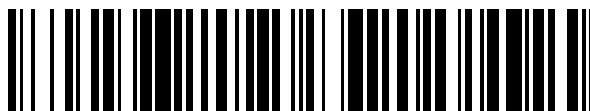


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 692**

51 Int. Cl.:

**G01N 15/14** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2014 PCT/US2014/030856**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14145989**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2014 E 14717381 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2972202**

54 Título: **Método y composición para teñir y procesar una muestra de orina**

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201361799014 P**

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

**12.03.2018**

73 Titular/es:

**IRIS INTERNATIONAL, INC. (100.0%)**

**9172 Eton Avenue  
Chatsworth, CA 91311, US**

72 Inventor/es:

**CREMINS, JACK**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 658 692 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Método y composición para teñir y procesar una muestra de orina

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a agentes de contraste de partículas generalmente y más específicamente a composiciones de agente de contraste de partículas para su uso en dispositivos completa o parcialmente automatizados para discriminar y cuantificar partículas en muestras de fluidos, tales como muestras de orina.

10

**Antecedentes**

15 El análisis de sedimento urinario es una de las pruebas de diagnóstico más comúnmente realizadas para proporcionar una visión general del estado de salud de un paciente. Puede obtenerse una muestra de orina del cuerpo de un paciente y almacenarse en un tubo de ensayo para su procesamiento y análisis posteriores. La aparición de determinados sedimentos característicos también denominados elementos formados en una muestra de orina puede ser clínicamente significativa y/o indicativa de estados patológicos en un sujeto.

20 Generalmente, la orina anómala puede contener una variedad de elementos formados, tales como células sanguíneas, células epiteliales, cristales, cilindros o microorganismos. Por ejemplo, las muestras de orina pueden contener células de origen hematológico. Pueden estar presentes eritrocitos o glóbulos rojos (RBC) en la orina como resultado de hemorragia (hematuria) en cualquier punto del sistema urogenital desde el glomérulo hasta la uretra. La presencia de leucocitos o WBC, neutrófilos, eosinófilos puede tener significación clínica. Las células brillantes son un tipo de neutrófilo observad en orina hipotónica de peso específico de 1,010 o menos. La presencia de linfocitos se ha usado como indicador temprano de rechazo renal tras trasplante. Los eosinófilos están asociados con nefritis intersticial inducida por fármacos. Pueden estar presentes hebras de moco que se originan a partir del riñón o las vías urinarias bajas.

30 Las muestras de orina también pueden contener células de origen epitelial. Pueden encontrarse unas cuantas células epiteliales renales, también denominadas células tubulares renales, en la orina de personas sanas debido a la exfoliación normal. Sin embargo, la presencia de células tubulares renales excesivas es indicativa de enfermedad renal activa o lesión tubular. De los diversos tipos de células epiteliales encontradas en la orina (renales, de transición o uroteliales, y escamosas), las células epiteliales renales son las más significativas clínicamente. Están asociadas con necrosis tubular aguda, infecciones virales (tales como citomegalovirus) y rechazo de trasplante renal. Su presencia también aumenta con fiebre, toxinas químicas, fármacos (especialmente aspirina), metales pesados, inflamación, infección y neoplasias. Además, puede observarse la presencia de cuerpos de inclusión en infecciones virales, tales como rubéola y herpes, y especialmente con citomegalovirus.

40 La orina también puede contener células epiteliales de transición o células uroteliales. Las células epiteliales de transición son la multicapa de células epiteliales que revisten las vías urinarias desde la pelvis renal hasta la parte distal de la uretra masculina y hasta la base de la vejiga (diafragma urogenital) en sujetos femeninos. Pueden ser difíciles de distinguir de las células epiteliales renales, aunque son generalmente más grandes y más esféricas. Están presentes unas cuantas células de transición en la orina de personas sanas. Números aumentados están asociados con infección. Pueden observarse láminas o grumos grandes de estas células con carcinoma de células de transición.

45 La orina también puede contener células epiteliales escamosas. Las células epiteliales escamosas revisten la uretra en sujetos femeninos y la porción distal de la uretra masculina. La presencia de grandes números de células escamosas en sujetos femeninos indica generalmente contaminación vaginal.

50 La orina también puede contener células clave. Las células clave son otro tipo de célula escamosa de origen vaginal, pueden observarse contaminando el sedimento urinario. Esta célula epitelial escamosa está cubierta o recubierta por una bacteria, *Gardnerella vaginalis*, cuya presencia es indicativa de una vaginitis bacteriana.

55 La orina también puede contener cuerpos grasos ovales, grasa tubular renal o cuerpos de grasa tubular renal. Estos cuerpos son células epiteliales renales (o macrófagos) que se han rellenado con gotitas de lípidos o grasa. La grasa puede ser o bien grasa neutra (triglicérido) o colesterol; tienen la misma significancia clínicamente. La presencia de cuerpos grasos ovales en orina es indicativa de anomalía patológica y no debe pasarse por alto. A menudo se observan con cilindros grasos y gotitas de grasa en el sedimento urinario y están asociados con proteinuria masiva tal como se observa en síndrome nefrótico.

60 La orina también puede contener microorganismos tales como bacterias y levaduras. Normalmente, la orina es estéril, o libre de bacterias. Sin embargo, se observan normalmente determinadas bacterias en orina de un pH alcalino. Los hallazgos de sedimentos asociados pueden incluir la presencia de WBC (neutrófilos) y cilindros (de WBC, celulares, granulares o bacterianos). Aunque las infecciones se deben lo más a menudo a bacilos Gram-negativos de origen entérico, los organismos infecciosos pueden ser también cocos Gram-positivos.

65

Además, pueden observarse levaduras en la orina, especialmente como resultado de contaminación vaginal tal como contaminación de pacientes femeninos con infecciones por levaduras. También está asociado con diabetes mellitus debido a la presencia de glucosa urinaria. Las levaduras son un contaminante común, de la piel y el entorno, y las infecciones son un problema en pacientes debilitados e inmunosuprimidos o inmunocomprometidos.

Tradicionalmente, el análisis de sedimentos en orina se ha realizado mediante inspección visual usando un microscopio en un laboratorio general. Con estos enfoques, una muestra de orina se somete en primer lugar a separación centrífuga y se enriquece. Los sedimentos así obtenidos se tiñen en algunos casos y luego se cargan sobre un portaobjetos de microscopio, y se someten a determinación manual y recuento bajo el microscopio.

Las etapas de preparación de muestras pueden incluir la concentración de los sedimentos urinarios mediante centrifugación y algunas veces la aplicación de una tinción de microscopía para potenciar el contraste, por ejemplo, entre tipos de sedimentos tales como RBC, WBC y células epiteliales. En un recuento manual, el técnico observa el portaobjetos de la preparación microscópica húmeda, distinguiendo entre los tipos de células visibles o mediante su aspecto usando su criterio profesional, y cuenta manualmente el número sedimentos urinarios observados de diferentes tipos dentro de un área predeterminada.

Se han usado diversas tinciones para teñir células o estructuras celulares encontradas en muestras de orina. Por ejemplo, la tinción de Wright es una tinción que se ha usado para teñir muestras de orina para su examen bajo un microscopio óptico. La tinción de una muestra de orina implica el uso de múltiples disoluciones y etapas en orden apropiado para garantizar que el agente de tinción se aplica correctamente y la estructura celular se conserva apropiadamente. Puede aplicarse un agente de fijación a la muestra en una primera etapa para conservar la muestra frente a la degradación y mantener la estructura celular. Después de eso, puede aplicarse un agente permeabilizante a la muestra en una segunda etapa para disolver las membranas celulares con el fin de permitir que el agente de tinción entre en las células. El agente de tinción puede aplicarse a la muestra en una tercera etapa para teñir las estructuras apropiadas. La muestra puede enjuagarse adicionalmente para su observación, o pueden adoptarse etapas adicionales para aplicar tinciones, contratinciones adicionales, o realizar otras acciones.

Es importante realizar las etapas en el orden apropiado durante los periodos de tiempo apropiados. Si la muestra se permeabiliza antes de fijarse, las estructuras celulares de la muestra pueden degradarse antes de fijarse y se pierde cualquier capacidad para discernir la morfología celular original. Adicionalmente, la tinción no puede producirse antes de la etapa de permeabilización, o el agente de tinción no penetrará apropiadamente en las células ni teñirá las estructuras dentro de las células. Adicionalmente, si cualquiera de las etapas, tales como fijación, permeabilización y tinción, se realizan demasiado rápidamente, la morfología de la célula puede perderse y/o la célula y sus estructuras internas pueden no teñirse apropiadamente. Además, puede ser necesario el uso de modificadores del pH antes de otras etapas con el fin de garantizar una funcionalidad apropiada de componentes que no pueden funcionar apropiadamente en el pH natural de la orina. Las técnicas de tinción actuales requieren múltiples etapas y un tiempo significativo.

Las técnicas de tinción actuales requieren la dilución de las muestras en los agentes de contraste, generalmente alrededor de 9 partes de agente de contraste con respecto a 1 parte de muestra. Puede no ser deseable tener mezclas de volumen grande para su uso con sistemas de análisis basados en imágenes tales como sistemas de citometría de flujo, al menos debido al tiempo que se tarda en procesar un volumen de una mezcla.

Los analizadores automatizados están volviéndose cada vez más prevalentes. El uso de sistemas para el análisis de orina se describe generalmente en la patente estadounidense n.º 4.473.530 concedida a Villa-Real, titulada "Compact Sanitary Urinalysis Unit"; la patente estadounidense n.º 3.894.845, titulada "Urine Collection and Analysis Device" y la patente estadounidense n.º 3.988.209, titulada "Microorganism Analysis Device", ambas concedidas a McDonald; la patente estadounidense n.º 4.973.450 concedida a Schluter, titulada "Device for Urinalysis"; la patente estadounidense n.º 4.622.298 concedida a Mansour, *et al.*, titulada "Detection and Quantitation of Microorganisms, Leukocytes and Squamous Epithelial Cells in Urine"; y la patente estadounidense n.º 5.132.232 concedida a Parker, titulada "Method and Apparatus for Preparation of Liquids for Examination". La patente estadounidense n.º 4.612.614 concedida a Deindoerfer, *et al.*, titulada "Method of Analyzing Particles in a Fluid Sample", notifica un método para analizar sedimentos urinarios distribuyendo una muestra sobre un área extendida, tal como un portaobjetos de microscopio o una célula de flujo. Deindoerfer, *et al.* notifican el uso de una pluralidad de imágenes ópticas fijas de la muestra que se convierten en imágenes electrónicas que se presentan visualmente en una matriz ordenada de clases de características visualmente discernibles. Sin embargo, muchos de estos sistemas de análisis de orina desarrollados anteriormente carecen del rendimiento, la exactitud y/o la aplicabilidad general requeridos para su adaptación a todas las dianas/sujetos para todos los fines previstos.

Para la automatización de la determinación del sedimento urinario, puede usarse un microscopio de flujo automatizado (por ejemplo, microscopio automático de tipo flujo -- iQ@200, Iris Diagnostics). Con estos tipos de dispositivos, se introduce una muestra de orina en una célula de flujo de tipo plano sin preconcentración y se toman imágenes y se almacenan al tiempo que la muestra fluye a través de la célula de flujo. Sin embargo, los sedimentos urinarios tienen una morfología diversa y muchos sedimentos se dañan, y por tanto, la determinación de imágenes

tomadas con buena exactitud es difícil de lograr. Es particularmente difícil determinar sedimentos de tamaño pequeño, tales como eritrocitos (especialmente eritrocitos dismórficos), bacterias y cristales con buena exactitud sin validación por un usuario externo.

5 Los diversos sistemas automatizados descritos anteriormente se basan en un análisis rápido de las muestras. El número de y la duración de las etapas del proceso de tinción pueden ser un factor limitante en la velocidad y eficacia de los sistemas de análisis de partículas automatizados. Los sistemas de análisis de partículas automatizados pueden ser más eficientes si el proceso de tinción se acorta, y además más eficientes si el proceso de tinción se realiza en una única etapa. Adicionalmente, los sistemas de análisis de partículas automatizados pueden ser más eficientes si el tamaño total de la muestra se mantiene en un mínimo.

El documento JP2010213598A se refiere a un método para determinar la sensibilidad de los microbios contenidos en una muestra que se sabe que va a contaminarse con dichos microbios a antibióticos microbianos.

15 El documento WO2011/087789 se refiere a métodos para la detección de la presencia o ausencia de uno o más microorganismos en una muestra.

El documento WO03/035895 se refiere a un ensayo que utiliza un método para la amplificación con cebadores específicos de gen de bibliotecas de ARNm a partir de células poco comunes y transcritos poco comunes encontrados en la sangre.

### Sumario

25 La invención se define en las reivindicaciones. Se da a conocer una composición de agente de contraste de partículas para teñir partículas de una muestra de fluido urológico para obtener imágenes en un sistema de análisis de partículas automatizado. La composición de agente de contraste de partículas incluye cristal violeta presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de entre 50  $\mu\text{M}$  y 500  $\mu\text{M}$  en condiciones de tinción. La composición de agente de contraste de partículas incluye además un agente permeabilizante que comprende 5 PD Lytic que incluye saponina en el que la saponina está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 0,01 mg/l a aproximadamente 100 mg/l en condiciones de tinción.

