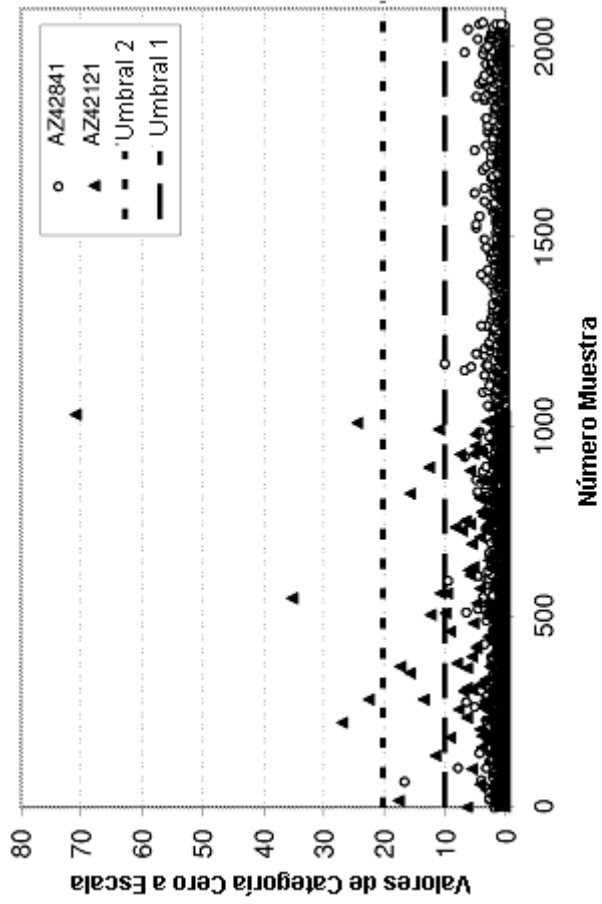


Fig. 11

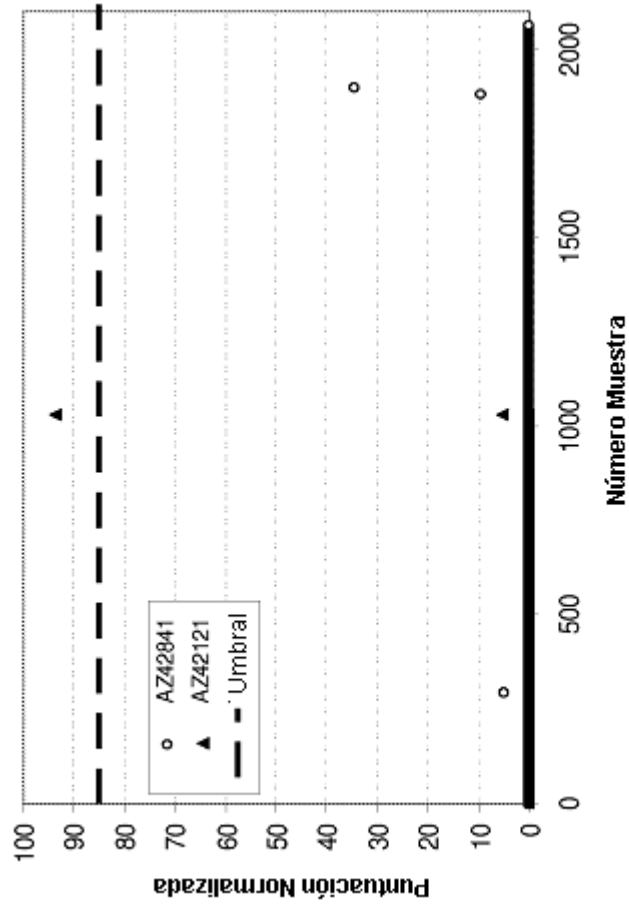


Fig. 12

Fig. 13A

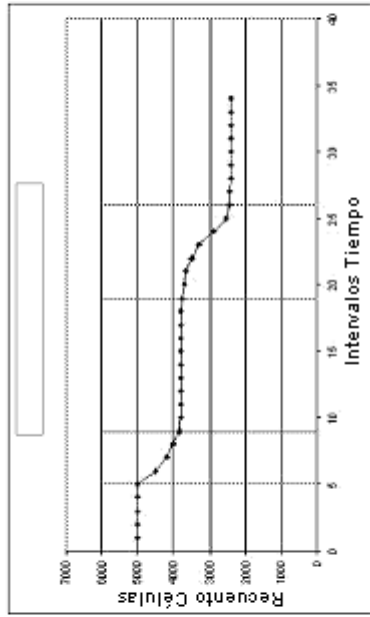


Fig. 13B

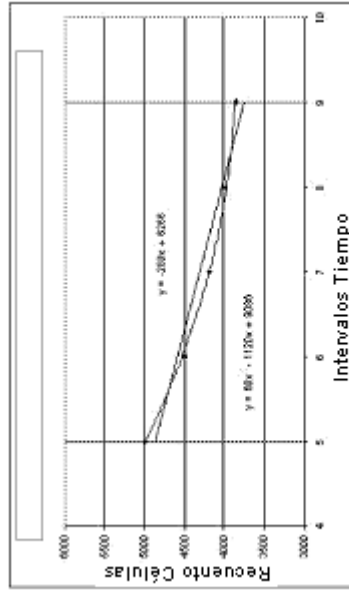


Fig. 13C

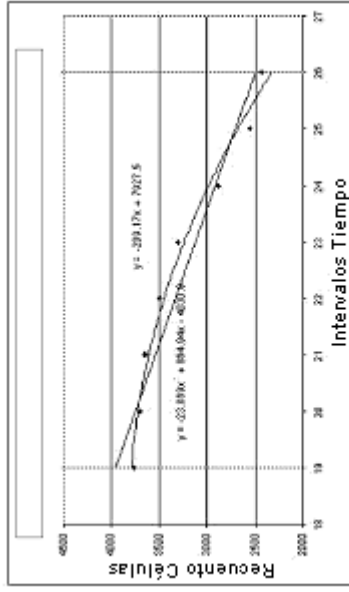


Fig. 13A-13C