35 En una realización, el agente permeabilizante puede ser 5 PD Lytic presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente el 3,5% en peso en condiciones de tinción. En una realización, el cristal violeta puede estar presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 86  $\mu\text{M}$  en condiciones de tinción. En una realización, la composición de agente de contraste de partículas puede incluir además una solución salina tamponada con fosfato que incluye al menos fosfato de sodio dibásico y fosfato de potasio monobásico.

40 En una realización, la composición de agente de contraste de partículas puede incluir un agente antimicrobiano. En algunas realizaciones, el agente antimicrobiano puede ser Proclin 300 y la composición de agente de contraste de partículas puede incluir también cristal violeta con una pureza del 80% o más presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 86  $\mu\text{M}$  en condiciones de tinción. En algunas realizaciones, la composición de agente de contraste de partículas puede incluir también cloruro de sodio y una solución salina tamponada con fosfato que incluye al menos fosfato de sodio dibásico y fosfato de potasio monobásico.

50 Se da a conocer un método para tratar partículas de una muestra de fluido urológico para obtener imágenes usando un sistema de análisis de partículas automatizado. El método incluye combinar una composición de agente de contraste de partículas de la invención y la muestra de fluido urológico en una mezcla de muestra dando como resultado una concentración final de la composición de agente de contraste de partículas en peso de la mezcla de muestra de entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 20%. El método incluye además incubar la mezcla de muestra a una temperatura por encima de 20° Celsius durante menos de 90 segundos.

55 En algunas realizaciones, el 5PD-Lytic puede estar presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente el 3,5% en peso en condiciones de tinción. El cristal violeta puede estar presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 86  $\mu\text{M}$  en condiciones de tinción. La concentración final de composición de agente de contraste de partículas en peso de la mezcla de muestra puede ser de entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 20%. La mezcla de muestra puede incubarse a entre 30°C y 50°C durante menos de 60 segundos.

60 En algunas realizaciones, la concentración final de composición de agente de contraste de partículas en peso de la mezcla de muestra es de aproximadamente el 15% y la mezcla de muestra se incuba a entre 30°C y 50°C durante menos de 60 segundos.

65 En algunas realizaciones, la mezcla de muestra se incuba a entre 40°C y 50°C durante entre 30 y 35 segundos. El cristal violeta puede tener una pureza de aproximadamente el 80% o más. En algunas realizaciones, la composición

de agente de contraste de partículas incluye además Proclin 300.

En algunas realizaciones, la composición de agente de contraste de partículas comprende además añadir cloruro de sodio y una solución salina tamponada con fosfato que incluye al menos fosfato de sodio dibásico y fosfato de potasio monobásico.

Las características descritas anteriormente y muchas otras y ventajas acompañantes de las realizaciones de la presente invención resultarán evidentes y se entenderán adicionalmente mediante referencia a la siguiente descripción detallada cuando se considera conjuntamente con los dibujos adjuntos.

### Breve descripción de los dibujos

La memoria descriptiva hace referencia a las siguientes figuras adjuntas, en las que el uso de números de referencia similares en diferentes figuras pretende ilustrar componentes similares o análogos.

La figura 1 es un diagrama esquemático de una célula de flujo para transportar un fluido de muestra según una realización.

La figura 2 es un diagrama esquemático de la preparación de una composición de agente de contraste de partículas según una realización.

La figura 3 es un diagrama de flujo de un proceso de tinción de una etapa, rápido según una realización.

La figura 4 es una ilustración representativa de partículas seleccionadas de una muestra urinaria teñida según el proceso de tinción de una etapa, rápido según una realización.

La figura 5 es una imagen de partículas seleccionadas de una muestra urinaria teñida según un ejemplo anterior.

La figura 6 es una imagen de partículas seleccionadas de una muestra urinaria teñida según un ejemplo anterior.

La figura 7 es una imagen de partículas seleccionadas de una muestra urinaria teñida según un ejemplo anterior.

La figura 8 es una imagen de partículas seleccionadas de una muestra urinaria teñida según un ejemplo anterior.

La figura 9 es una imagen de partículas seleccionadas de una muestra urinaria teñida según un ejemplo anterior.

La figura 10 es una imagen de partículas seleccionadas de una muestra urinaria teñida según un ejemplo anterior.

La figura 11 es una imagen de partículas seleccionadas de una muestra urinaria teñida según un ejemplo anterior.

La figura 12 es una imagen de partículas seleccionadas de una muestra urinaria teñida según un ejemplo anterior.

La figura 13 es una imagen de partículas seleccionadas de una muestra urinaria teñida según un ejemplo anterior.

La figura 14 es una imagen de partículas seleccionadas de una muestra urinaria teñida según un ejemplo anterior.

La figura 15 es una imagen de partículas seleccionadas de una muestra urinaria teñida según un ejemplo anterior.

La figura 16 es una imagen de partículas seleccionadas de una muestra urinaria teñida según un ejemplo anterior.

La figura 17 es una imagen de partículas seleccionadas de una muestra urinaria teñida según un ejemplo anterior.

La figura 18 es una imagen de partículas seleccionadas de una muestra urinaria teñida según un ejemplo anterior.

La figura 19 es una imagen de partículas seleccionadas de una muestra urinaria teñida según un ejemplo anterior.

La figura 20 es una imagen de partículas seleccionadas de una muestra urinaria teñida según un ejemplo anterior.

La figura 21 es una imagen de partículas seleccionadas de una muestra urinaria teñida según un ejemplo anterior.

### Descripción detallada

La presente divulgación se refiere a una composición de agente de contraste de partículas sorprendente e inesperada para generar rápidamente distinciones visuales en una muestra de fluido, tal como una muestra de orina. La composición de agente de contraste de partículas puede ser especialmente útil en sistemas de citometría de flujo automatizados. La composición de agente de contraste de partículas está compuesta por una combinación de un

agente de contraste de partículas y un agente permeabilizante. La composición de agente de contraste de partículas puede incluir un agente de fijación y/o un agente antimicrobiano. En una realización, la composición de agente de contraste de partículas es una mezcla de cristal violeta, saponina y Proclin 300. En una realización que es sorprendentemente eficaz, en condiciones de tinción, el cristal violeta está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 0,57 mM, la saponina está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente el 23,3% en peso, y el Proclin 300 está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente el 0,05% en peso, con agua desionizada a aproximadamente el 76,7% en peso.

Estos ejemplos ilustrativos se facilitan para introducir al lector en la materia general comentada en el presente documento y no pretenden limitar el alcance de los conceptos dados a conocer. Las siguientes secciones describen diversas características y ejemplos adicionales con referencia a los dibujos en los que números similares indican elementos similares, y se usan descripciones direccionales para describir las realizaciones ilustrativas aunque, como las realizaciones ilustrativas, no deben usarse para limitar la presente divulgación. Los elementos incluidos en las ilustraciones en el presente documento pueden no estar dibujados a escala.

Antes de que se describieran las realizaciones en el presente documento, no había ningún protocolo publicado que permitiera el desarrollo y los métodos de uso de composiciones de agente de contraste de partículas para realizar una clasificación y subclasificación diferencial celular/de partículas en muestras de orina para análisis basado en imágenes al tiempo que se mantienen las células viables o sustancialmente intactas, con la opción de que se produzcan etapas de tinción y permeabilización mientras están en flujo, para lograr la tinción de glóbulos rojos, células epiteliales, bacterias, que potencian la visualización diferencial.

Los aspectos y las realizaciones de la presente divulgación se basan en el descubrimiento sorprendente e inesperado de que determinadas composiciones de agente de contraste de partículas, incluyendo por ejemplo, composiciones de tinción/colorante, y/o combinaciones de las mismas, tienen propiedades y eficacia inesperadas cuando se usan para realizar análisis de muestras automatizado, basado en imágenes, tales como análisis de muestras de sedimento urinario.

#### ANÁLISIS DE ORINA - SISTEMA DE ANÁLISIS DE PARTÍCULAS

Las composiciones y el método dados a conocer en el presente documento pueden usarse con muchos tipos diferentes de sistemas de obtención de imágenes de análisis de orina, tales como el IQ Urine Analysis comercializado por Iris International. En particular, las composiciones y los métodos descritos en el presente documento pueden usarse con análisis de muestras basado en imágenes, tales como análisis de célula de flujo. Un ejemplo de un análisis de célula de flujo de este tipo puede incluir métodos tradicionales, conocidos de citometría de flujo. Adicionalmente, las composiciones y los métodos descritos en el presente documento pueden usarse ventajosamente con los sistemas y métodos de análisis de célula de flujo detallados resumidamente a continuación y descritos además en la solicitud presentada conjuntamente US 2014-0329265 A1 titulada "Flowcell, Sheath Fluid, and Autofocus Systems and Methods For Particle Analysis In Urine Samples".

La figura 1 es una representación esquemática de una célula 22 de flujo a modo de ejemplo para transportar un fluido de muestra (por ejemplo, una mezcla de muestra, tal como se describe en detalle adicional a continuación) a través de una zona 23 de observación de un dispositivo 24 de obtención de imágenes de alta resolución óptica en una configuración para obtener imágenes de partículas microscópicas en una corriente 32 de flujo de muestra usando procesamiento de imágenes digitales. La célula 22 de flujo está acoplada con una fuente 25 de fluido de muestra que puede haberse sometido a procesamiento, tal como contacto con una composición de agente de contraste de partículas y calentamiento.

La célula 22 de flujo también puede acoplarse a una fuente 27 de fluido envolvente para ayudar al flujo de la muestra. En una realización, el fluido envolvente es una disolución salina acuosa que tiene un pH de alrededor de 7,0 y un peso específico de 1,007 a 20°C, que puede obtenerse de IRIS International, Inc. con el nombre comercial LAMINA.

El fluido de muestra se inyecta a través de una abertura aplanada en un extremo 28 distal de un tubo 29 de alimentación de muestra, y al interior de la célula 22 de flujo en un punto en el que el flujo de fluido envolvente se ha establecido sustancialmente dando como resultado un flujo laminar estable y simétrico del fluido envolvente por encima y por debajo (o en lados opuestos de) la corriente de muestra con forma de cinta. El fluido envolvente de muestra puede suministrarse mediante bombas de medición de precisión que mueven el fluido envolvente con el fluido de muestra inyectado a lo largo de una trayectoria de flujo que se estrecha sustancialmente. En una realización, el fluido envolvente envuelve y comprime el fluido de muestra en la zona 21 donde se estrecha la trayectoria de flujo. Por tanto, la disminución en el grosor de la trayectoria de flujo en la zona 21 puede contribuir al enfoque geométrico de la corriente 32 de muestra. La cinta 32 de fluido de muestra se porta junto con el fluido envolvente aguas abajo de la zona 21 de estrechamiento, pasando en frente de, o de lo contrario a través de la zona 23 de observación del dispositivo 24 de obtención de imágenes de alta resolución óptica en donde se recogen las imágenes, por ejemplo, usando un CCD. La cinta de fluido de muestra fluye junto con el fluido envolvente hasta una

descarga 33.

Tal como se muestra en el presente documento, la zona 21 de estrechamiento puede tener una porción 21a de trayectoria de flujo proximal que tiene un grosor proximal PT y una porción 21b de trayectoria de flujo distal que tiene un grosor distal DT, de manera que el grosor distal DT es menor que el grosor proximal PT. El fluido de muestra puede inyectarse por tanto a través del extremo 28 distal del tubo 29 de muestra en una ubicación que es distal con respecto a la porción 21a proximal y proximal con respecto a la porción 21b distal. Por tanto, el fluido de muestra puede entrar en la envuelta de fluido envolvente a medida que la corriente de fluido envolvente se comprime mediante la zona 21.

El dispositivo 24 de obtención de imágenes de alta resolución óptica digital con lente 46 objetivo está dirigido a lo largo de un eje óptico que corta la corriente 32 de muestra con forma de cinta. La distancia relativa entre el objetivo 46 y la célula 22 de flujo es variable mediante el funcionamiento de un accionamiento 54 por motor, para resolver y recoger una imagen digitalizada enfocada sobre una matriz de fotosensores.

#### COMPOSICIÓN DE AGENTE DE CONTRASTE DE PARTÍCULAS

La figura 2 es un diagrama esquemático de la preparación de una composición de agente de contraste de partículas según una realización. En el bloque 208, se combinan un agente 202 de contraste de partículas y un agente 204 permeabilizante para crear la composición 210 de agente de contraste de partículas. En algunas realizaciones, también se combina un agente 206 de fijación opcional. La combinación en el bloque 208 puede realizarse en cualquier orden y de cualquier modo adecuado.

En realizaciones alternativas, se combinan componentes 212 adicionales en el bloque 208 como parte de la composición 210 de agente de contraste de partículas, tal como se describe en detalle adicional a continuación.

La composición 210 de agente de contraste de partículas puede proporcionarse como parte de un kit. La composición 210 de agente de contraste de partículas puede proporcionarse ya preparada o como uno o más componentes que deben combinarse. El kit también puede contener instrucciones sobre el uso de la composición de agente de contraste de partículas según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento y/o instrucciones para el uso de cualquier otro componente del kit. El kit también puede comprender uno o más tampones y/o diluyentes. El kit y o tampón puede comprender además al menos uno de un agente de ajuste del pH; modificador de la fuerza iónica, un tensioactivo, un agente quelante, azúcar, alcohol de azúcar, estabilizadores de proteínas y/o un agente antimicrobiano. En otras realizaciones, el kit puede comprender también una disolución de limpieza o de lavado. El kit puede comprender también patrones para controles positivo y negativo, calibradores o controles. En algunas realizaciones el patrón puede comprender un patrón que contiene calibradores y/o controles. El kit puede comprender también micropipetas, puntas o tubos desechables para transferir los componentes del kit.

#### AGENTE DE CONTRASTE DE PARTÍCULAS

El agente 202 de contraste de partículas puede ser cualquier agente de contraste que pueda producir distinciones visibles en partículas en la muestra de orina. Diferentes agentes de contraste reaccionan o se concentran en diferentes partes de una célula y estas propiedades pueden usarse ventajosamente para revelar áreas o partes específicas. Los ejemplos de tales agentes de contraste (por ejemplo, tinciones) incluyen azul alcian y azul alcian 86 (mucosustancias neutras y ácidas PAS); rojo de alizarina S; rojo alura AC (colorante rojo de colorante azoico n.º 40); azul de analina (cilios intensificados con ácido oxálico); auramina O; Azure B; Azure C; marrón Bismarck; azul brillante FCF (azul de Comassie); azul de cresilo brillante; verde brillante; Carmium (colorante nuclear rojo compuesto por ácido carmínico y alumbre de potasio); rojo Congo; negro de clorazol E (núcleos negros, citoplasma gris, glucógeno rosa); acetato de violeta de cresilo; rojo de Darrow; eosina azulada; eritrosina B (colorante rojo n.º 3); eosina de etilo; verde rápido FCF (colorante verde n.º 3); fucsina básica (núcleos y flagelos); fluoresceína (mercurocromo); Giemsa-frotis de sangre periférica; hematoxilina de Harris-tinción nuclear regresiva; carmín índigo (colorante azul n.º 2); verde Janus B (mitocondrias); tinción de Jenner-(frotis de sangre periférica); verde claro SF amarillento; MacNeal-(tinción de sangre con tetracromo); verde malaquita; naranja de metilo; amarillo de Martius; hematoxilina de Mayer-tinción nuclear progresiva; violeta de metilo 2B; plata de metenamina-ácido peryódico; violeta de metileno; May Grunwald-tinción hematológica; MTT-tinción de formazán; mucicarmina-tinción de tumor primario; rojo neutro; nigrosina; azul Nilo A; rojo rápido nuclear C.I. 60760; Napthal AS; colorante de azul de nitrotetrazolio-formazán rápido; naranja G; naranja II; orceína; tinción de Papanicolaou EAS-tinción citoplasmática brillante; pararosanilina; pararosanilina; ácido peryódico de Schiff-(PAS, tinción de hidratos de carbono específica); filoxina B; Protargol S; pironina B; pironina Y; resazurina; Romanowsky-Giemsa; rosa de Bengala; safranina O; negro Sudán B; Sudán III-(con alfa-naftol tiñe gránulos mieloides); Sudán IV-tiñe triglicéridos; tartrazina-(colorante azoico amarillo n.º 5); tionina-tiñe metacromatina; trifeniltetrazolio; TTC-colorante de rojo de formazán; azul de toluidina O; tinción de Wright-(fijador, tampón y tinción para frotis de sangre convencionales); y Wright Giemsa.

A través de esfuerzos y experimentación no triviales, se ha encontrado que pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces en la composición 210 de agente de contraste de partículas, tal como se describe en detalle adicional en el presente documento, con el uso de un agente 202 de contraste de partículas que incluye al

menos uno de cristal violeta, azul de metileno nuevo, safranina O, eosina Y y verde de metilo. El agente 202 de contraste de partículas se añade en una cantidad eficaz para teñir células viables y/o sustancialmente intactas para clasificación y subclasificación basadas en imágenes. El agente 202 de contraste de partículas puede ser cualquier combinación de dos o más de los agentes de contraste de partículas mencionados anteriormente. El agente 202 de contraste de partículas puede seleccionarse para obtener eficazmente imágenes teñidas discernibles de células vitales y/o sustancialmente intactas.

Tal como se define en las reivindicaciones, el agente 202 de contraste de partículas incluye cristal violeta presente en cantidades suficientes para lograr entre aproximadamente 50  $\mu\text{M}$  y aproximadamente 500  $\mu\text{M}$  en condiciones de tinción. Tal como se usa en el presente documento, el término "en condiciones de tinción" se refiere a cuando el componente se mezcla con la muestra. El cristal violeta está presente en cantidades suficientes para lograr entre aproximadamente 50  $\mu\text{M}$  y aproximadamente 500  $\mu\text{M}$  en condiciones de tinción. El cristal violeta puede estar presente en cantidades suficientes para lograr aproximadamente 320  $\mu\text{M}$  en condiciones de tinción. Pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces cuando el cristal violeta está presente en cantidades suficientes para lograr aproximadamente 0,57 mM en condiciones de tinción. Pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces cuando el cristal violeta está presente en cantidades suficientes para lograr casi 0,57 mM en condiciones de tinción. El cristal violeta puede purificarse hasta al menos una pureza del 5%. El cristal violeta puede purificarse hasta al menos una pureza del 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99%. El cristal violeta puede purificarse hasta al menos una pureza del 100%. El agente 202 de contraste de partículas puede ser únicamente cristal violeta, o puede ser cristal violeta combinado con uno o más agentes de contraste de partículas adicionales.

En una realización, el agente 202 de contraste de partículas incluye safranina O. La safranina O puede estar presente en cantidades suficientes para lograr entre aproximadamente 100  $\mu\text{M}$  y aproximadamente 1000  $\mu\text{M}$  en condiciones de tinción. La safranina O puede estar presente en cantidades suficientes para lograr entre aproximadamente 600  $\mu\text{M}$  y aproximadamente 900  $\mu\text{M}$  en condiciones de tinción. La safranina O puede estar presente en cantidades suficientes para lograr aproximadamente 850  $\mu\text{M}$  en condiciones de tinción. La safranina O puede estar presente en cantidades suficientes para lograr casi 850  $\mu\text{M}$  en condiciones de tinción. La safranina O puede purificarse hasta al menos una pureza del 80%. La safranina O puede purificarse hasta al menos una pureza del 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99%. La safranina O puede purificarse hasta al menos una pureza del 100%.

En algunas realizaciones, se logran resultados sorprendentemente eficaces cuando el agente 202 de contraste de partículas incluye tanto cristal violeta como safranina O. La razón de cristal violeta con respecto a safranina O puede ser de entre aproximadamente 0,05:1 y aproximadamente 5:1 (molar/molar). La razón de cristal violeta con respecto a safranina O puede ser de entre aproximadamente 3:1 (molar/molar). La razón de cristal violeta con respecto a safranina O puede ser de casi 3:1 (molar/molar).

En una realización, el agente 202 de contraste de partículas incluye azul de metileno nuevo. El azul de metileno nuevo puede purificarse hasta al menos una pureza del 50%. El azul de metileno nuevo puede purificarse hasta al menos una pureza del 70%, el 71%, el 72%, el 73%, el 74%, el 75%, el 76%, el 77%, el 78%, el 79%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99%. El azul de metileno nuevo puede purificarse hasta al menos una pureza del 100%.

En una realización, el agente 202 de contraste de partículas incluye eosina Y. La eosina Y puede purificarse hasta al menos una pureza del 80%. La eosina Y puede purificarse hasta al menos una pureza del 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99%. La eosina Y puede purificarse hasta al menos una pureza del 100%.

En una realización, el agente 202 de contraste de partículas incluye verde de metilo. El verde de metilo puede purificarse hasta al menos una pureza del 80%. El verde de metilo puede purificarse hasta al menos una pureza del 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99%. El verde de metilo puede purificarse hasta al menos una pureza del 100%.

En algunas realizaciones, el agente 202 de contraste de partículas incluye uno o más de cristal violeta, azul de metileno nuevo, safranina O, eosina Y y verde de metilo en cantidades eficaces para generar distinciones visuales en partículas, por ejemplo, potenciando las características de contenido intracelular de partículas en una muestra cuando se presenta para la obtención de imágenes. El agente 202 de contraste de partículas puede estar presente en cantidades suficientes para potenciar y/o teñir partículas incluyendo eritrocitos (RBC), eritrocitos dismórficos, leucocitos (WBC), neutrófilos, linfocitos, células fagocíticas, eosinófilos, basófilos, células epiteliales escamosas, células epiteliales de transición, células señuelo, células tubulares renales epiteliales, cilindros, cristales, bacterias, levaduras, parásitos, cuerpos grasos ovales, gotitas de grasa, espermatozoides, moco, tricomonas, grumos de células, fragmentos de células y otras células encontradas en muestras urinarias, así como estructuras subcelulares de las mismas. La tinción puede ayudar en la identificación, distinción, recuento, caracterización y análisis de las



partículas, y/o en la identificación de características morfológicas asociadas con patologías, enfermedades o estados. Las distinciones visualizables o visuales pueden incluir cualquier característica de las partículas o dentro de las partículas que pueda visualizarse o detectarse de otro modo usando cualquier fuente de luz (por ejemplo, UV, visible, IR).

En realizaciones en las que la composición 210 de agente de contraste de partículas incluye dos o más agentes 202 de contraste de partículas, las cantidades de cada uno de los agentes 202 de contraste de partículas puede ajustarse apropiadamente, dependiendo de si los agentes 202 de contraste de partículas tienen efectos independientes, competitivos y/o potenciadores sobre la generación de distinciones visuales para la clasificación y subclasificación de partículas.

#### AGENTE PERMEABILIZANTE

En algunas realizaciones, el agente 204 permeabilizante puede ser un agente permeabilizante de paredes y/o membranas de partículas. El agente 204 permeabilizante puede incluir un tensioactivo y/o un modificador de la tensión superficial. El agente 204 permeabilizante incluye una saponina. En ejemplos alternativos, el agente 204 permeabilizante puede incluir al menos uno de una sal de amonio cuaternario, un tensioactivo no iónico y un tensioactivo zwitteriónico. El agente permeabilizante puede alterar la permeabilidad de una célula con el fin de aumentar la accesibilidad del agente 202 de contraste de partículas al contenido intracelular. El agente permeabilizante puede seleccionarse e incluirse en cantidades suficientes para permitir un procedimiento de tinción de una etapa, rápido.

Los ejemplos de un tensioactivo no iónico pueden incluir (1) alquil o aril éteres de polioxietileno (polietoxilatos), incluyendo hidrófobos alifáticos de cadena lineal eterificados con polietilenglicol o polioxietilenoetanol, por ejemplo, Brij® 35; (2) hidrófobos alifáticos/aromáticos de cadena ramificada (por ejemplo, octilfenol) eterificados con polietilenglicol, por ejemplo, Triton X®-100; (3) hidrófobos alifáticos/aromáticos de cadena lineal (por ejemplo, n-nonilfenol) eterificados con polietilenglicol, por ejemplo, Igepal® C0897; y (4) hidrófobos alifáticos de cadena lineal (por ejemplo, ácido carboxílico) eterificados con polietilenglicol, por ejemplo, Myrj® 53, y otros. Los ejemplos de tensioactivos de alquil o aril éteres de polioxietileno no iónicos (polietoxilatos) pueden incluir lauril éter de polioxietileno(4) (Brij® 30); lauril éter de polioxietileno(23) (Brij® 35); cetil éter de polioxietileno(2) (Brij® 52); cetil éter de polioxietileno(20) (Brij® 58); estearil éter de polioxietileno(2) (Brij® 72); estearil éter de polioxietileno(10) (Brij® 76); estearil éter de polioxietileno(20) (Brij® 78); oleil éter de polioxietileno(2) (Brij® 92); oleil éter de polioxietileno(10) (Brij® 96); oleil éter de polioxietileno(20) (Brij® 98); estearil éter de polioxietileno(21) (Brij® 721); estearil éter de polioxietileno(100) (Brij® 700); y otros. Los ejemplos adicionales de tensioactivo no iónicos pueden incluir Triton X®-100 (no reducido o reducido), Triton X®-114 (no reducido o reducido), Triton X®-165 y Triton X®-305 (no reducido y reducido), y otros.

En una realización, el agente 204 permeabilizante puede incluir un tensioactivo no iónico (por ejemplo, Brij® 35) en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 0,10 g/l a aproximadamente 0,20 g/l en condiciones de tinción. El tensioactivo no iónico puede estar presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 0,10 g/l a aproximadamente 0,16 g/l en condiciones de tinción. El tensioactivo no iónico puede estar presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 0,12 g/l a aproximadamente 0,14 g/l.

Los ejemplos de tensioactivos zwitteriónicos pueden incluir TDAPS (tetradecildimetilamoniopropanosulfonato), CHAPSO (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propanosulfonato), N-óxidos de alquil-N,N-dimetilo que tienen desde aproximadamente 12 hasta aproximadamente 16 átomos de carbono, N-óxido de laurildimetilamina (LO), DDAPS (N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato), y otros.

En algunas realizaciones, el agente 204 permeabilizante incluye un agente suficiente para aumentar la permeabilidad de células, membranas y/o paredes, al tiempo que deja la estructura celular sustancialmente intacta. En algunas realizaciones, el agente 204 permeabilizante hace que las membranas y/o paredes sean más permeables y/o porosas para facilitar el acceso del agente 202 de contraste de partículas.

En algunas realizaciones, el agente 204 permeabilizante se selecciona para poder crear rápidamente los poros o aberturas necesarios para permitir que el agente 202 de contraste de partículas entre en las células de la muestra.

A través de esfuerzos y experimentación no triviales, se ha encontrado que pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces para la composición 210 de agente de contraste de partículas de la invención con el uso de un agente 204 permeabilizante que incluye 5PD-Lytic disponible de Clinical Diagnostic Solutions (CDS) en Ft. Lauderdale, Florida. 5PD-Lytic incluye saponina. 5PD-Lytic se describe generalmente en la patente estadounidense 6.632.676. Pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces cuando se usa 5PD-Lytic a razones de aproximadamente el 23,3% en peso de la composición 210 de agente de contraste de partículas. Pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces cuando se usa 5PD-Lytic a razones de casi el 23,3% en peso de la composición 210 de agente de contraste de partículas.

Tal como se define en las reivindicaciones, un agente 204 permeabilizante que comprende 5PD Lytic incluye una saponina presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 0,01 mg/l a aproximadamente 100 mg/l en condiciones de tinción. En algunas realizaciones, la saponina está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 11 mg/l. En realizaciones sorprendentemente eficaces, la saponina está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 0,2 mg/l en condiciones de tinción. En realizaciones sorprendentemente eficaces, la saponina está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de casi 0,2 mg/l en condiciones de tinción. La concentración de la disolución madre de saponina antes de la adición a la muestra puede ser de hasta 100X la concentración de saponina final. Puesto que la saponina comercial no es un material puro, pueden ser necesarios ajustes en la concentración para diversos lotes de polvo de saponina suministrados. Dentro de los límites, es posible cambiar la concentración de saponina añadida a una muestra de orina dada, si también se realiza un cambio de compensación en el volumen del reactivo de saponina. En algunas realizaciones, la saponina puede ser un éster de saponina sustituido con amonio cuaternario.

#### 15 AGENTE DE FIJACIÓN

En algunas realizaciones, el agente 206 de fijación puede seleccionarse para garantizar que las células y estructuras celulares deseadas no se degraden durante la tinción y obtención de imágenes. Los ejemplos de agentes de fijación pueden incluir glutaraldehído; formaldehído; diazolidinilurea; agentes de reticulación; picrato de amoníaco en solución salina isotónica (por ejemplo, para tinción con azul de metileno); alcohol etílico; metanol (por ejemplo, a temperatura ambiente, -20°C o -70°C); Susa de Heidenhain - HgCl<sub>2</sub>, NaCl ácido tricloroacético, formalina; Bouin - ácido pícrico, formalina, ácido acético; Duboscq-Brasil - Bouin con EtOH al 80%; Carnoy - EtOH, cloroformo, ácido acético; Zenker - HgC<sub>12</sub>, K<sub>2</sub>CrO<sub>7</sub>, NaSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; acetocarmina; Gatensby - ácido crómico, tetróxido de osmio, NaCl; Baker - formalina, CaCl<sub>2</sub>; Smith - K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, formalina, ácido acético; verde de metilo al 1%, ácido acético al 1%; fenol, formalina, glicerol, violeta de genciana; Schaudin - HgCl<sub>2</sub>, EtOH, ácido acético; Champy - ácido crómico, K<sub>2</sub>CrO<sub>7</sub>, OsO<sub>4</sub>; Fleming - ácido crómico, OsO<sub>4</sub>, ácido acético; formol-plata - formaldehído, AgNO<sub>3</sub>; fijador de tejido de Streck - bronopol, diazolidinilurea, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, citrato de sodio; imidazolidinilurea al 1% en PBS; glioxal: Glyofix, Prefer, Safefix, Histochoice; Glydant - hidantoína; dimetilolurea; hidroximetilglicinato de sodio; Karnovsky; cloruro mercuríco (B-5); Hollande; y otros.

En algunas realizaciones, el agente 206 de fijación puede ser un agente oxidante, un mercurial, un picrato, un fijador de efecto de protección de disolvente orgánico mediado por tampón hepes-ácido glutámico (HOPE), o un conservante soluble en agua. Los ejemplos de agentes oxidantes incluyen dicromato de potasio, ácido crómico, permanganato de potasio, y otros. Los ejemplos de mercurial incluyen B-5, fijador de Zernker, y otros. Los ejemplos de conservantes solubles en agua incluyen metilparabeno, propilparabeno, dimetilolurea, 1-óxido de 2-piridintiol, ácido sórbico, sorbato de potasio, y otros.

A través de esfuerzos y experimentación no triviales, se ha encontrado que pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces en algunas realizaciones de la composición 210 de agente de contraste de partículas con el uso de un agente 206 de fijación que incluye al menos uno de glutaraldehído, formaldehído y diazolidinilurea.

En algunas realizaciones, pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces usando un agente 206 de fijación que incluye glutaraldehído a o menos del 0,1% en peso.

En algunas realizaciones, pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces usando un agente 206 de fijación que incluye diazolidinilurea a o alrededor de 216 mM.

#### COMPONENTES ADICIONALES

En algunas realizaciones, pueden combinarse opcionalmente componentes 212 adicionales opcionales en el bloque 208 en la composición 210 de agente de contraste de partículas. Los ejemplos de componentes 212 adicionales pueden incluir un agente de ajuste del pH, componentes de tampón, un azúcar, un alcohol de azúcar, un agente de ajuste osmótico, un estabilizador de proteínas, un agente antimicrobiano, una modificador de la fuerza iónica, un tensoactivo y un agente quelante, y otros. En algunas realizaciones, pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces cuando la composición 210 de agente de contraste de partículas incluye una solución salina tamponada con fosfato. En algunas realizaciones, la composición 210 de agente de contraste de partículas puede incluir un agente de ajuste del pH para mantener el pH a o alrededor de 3. En algunas realizaciones, pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces cuando la composición 210 de agente de contraste de partículas incluye un agente de ajuste del pH para mantener el pH a o alrededor del de la muestra de orina.

En algunas realizaciones, la composición 210 de agente de contraste de partículas comprende uno o más azúcares y/o alcoholes de azúcar, u otros estabilizadores de membrana. El azúcar y los alcoholes de azúcar en disolución pueden ayudar a conservar células/membranas celulares. Los ejemplos de azúcares adecuados incluyen trehalosa, maltosa, sacarosa, glicerol, maltulosa, isomaltosa, celobiosa, lactulosa, gentiobulosa, melibiosa, manobiosa, palatinosa, kojibiosa, nigerosa, soforosa, manitol, sorbitol, xilitol, inositol, ramnitol, fucitol, ribitol, treitol, eritritol y glucitol. Específicamente, se ha encontrado que el azúcar trehalosa inhibe la hemólisis por saponina. La

composición 210 de agente de contraste de partículas puede incluir trehalosa en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 200 mM en condiciones de tinción. La trehalosa puede incluirse en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 mM en condiciones de tinción. La trehalosa puede incluirse en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 67,7 mM en condiciones de tinción. La trehalosa es un estabilizador de tanto proteínas como membranas y puede usarse para mantener la integridad celular en condiciones extremas de secado, calentamiento, congelación y/o disgregación enzimática de tejidos.

En algunas realizaciones, la composición 210 de agente de contraste de partículas comprende uno o más estabilizadores de proteínas u otros solutos compatibles que contrarrestan los efectos desestabilizantes de la urea. Los ejemplos de estabilizadores de proteínas adecuados incluyen estabilizadores de proteínas de metilamina y aminoácido, N-óxido de trimetilamina (TMAO), trimetilamina, glicerofosforilcolina, betaína, glicina-betaína, pipercolato-betaína, sarcosina, N-carbamoil-L-glutamina-1-amida, N-acetilglutaminilglutamina-amida, taurina, dimetiltaurina, hipotaurina, N-metiltaurina, tiotaurina, octopina, arginina, glicina, dimetilglicina, N-trimetilglicina, ecotoína, prolina, prolina-betaína, beta-alanina, glutamato, glutamato-betaína, N-acetilbetalisina, o-sulfato de colina, GABA, homarina y sulfonopropionato de dimetilo. En una realización, una estrategia de soluto compatible puede aumentar la intensidad de tinción de células en muestras de orina al tiempo que se estabilizan proteínas celulares. N-óxido de trimetilamina (TMAO) puede contrarrestar la solubilización (destabilización) de proteína por la urea y el cloruro de sodio encontrados en la orina. El TMAO puede equilibrar los efectos de desestabilizadores de proteínas en la razón de una parte de TMAO con respecto a dos partes desestabilizador de proteínas. En algunas realizaciones, la composición 210 de agente de contraste de partículas puede incluir TMAO en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 200 mM en condiciones de tinción.

En algunas realizaciones, la composición 210 de agente de contraste de partículas puede incluir un tampón para ajustar el pH. El tampón también puede incluir al menos uno de un modificador/agente de viscosidad, un fijador, un modificador de la fuerza iónica, un tensioactivo y un detergente adecuados.

En algunas realizaciones, la composición 210 de agente de contraste de partículas puede incluir un agente de modificación de la viscosidad. En algunas realizaciones, el agente de modificación de la viscosidad puede ser glicerol. El % de glicerol puede variar dependiendo de la propiedad deseada de la muestra y analizador particulares usados. Los ejemplos de agentes de modificación de la viscosidad pueden incluir PVP, hidrocoloides naturales (y derivados), tales como carragenanos, goma de algarroba, goma guar y gelatina; azúcares (y derivados), tales como dextrosa, fructosa; polidextrosa; dextranos; polidextranos; sacáridos; y polisacáridos; hidrocoloides semisintéticos (y derivados), tales como metilcelulosa, carboximetilcelulosa; hidrocoloides sintéticos (y derivados), tales como Carbopol®; y otros.

#### PROCESO DE TINCIÓN DE UNA ETAPA, RÁPIDO

La figura 3 es un diagrama de flujo de un proceso 300 de tinción de una etapa, rápido según una realización. Mientras que el proceso 300 de tinción de una etapa, rápido puede contener varias subetapas, el término "una etapa" se usa para identificar que no es necesario que la muestra se introduzca en múltiples disoluciones diferentes durante el procedimiento de tinción. La composición 210 de agente de contraste de partículas se prepara en el bloque 302, tal como se describió anteriormente con referencia a la figura 2. Opcionalmente, en algunas realizaciones, pueden purificarse componentes, tales como cualquier agente 202 de contraste de partículas, en el bloque 306. La purificación de los agentes 202 de contraste de partículas puede reducir el nivel de precipitados formados tras el contacto con una muestra, reduciendo de ese modo el fondo y mejorando los resultados del análisis de muestras de orina basado en imágenes con una necesidad disminuida de revisión adicional de imágenes o preparaciones microscópicas húmedas, o microscopio preparado manualmente.

En el bloque 308, la composición 210 de agente de contraste de partículas se combina con la muestra. La composición 210 de agente de contraste de partículas puede combinarse con la muestra de cualquier modo adecuado, incluyendo mezclado entre sí. La combinación en el bloque 308 puede incluir diluir la muestra con una determinada cantidad de composición 210 de agente de contraste de partículas. La muestra puede diluirse con la composición 210 de agente de contraste de partículas. La cantidad de dilución puede seleccionarse para proporcionar un número óptimo de células por fotograma durante el análisis basado en imágenes.

A través de esfuerzos y experimentación no triviales, se ha encontrado que pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces en algunas realizaciones de la composición 210 de agente de contraste de partículas cuando se combina con la muestra hasta el 20% (v/v) de la composición 210 de agente de contraste de partículas en la mezcla de muestra resultante. El porcentaje de composición 210 de agente de contraste de partículas en la mezcla de muestra resultante puede ser de aproximadamente el 1%, el 2%, el 3%, el 4%, el 5%, el 6%, el 7%, el 8%, el 9%, el 10%, el 11%, el 12%, el 13%, el 14%, el 15%, el 16%, el 17%, el 18%, el 19% o aproximadamente el 20% (v/v). Pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces mezclando la composición 210 de agente de contraste de partículas con la muestra a un porcentaje del 15% de composición 210 de agente de contraste de

partículas (es decir, el 85% de muestra) en la mezcla de muestra resultante.

A través de esfuerzos y experimentación no triviales, se ha encontrado que pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces en algunas realizaciones de la composición 210 de agente de contraste de partículas formulada para mezclarse con una muestra de orina a un porcentaje en o por debajo del 15%. La tinción con una baja dilución puede hacer que el sistema de análisis de muestras de orina basado en imágenes sea muy eficaz.

En algunas realizaciones, la muestra se combina con la composición 210 de agente de contraste de partículas a temperaturas elevadas, tales como cualquiera de las temperaturas descritas a continuación con referencia a la incubación.

En determinadas realizaciones, pueden prepararse o procesarse las muestras (por ejemplo concentrarse, diluirse) antes de combinarlas con la composición 210 de agente de contraste de partículas.

Tal como se usa en el presente documento, la muestra y la composición 210 de agente de contraste de partículas combinadas se denominan mezcla de muestra.

En el bloque 310, la mezcla de muestra se incuba durante una determinada cantidad de tiempo a una determinada temperatura. La incubación puede aumentar la permeabilidad de las células o sus estructuras internas, permitiendo que el agente 202 de contraste de partículas se infiltre mejor en las células o estructuras celulares. El tiempo y la temperatura de incubación pueden seleccionarse para permitir que la composición 210 de agente de contraste de partículas permee, fije y tinte apropiadamente la muestra.

En una realización, la composición 210 de agente de contraste de partículas puede incluir un tensioactivo y puede usarse calor elevado durante la incubación para lograr la permeabilización de la membrana para conservar la integridad de RBC y todavía lograr una eficacia de tinción de WBC, células epiteliales y bacterias a la resolución deseada.

A través de esfuerzos y experimentación no triviales, se ha encontrado que pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces en algunas realizaciones de la composición 210 de agente de contraste de partículas con incubación de la mezcla de muestra a temperaturas de entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 50°C durante de aproximadamente 1 a 90 segundos. La mezcla de muestra puede calentarse hasta temperaturas de entre aproximadamente 41°C y aproximadamente 44°C. La mezcla de muestra puede incubarse durante entre 1 y 60 segundos. La mezcla de muestra puede incubarse durante entre 30 y 35 segundos. La mezcla de muestra puede incubarse durante menos de 30 segundos. En algunas realizaciones, pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces incubando la mezcla de muestra entre aproximadamente 42°C y aproximadamente 43°C durante aproximadamente 30 segundos.

En algunas realizaciones, la combinación en el bloque 308 y la incubación en el bloque 310 se completan en aproximadamente la misma cantidad de tiempo o menos tiempo que el tiempo que se tarda en procesar una mezcla de muestra en el equipo de obtención de imágenes y en lavar y/o limpiar las líneas del equipo de obtención de imágenes. De este modo, pueden obtenerse imágenes de una primera mezcla de muestra mientras que una segunda mezcla de muestra está combinándose e incubándose. Una vez que se han obtenido imágenes de la primera mezcla de muestra y el equipo de obtención de imágenes se ha limpiado, pueden obtenerse imágenes inmediatamente de la segunda mezcla de muestra.

En realizaciones alternativas, la combinación en el bloque 308 y la incubación en el bloque 310 se completan en menos de dos veces el tiempo que se tarda en procesar una mezcla de muestra en el equipo de obtención de imágenes y en lavar y/o limpiar las líneas del equipo de obtención de imágenes. De este modo, mientras están obteniéndose imágenes de una primera mezcla de muestra, una segunda mezcla de muestra puede estar lista para que se obtengan imágenes de la misma, y una tercera mezcla de muestra y cuarta mezcla de muestra pueden estar en el proceso de combinarse e incubarse. Una vez que se han obtenido imágenes de la primera mezcla de muestra y el equipo de obtención de imágenes se ha limpiado, pueden obtenerse imágenes inmediatamente de la segunda mezcla de muestra. La tercera mezcla de muestra puede acabar su combinación e incubación y la cuarta mezcla de muestra puede estar todavía combinándose e incubándose. Una vez que se han obtenido imágenes de la segunda mezcla de muestra y el equipo de obtención de imágenes se ha limpiado, pueden obtenerse imágenes de la tercera mezcla de muestra, al tiempo que la cuarta mezcla de muestra comienza a terminar de combinarse e incubarse y una quinta mezcla de muestra comienza a combinarse e incubarse. El proceso puede continuar indefinidamente para obtener imágenes de manera continua de mezclas de muestra.

A través de esfuerzos y experimentación no triviales, se ha encontrado que pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces a través de una combinación de determinadas realizaciones de la composición 210 de agente de contraste de partículas, determinados modos de combinación de la composición 210 de agente de contraste de partículas con la muestra y determinados modos de incubación de la mezcla de muestra.

Específicamente, pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces usando una composición 210 de agente

de contraste de partículas que incluye cristal violeta con una pureza del 80% o más a aproximadamente 0,57 mM en condiciones de tinción, el 23,3% en peso de 5PD-Lytic y el 0,05% de Proclin 300; en donde el agente 210 de contraste de partículas se combina con la muestra resultante en de aproximadamente el 15% a aproximadamente el 20% de concentración de la composición de agente de contraste de partículas en peso de la mezcla de muestra; y en donde la mezcla de muestra resultante se incubaba a de aproximadamente 40°C a aproximadamente 50°C durante de aproximadamente 30 a 35 segundos.

Determinadas composiciones 210 de agente de contraste de partículas y procedimientos de tinción eficaces permiten una tinción rápida de muestras con una razón de orina con respecto a reactivo relativamente alta. Determinadas composiciones 210 de agente de contraste de partículas y procedimientos de tinción eficaces permiten una tinción rápida de muestras de manera que diversos componentes celulares, lóbulos nucleares y estructuras granulares son claramente distinguibles. Determinadas composiciones 210 de agente de contraste de partículas y procedimientos de tinción eficaces son adecuados para tinción supravital. Determinadas composiciones 210 de agente de contraste de partículas y procedimientos de tinción eficaces generan distinciones visuales para la clasificación y subclasificación de partículas. Determinadas composiciones 210 de agente de contraste de partículas y procedimientos de tinción eficaces son eficaces para potenciar las características de contenido intracelular de partículas en una muestra de suero, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido sinovial, líquido seminal, líquido peritoneal, líquido amniótico, líquido de lavado, líquido de aspirado de médula ósea, efusiones, exudados o sangre. Determinadas composiciones 210 de agente de contraste de partículas y procedimientos de tinción eficaces son eficaces para teñir neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, plaquetas, reticulocitos, glóbulos rojos nucleados, blastocitos, promielocitos, mielocitos, metamielocitos, cilindros, bacterias, células epiteliales y/o parásitos. Determinadas composiciones 210 de agente de contraste de partículas y procedimientos de tinción eficaces son eficaces para generar distinciones visuales para la clasificación y subclasificación de partículas, por ejemplo, proporcionando una tinción diferencial de gránulos primarios y secundarios en células, tal como para ayudar en la subclasificación de granulocitos inmaduros y su determinación de edad basándose en la tinción diferencial o la potenciación de gránulos primarios y secundarios. Determinadas composiciones 210 de agente de contraste de partículas y procedimientos de tinción eficaces son eficaces para generar distinciones visuales para contar y caracterizar glóbulos blancos, células epiteliales y/o bacterias, incluyendo la clasificación y subclasificación de glóbulos blancos. Puede facilitarse la identificación de elementos formados. Determinadas composiciones 210 de agente de contraste de partículas y procedimientos de tinción eficaces son eficaces para generar distinciones visuales en células vitales y/o viables y/o células con estructuras que permanecen sustancialmente intactas. Determinadas composiciones 210 de agente de contraste de partículas y procedimientos de tinción eficaces son eficaces para teñir bacterias, parásitos o tricomonas. Determinadas composiciones 210 de agente de contraste de partículas y procedimientos de tinción eficaces son eficaces para identificar, predecir, diagnosticar, pronosticar y/o apoyar un diagnóstico de un estado, enfermedad, infección y/o síndrome y/o monitorizar si un sujeto responde o no responde al tratamiento. Determinadas composiciones 210 de agente de contraste de partículas y procedimientos de tinción eficaces son eficaces para la tinción de células y/o inclusiones de elementos celulares en cilindros urinarios, lo que puede ser útil para la subclasificación de cilindros.

La tinción rápida permitida por determinadas composiciones 210 de agente de contraste de partículas y procedimientos de tinción eficaces descritos en el presente documento puede usarse con procedimientos de análisis y/u obtención de imágenes manuales o semiautomatizados.

A través de esfuerzos y experimentación no triviales, se ha encontrado que pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces cuando se usa una composición 210 de agente de contraste de partículas compuesta tal como se enumera en la tabla 1.

TABLA 1

0,150 ml	Cristal violeta 1 mg/ml disuelto en una disolución lítica (por ejemplo, CDS 5PD-Lytic)
0,150 ml	Solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2

La figura 4 es una ilustración representativa de partículas seleccionadas de una muestra urinaria teñida con la composición 210 de agente de contraste de partículas expuesta en la tabla 1 y teñida usando los procedimientos de tinción de una etapa, rápidos expuestos anteriormente, pipeteando específicamente 300 microl de la composición 210 de agente de contraste de partículas expuesta en la tabla 1 en un tubo de ensayo y mezclando con 1,7 ml de muestra de orina, tras lo cual se calentó la mezcla de muestra durante 30 segundos en un baño de agua a 60°C. Pueden diferenciarse visualmente glóbulos rojos, glóbulos blancos, células epiteliales escamosas, cilindros, cristales y levaduras.

A través de esfuerzos y experimentación no triviales, se ha encontrado que pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces cuando se usa una composición 210 de agente de contraste de partículas compuesta tal como se enumera en la tabla 2.

TABLA 2

16 g	1,07 mM	Tetronic 1107
25,6 g	67,7 mM	Trehalosa
60 g	216 mM	Diazolidinilurea
0,792 g	1,94 mM	Cristal violeta
0,7920 g	2,05 mM	Safranina O
0,004 g	0,0002 mM	Saponina
5 ml	15 ppm	Proclin 300
6 g	54,5 mM	Dietilamina HCl (higroscópico)
1 g	12,2 mM	Dimetilamina HCl (higroscópico)
Añadir hasta 1 l		Agua desionizada

5 A través de esfuerzos y experimentación no triviales, se ha encontrado que pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces cuando se usa una composición 210 de agente de contraste de partículas compuesta tal como se enumera en la tabla 3.

TABLA 3

0,57 mM	Cristal violeta
76,7% (peso)	Agua desionizada
23,3% (peso)	5 PD Lytic (CDS)
0,05% (peso)	Proclin 300

10 A través de esfuerzos y experimentación no triviales, se ha encontrado que pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces cuando se usa una composición 210 de agente de contraste de partículas compuesta tal como se enumera en la tabla 4.

TABLA 4

15

0,57 mM	Cristal violeta
76,7% (peso)	Agua desionizada
23,3% (peso)	5 PD Lytic (CDS)
0,05% (peso)	Proclin 300
119 mM	Cloruro de sodio
2,08 mM	Fosfato de sodio dibásico
1,18 mM	Fosfato de potasio monobásico

En algunas realizaciones, se indican características de células de las que se han obtenido imágenes teñidas mediante las composiciones de agente de contraste de partículas de esta divulgación en la tabla 5.

20

TABLA 5

	Tamaño (en relación con RBC)	Forma	Color	Detalles
RBC	Convencional	Redonda		Centro claro
WBC	Grande	Redonda	Núcleo teñido	Núcleo y gránulos
Células epiteliales	Pequeño a grande	Diversa	Núcleo teñido	Núcleo y gránulos
Cristales	Pequeño a grande	Diversa	Natural	Esquinas
Bacterias	Muy pequeño y bacilos grandes	Puntos o bacilos	Teñido	
Levaduras	Muy pequeño a grande	Redonda individual o grumos		
Esperma	Pequeño	Filamentos		Cabeza y cola
Cilindros	Grande a muy grande	Cilindroide		Transparente
Moco	Pequeña a muy grande	Filamentos o cilindroide		Transparente
Tricomonas	Grande	Redonda	Teñido	Cola

En determinadas realizaciones, la composición 210 de agente de contraste de partículas se formula para lograr estabilidad, facilidad de almacenamiento, eliminación y/o toxicidad limitada.

25

## EXPERIMENTACIÓN TEMPRANA

Tal como se describe con referencia a los ejemplos a continuación, se sometieron a prueba numerosas composiciones y métodos de tinción y se modificaron con el fin de dar como resultado las realizaciones dadas a conocer anteriormente.

En un ejemplo 1 temprano, una composición de agente de contraste de partículas incluía el 0,1% cristal violeta a 67  $\mu\text{M}$ , 5PD-Lytic al 3,5% y una solución salina tamponada con fosfato con  $\text{NaPO}_4$  a 332  $\mu\text{M}$  y  $\text{KPO}_4$  a 188  $\mu\text{M}$ . Se mezcló la composición de agente de contraste de partículas con una muestra de orina de 2,55 ml. Los resultados, tal como se observa en la figura 5, eran demasiado claros y fueron ineficaces para diferenciar apropiadamente partículas y células. Para mejorar la tinción, se intentó el ejemplo 2.

En un ejemplo 2 posterior, una composición de agente de contraste de partículas incluía cristal violeta a 86  $\mu\text{M}$ , 5PD-Lytic al 3,5% y una solución salina tamponada con fosfato con  $\text{NaPO}_4$  a 312  $\mu\text{M}$  y  $\text{KPO}_4$  a 177  $\mu\text{M}$ . Se mezcló la composición de agente de contraste de partículas con una muestra de orina de 2,55 ml. Los resultados, tal como se observa en la figura 6, fueron ineficaces para diferenciar apropiadamente partículas y células. Para mejorar la tinción, se intentó el ejemplo 3.

En un ejemplo posterior 3, una composición de agente de contraste de partículas incluía una tinción de cristal violeta, agua desionizada y diluyente adicional mezclados con la muestra de orina a concentraciones respectivas de 86  $\mu\text{M}$ , el 13,5% y el 1%. Se mezcló la composición de agente de contraste de partículas con una muestra de orina de 1,7 ml. Los resultados, tal como se observa en la figura 7, estaban muy ligeramente teñidos y fueron ineficaces para diferenciar apropiadamente partículas y células. Para mejorar la tinción, se intentó el ejemplo 4.

En un ejemplo 4 posterior, una composición de agente de contraste de partículas incluía una tinción de cristal violeta y agua desionizada mezcladas con la muestra de orina a concentraciones respectivas de 86  $\mu\text{M}$  y el 13,5%. Se mezcló la composición de agente de contraste de partículas con una muestra de orina de 1,7 ml. Los resultados, tal como se observa en la figura 8, presentaban una tinción pálida y fueron ineficaces para diferenciar apropiadamente partículas y células. Para mejorar la tinción, se intentó el ejemplo 5.

En un ejemplo 5 posterior, una composición de agente de contraste de partículas incluía cristal violeta a 150  $\mu\text{M}$ , 5PD-Lytic al 3,5%, agua desionizada al 30,6% y saponina a 0,0037 mg/ml. Se mezcló la composición de agente de contraste de partículas con una muestra de orina de 1,7 ml. Los resultados, tal como se observa en la figura 9, contenían moco teñido en exceso y fueron ineficaces para diferenciar apropiadamente partículas y células. Para mejorar la tinción, se intentó el ejemplo 6.

En un ejemplo 6 posterior, una composición de agente de contraste de partículas incluía cristal violeta a 52  $\mu\text{M}$ , 5PD-Lytic al 3,5%, agua desionizada al 11,3% y saponina a 0,0075 mg/ml. Se mezcló la composición de agente de contraste de partículas con una muestra de orina de 1,7 ml. Los resultados, tal como se observa en la figura 10, eran demasiado claros y fueron ineficaces para diferenciar apropiadamente partículas y células. Para mejorar la tinción, se intentó el ejemplo 7.

En un ejemplo 7 posterior, una composición de agente de contraste de partículas incluía cristal violeta a 100  $\mu\text{M}$ , 5PD-Lytic al 3,5%, agua desionizada al 9,4% y saponina a 0,0075 mg/ml. Se mezcló la composición de agente de contraste de partículas con una muestra de orina de 1,7 ml. Los resultados, tal como se observa en la figura 11, eran demasiado claros y fueron ineficaces para diferenciar apropiadamente partículas y células. Para mejorar la tinción, se intentó el ejemplo 8.

En un ejemplo 8 posterior, una composición de agente de contraste de partículas incluía cristal violeta a 91  $\mu\text{M}$ , 5PD-Lytic al 3,5% y una solución salina tamponada con fosfato con  $\text{NaPO}_4$  a 203  $\mu\text{M}$  y  $\text{KPO}_4$  a 115  $\mu\text{M}$ . Se mezcló la composición de agente de contraste de partículas con una muestra de orina de 1,7 ml. Los resultados, tal como se observa en la figura 12, contenían moco teñido en exceso y fueron ineficaces para diferenciar apropiadamente partículas y células. Para mejorar la tinción, se intentó el ejemplo 9.

En un ejemplo 9 posterior, una composición de agente de contraste de partículas incluía cristal violeta a 150  $\mu\text{M}$ , 5PD-Lytic al 3,5%, agua desionizada al 7,3% y saponina a 0,0075 mg/ml. Se mezcló la composición de agente de contraste de partículas con una muestra de orina de 1,7 ml. Los resultados, tal como se observa en la figura 13, contenían moco teñido en exceso y fueron ineficaces para diferenciar apropiadamente partículas y células. Para mejorar la tinción, se intentó el ejemplo 10.

En un ejemplo 10 posterior, una composición de agente de contraste de partículas incluía cristal violeta a 150  $\mu\text{M}$ , 5PD-Lytic al 3,5% y agua desionizada al 8,8%. Se mezcló la composición de agente de contraste de partículas con una muestra de orina de 1,7 ml. Los resultados, tal como se observa en la figura 14, contenían tinción irregular y fueron ineficaces para diferenciar apropiadamente partículas y células. Para mejorar la tinción, se intentó el ejemplo 11.

En un ejemplo 11 posterior, una composición de agente de contraste de partículas incluía cristal violeta a 150  $\mu\text{M}$ ,

5PD-Lytic al 3,5%, agua desionizada al 8,8%, saponina a 0,0075 mg/ml y gluteraldehído al 0,03%. Se mezcló la composición de agente de contraste de partículas con una muestra de orina de 1,7 ml. Los resultados, tal como se observa en la figura 15, contenían moco teñido en exceso y fueron ineficaces para diferenciar apropiadamente partículas y células. Para mejorar la tinción, se intentó el ejemplo 12.

5 En un ejemplo 12 posterior, una composición de agente de contraste de partículas incluía cristal violeta a 86  $\mu\text{M}$ , 50% Erythrolyze (fabricado por Beckman Coulter) al 3,5% y una solución salina tamponada con fosfato con  $\text{NaPO}_4$  a 312  $\mu\text{M}$  y  $\text{KPO}_4$  a 177  $\mu\text{M}$ . Se mezcló la composición de agente de contraste de partículas con una muestra de orina de 1,7 ml. Los resultados, tal como se observa en la figura 16, fueron ineficaces para diferenciar apropiadamente partículas y células. Para mejorar la tinción, se intentó el ejemplo 13.

10 En un ejemplo 13 posterior, una composición de agente de contraste de partículas incluía cristal violeta a 285  $\mu\text{M}$ , 5PD-Lytic al 3,5% y una solución salina tamponada con fosfato con  $\text{NaPO}_4$  a 1040  $\mu\text{M}$  y  $\text{KPO}_4$  a 590  $\mu\text{M}$ . Se mezcló la composición de agente de contraste de partículas con una muestra de orina de 1,0 ml. Los resultados, tal como se observa en la figura 17, fueron ineficaces para diferenciar apropiadamente partículas y células. Para mejorar la tinción, se intentó el ejemplo 14.

15 En un ejemplo 14 posterior, una composición de agente de contraste de partículas incluía cristal violeta a 28  $\mu\text{M}$ , 5PD-Lytic al 3,5% y una solución salina tamponada con fosfato con  $\text{NaPO}_4$  a 104  $\mu\text{M}$  y  $\text{KPO}_4$  a 0,059  $\mu\text{M}$ . Se mezcló la composición de agente de contraste de partículas con una muestra de orina de 1,9 ml. Los resultados, tal como se observa en la figura 18, fueron ineficaces para diferenciar apropiadamente partículas y células. Para mejorar la tinción, se intentó el ejemplo 15.

20 En un ejemplo 15 posterior, una composición de agente de contraste de partículas incluía cristal violeta a 91  $\mu\text{M}$ , disolución de saponina/pirosulfato de potasio al 3,5% y sin solución salina tamponada con fosfato. Se mezcló la composición de agente de contraste de partículas con una muestra de orina de 1,850 ml. Los resultados, tal como se observa en la figura 19, contenían moco teñido en exceso que dio como resultado tinción ineficaz. Para mejorar la tinción, se intentó el ejemplo 16.

25 En un ejemplo 16 posterior, una composición de agente de contraste de partículas incluía cristal violeta a 86  $\mu\text{M}$ , 50% Erythrolyze (fabricado por Beckman Coulter) al 3,5% y una solución salina tamponada con fosfato con  $\text{NaPO}_4$  a 312  $\mu\text{M}$  y  $\text{KPO}_4$  a 177  $\mu\text{M}$ . Se mezcló la composición de agente de contraste de partículas con una muestra de orina de 1,7 ml. Los resultados, tal como se observa en la figura 20, no están teñidos con suficiente oscuridad y claridad. Para mejorar la tinción, se intentó el ejemplo 17.

30 En un ejemplo 17 posterior, una composición de agente de contraste de partículas incluía cristal violeta a 86  $\mu\text{M}$ , disolución de saponina/pirosulfato de potasio al 3,5% y una solución salina tamponada con fosfato con  $\text{NaPO}_4$  a 312  $\mu\text{M}$  y  $\text{KPO}_4$  a 177  $\mu\text{M}$ . Se mezcló la composición de agente de contraste de partículas con una muestra de orina de 1,7 ml. Los resultados, tal como se observa en la figura 21, no están teñidos con suficiente oscuridad y claridad. Para mejorar la tinción, se intentaron realizaciones adicionales de la composición de agente de contraste de partículas tal como se da a conocer en el presente documento.

35 En numerosos ejemplos tempranos, la concentración de agente de contraste de partículas incluía muchas variaciones de trehalosa (TRE), N-óxido de trimetilamina (TMAO), Tetric 1107 (T1107), Tetric 90R4 (T90R4), cristal violeta (CV), safranina O (SO), saponina (SAP), cloruro de dietilamina (DEA), cloruro de dimetilamina (DMA) y diazonlidinilurea (DU), tal como se describe en la tabla 6, a continuación.

TABLA 6

Ejemplo	TRE mM	TMAO mM	T1107 mg/ml	T90R4 mg/ml	CV $\mu\text{M}$	SO $\mu\text{M}$	SAP mg/l	DEA %	DMA %	DU mg/ml
18	10	84	0,02	0	60	0	0,05	0	0	0
19	10	84	0,02	0	90	0	0,05	0	0	0
20	40	84	0,02	0	90	0	0,05	0	0	0
21	10	84	0,08	0	90	0	0,05	0	0	0
22	10	330	0,02	0	90	0	0,05	0	0	0
23	10	84	0,08	0	90	0	0,05	0	0	0
24	10	84	0	0	60	0	0,05	0	0	0
25	15	126	0,03	0	60	0	0,05	0	0	0
26	10	84	0,02	0	60	0	0,05	0	0	0
27	10	84	0,02	0	60	0	0,05	0	0	0
28	10	84	0,02	0	60	0	0,05	0	0	0
29	40	84	0,02	0	60	0	0,05	0	0	0
30	10	330	0,02	0	60	0	0,05	0	0	0



## ES 2 658 692 T3

31	10	84	0,08	0	60	0	0,05	0	0	0
32	10	84	0,02	0	60	0	0,05	0	0	0
33	10	84	0,02	0	60	580	0,05	0	0	0
34	10	84	0,2	0	60	870	0,05	0	0	0
35	50	84	0,2	0	60	0	0,05	0	0	0
36	50	84	0,2	0	60	1160	0,05	0	0	0
37	10	84	0,8	0	60	1160	0,05	0	0	0
38	10	84	0,8	0	60	0	0,05	0	0	0
39	10	84	1	0	120	580	0,005	0	0	0
40	10	84	1	0	120	580	0,003	0	0	0
41	10	84	4	0	120	580	0,05	0	0	0
42	10	84	1	0	120	580	0,05	0	0	0
43	40	84	1	0	120	580	0,05	0	0	0
44	10	336	1	0	120	580	0,05	0	0	0
45	10	84	4	0	120	580	0,05	0	0	0
46	10,6	264	2	0	128	570	0,05	0	0	0
47	10,6	528	0,2	0	128	570	0,05	0	0	0
48	10,6	84	0	0	120	580	2	0	0	0
49	10,6	84	4	0	334	854	2	0	0	0
50	10,6	84	4	0	250	1139	0,2	0	0	0
51	10,6	84	4	0	300	100	0,1	0	0	0
52	10,6	252	4	0	300	100	0,1	0	0	0
53	10,6	168	4	0	300	100	0,1	0	0	0
54	10,6	168	4	0	350	100	0,1	0	0	0
55	10,6	168	4	0	400	100	0,1	0	0	0
56	10,6	151	4	0	350	100	0,1	0	0	0
57	6,8	45	1,6	0	419	100	0,2	0	0	0
58	6,8	0	1,6	0	419	100	0,2	0	0	0
59	6,8	45	0	0	419	100	0,2	0	0	0
60	0	45	1,6	0	419	100	0,2	0	0	0
61	6,8	45	1,6	0	0	100	0,2	0	0	0
62	6,8	45	1,6	0	419	0	0,2	0	0	0
63	6,8	45	1,6	0	419	100	0	0	0	0
64	6,8	0	1,6	0	419	100	0,2	0	0	0
65	6,8	0	1,6	0	308	100	0,2	0	0	0
66	6,8	0	1,6	0	167	100	0,2	0	0	0
67	6,8	0	1,6	0	167	100	0,2	0	0	3
68	6,8	0	1,6	0	200	100	0,4	0	0	6
69	6,8	0	1,6	0	250	100	0,4	0	0	6
70	6,8	0	1,6	0	300	100	0,6	0	0	3
71	6,8	0	1,6	0	300	200	0,6	0	0	3
72	6,8	0	1,6	0	300	200	0,6	0,6	0,1	3
73	6,8	0	1,6	0	200	200	0,4	0,6	0,1	6
74	6,8	0	1,6	0	300	100	0,6	0,6	0,1	3
75	6,8	0	1,6	0	350	100	0,2	0,6	0,1	3
76	13,6	0	3,2	1	400	100	0	0,6	0,15	6

Los ejemplos 18-76 no proporcionaron resultados óptimos para distinguir células.

5 Cualquier encabezado usado en el presente documento es para fines de organización sólo y no debe interpretarse que limita la divulgación o reivindicaciones de ningún modo.

**REIVINDICACIONES**

1. Composición de agente de contraste de partículas para teñir partículas de una muestra de fluido urológico para obtener imágenes en un sistema de análisis de partículas automatizado que comprende:
 

5

Cristal violeta presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de entre 50  $\mu\text{M}$  y 500  $\mu\text{M}$  en condiciones de tinción; y un agente permeabilizante que comprende 5 PD Lytic que incluye saponina, en el que la saponina está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 0,01 mg/l a aproximadamente 100 mg/l en condiciones de tinción.

10
2. Composición según la reivindicación 1, en la que:
 

15

el agente permeabilizante es 5 PD Lytic presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente el 3,5% en peso en condiciones de tinción.
3. Composición según la reivindicación 2, en la que:
 

20

el cristal violeta está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 86  $\mu\text{M}$  en condiciones de tinción.
4. Composición según la reivindicación 3, que comprende adicionalmente:
 

25

una solución salina tamponada con fosfato que incluye al menos fosfato de sodio dibásico y fosfato de potasio monobásico.
5. Composición según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un agente antimicrobiano.
6. Composición según la reivindicación 5, en la que:
 

30

el cristal violeta está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 86  $\mu\text{M}$  en condiciones de tinción; el cristal violeta tiene una pureza de aproximadamente el 80% o más; y el agente antimicrobiano es Proclin 300.

35
7. Composición según la reivindicación 6, que incluye adicionalmente:
 

40

cloruro de sodio; y una solución salina tamponada con fosfato que incluye al menos fosfato de sodio dibásico y fosfato de potasio monobásico.
8. Método de tratamiento de partículas de una muestra de fluido urológico para obtener imágenes usando un sistema de análisis de partículas automatizado que comprende:
 

45

combinar la composición de agente de contraste de partículas según la reivindicación 1 y la muestra de fluido urológico en una mezcla de muestra dando como resultado una concentración final de la composición de agente de contraste de partículas en peso de la mezcla de muestra de entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 20%; e

50

incubar la mezcla de muestra a una temperatura por encima de 20° Celsius durante menos de 90 segundos.
9. Método según la reivindicación 8, en el que:
 

55

el 5 PD Lytic está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente el 3,5% en peso en condiciones de tinción; y el cristal violeta está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 86  $\mu\text{M}$  en condiciones de tinción; la concentración final de composición de agente de contraste de partículas en peso de la mezcla de muestra es de entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 20%; y

60

la incubación de la mezcla de muestra incluye incubar la mezcla de muestra entre 30°C y 50°C durante menos de 60 segundos.
10. Método según la reivindicación 9, en el que:
 

65

la concentración final de composición de agente de contraste de partículas en peso de la mezcla de muestra es de aproximadamente el 15%; y

la incubación de la mezcla de muestra incluye incubar la mezcla de muestra entre 30°C y 50°C durante menos de 60 segundos.

- 5
11. Método según la reivindicación 10, en el que:  
la incubación de la mezcla de muestra incluye incubar la mezcla de muestra entre 40°C y 50°C durante entre 30 y 35 segundos.
- 10
12. Método según la reivindicación 11, en el que:  
el cristal violeta tiene una pureza de aproximadamente el 80% o más; y  
la composición de agente de contraste de partículas comprende además Proclin 300.
- 15
13. Método según la reivindicación 12, en el que:  
la composición de agente de contraste de partículas comprende además cloruro de sodio y una solución salina tamponada con fosfato que incluye al menos fosfato de sodio dibásico y fosfato de potasio monobásico.

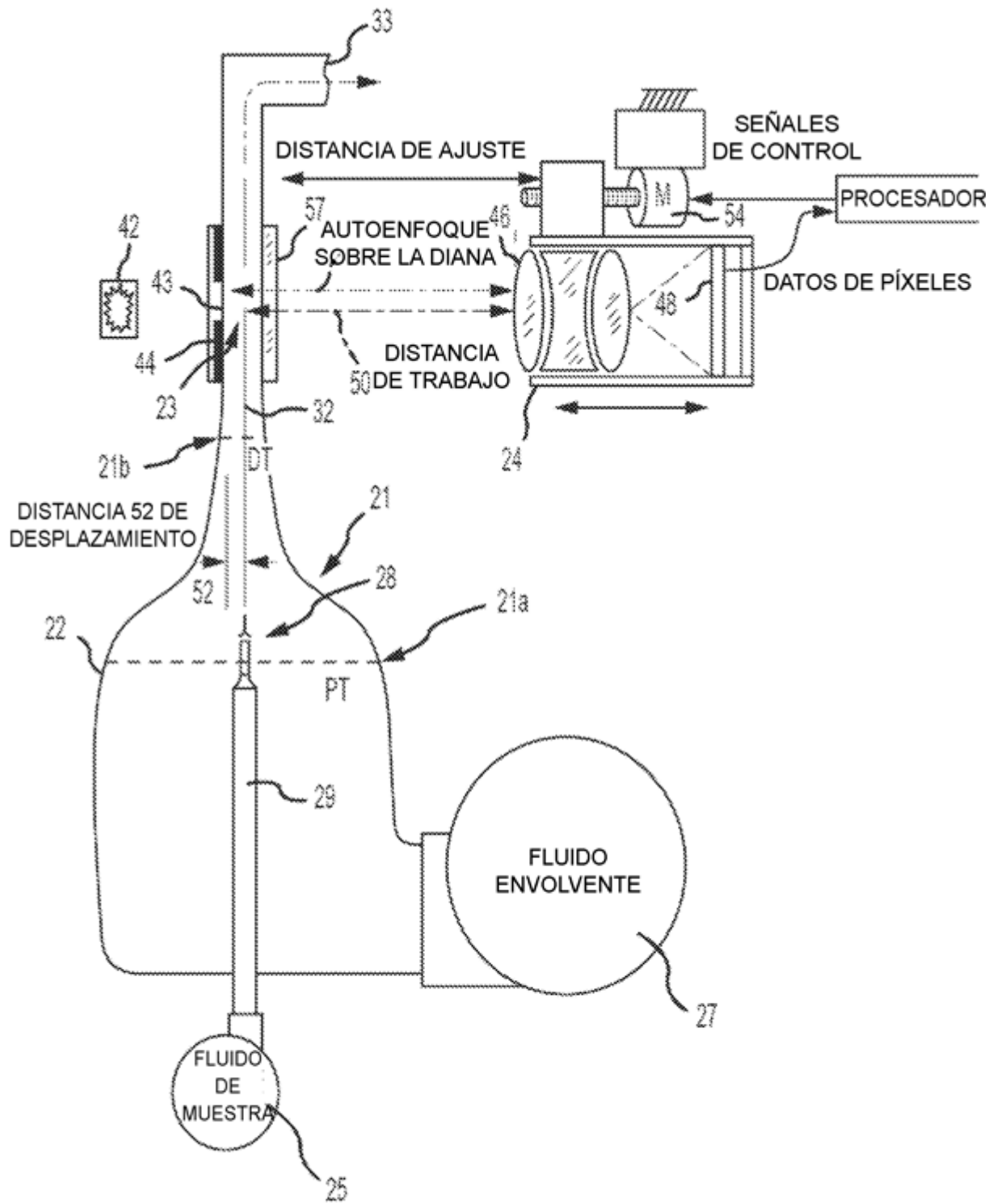


FIG.1

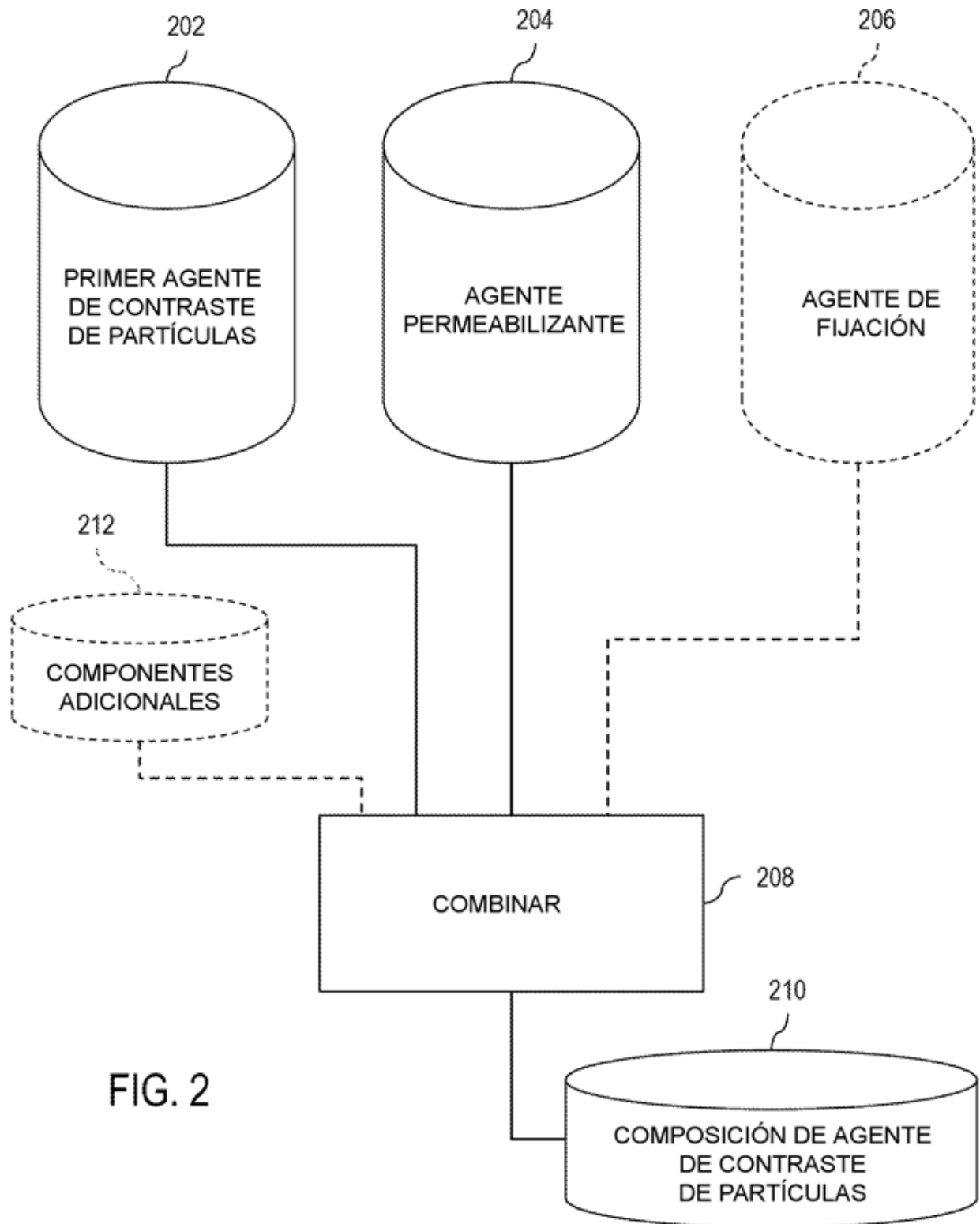


FIG. 2

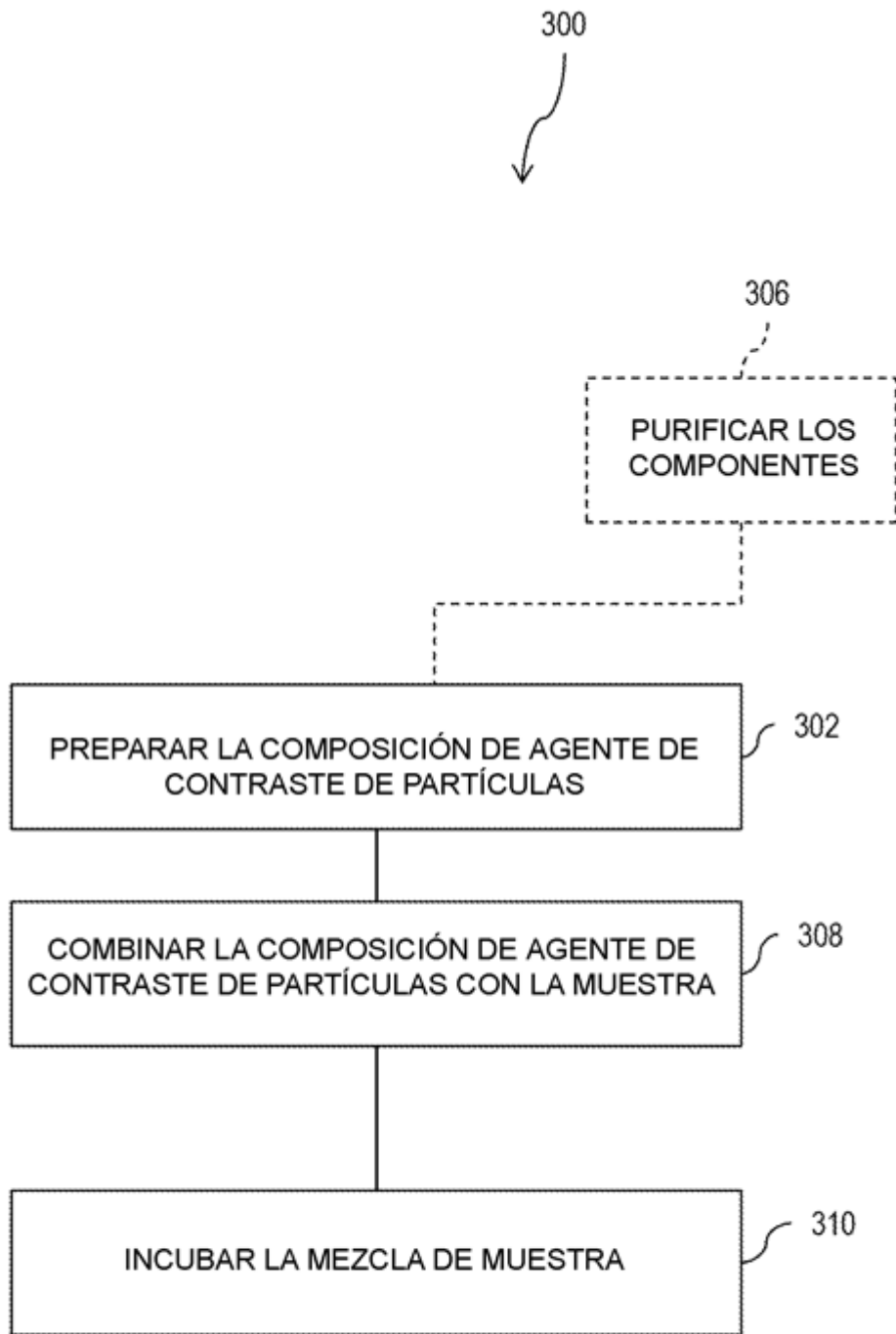


FIG. 3

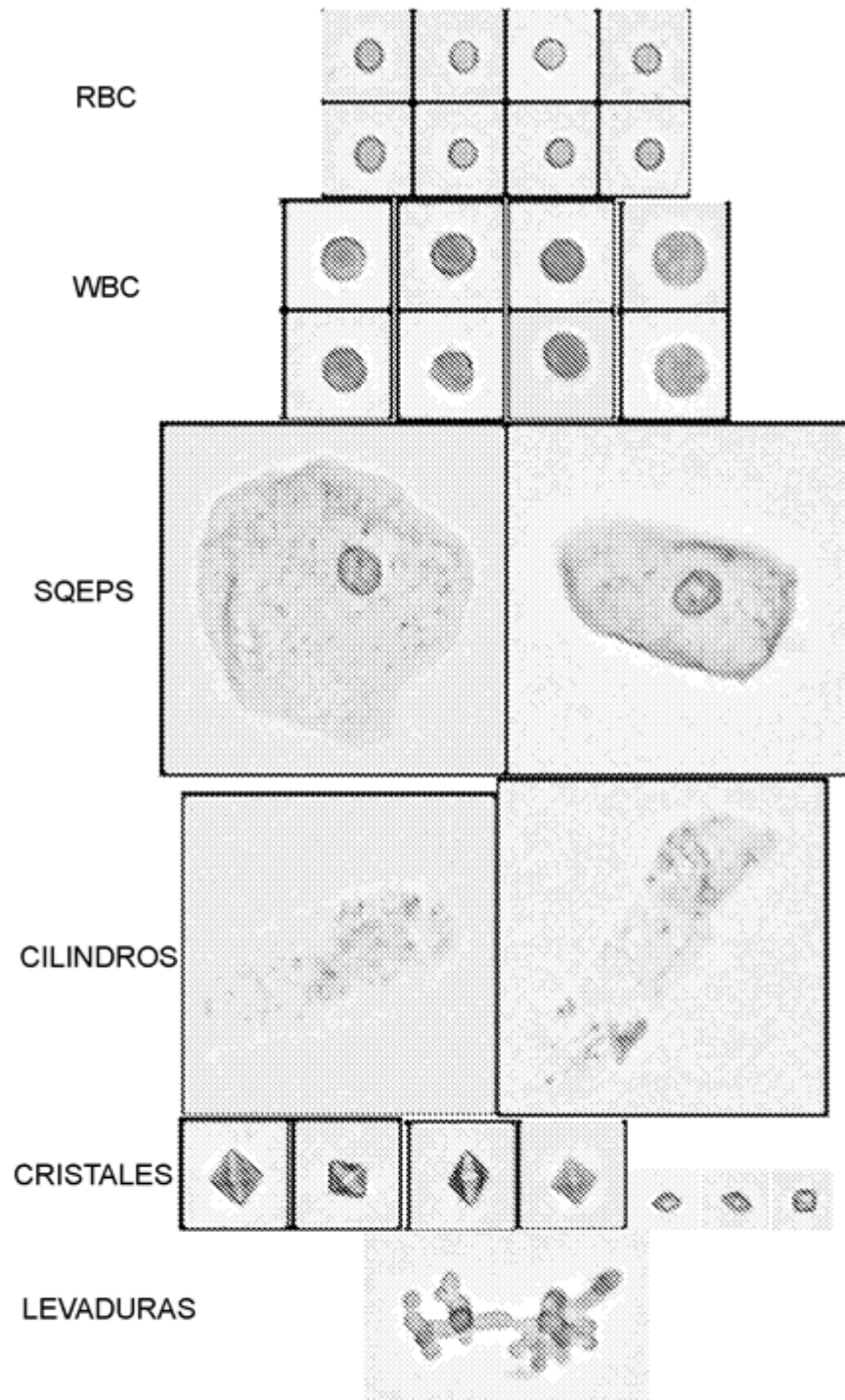


FIG. 4

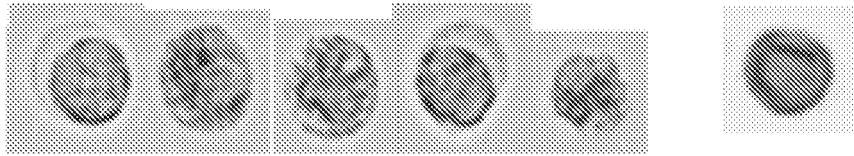


FIG. 5

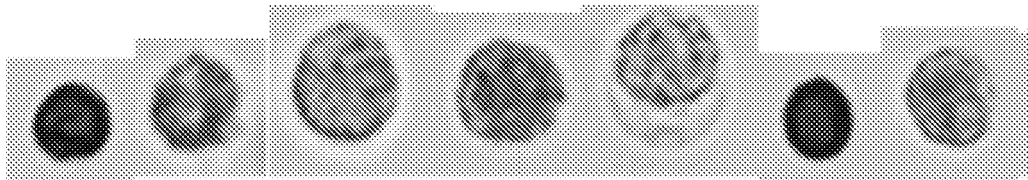


FIG. 6

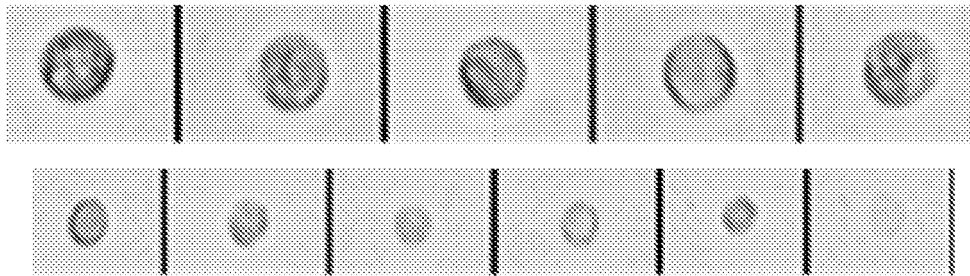


FIG. 7



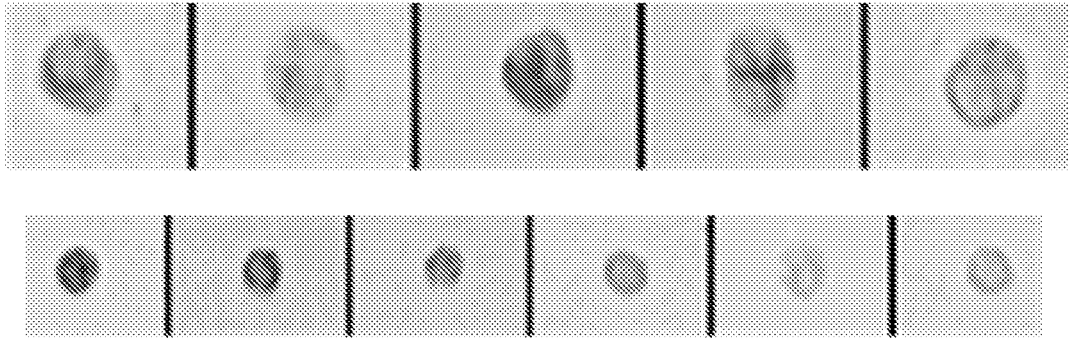


FIG. 8

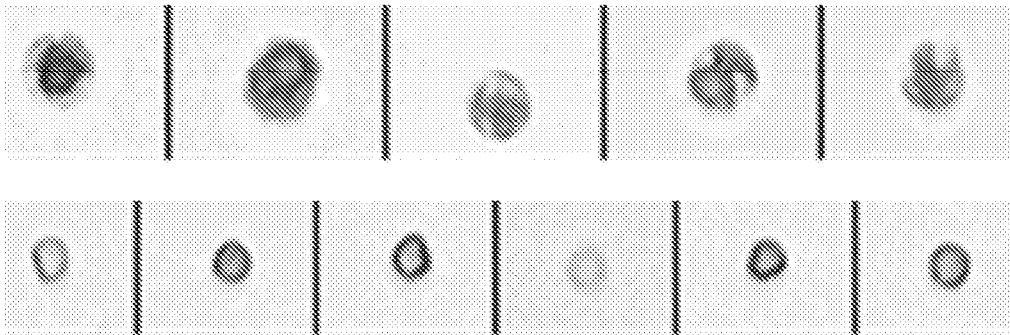


FIG. 9

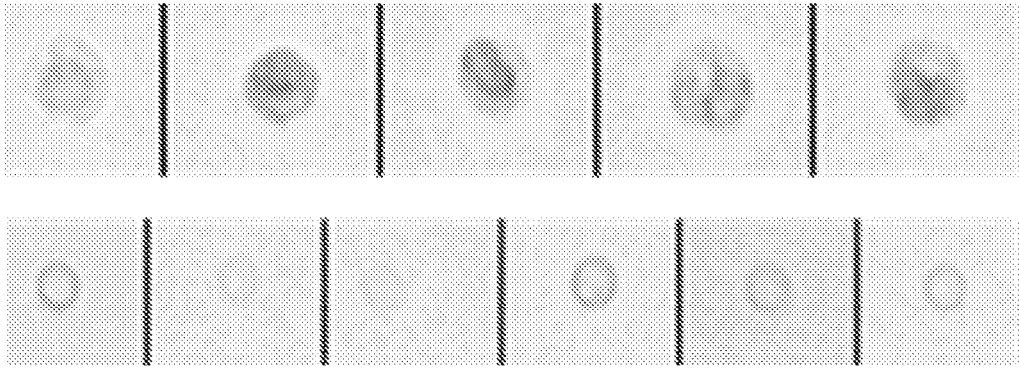


FIG. 10

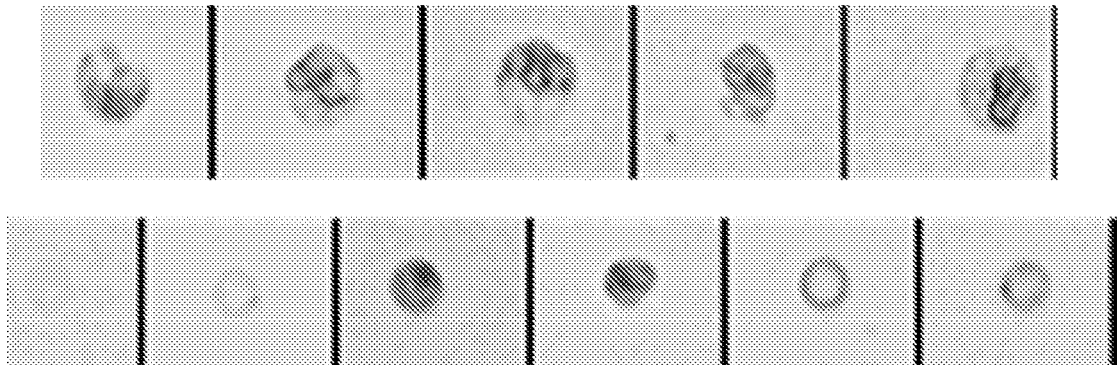


FIG. 11

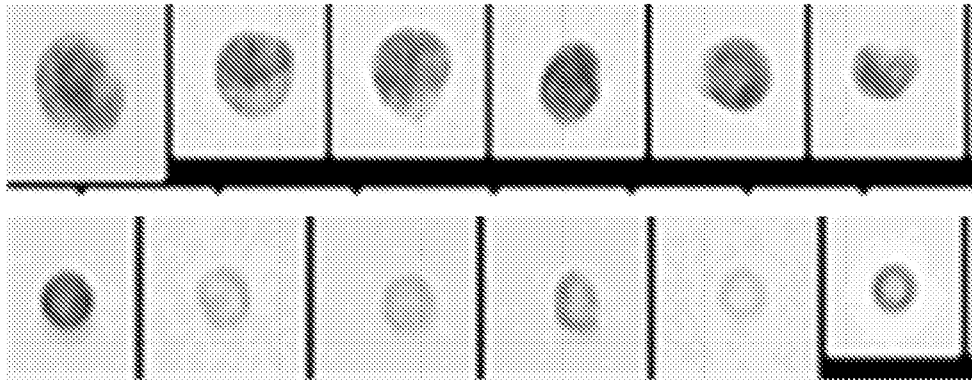


FIG. 12

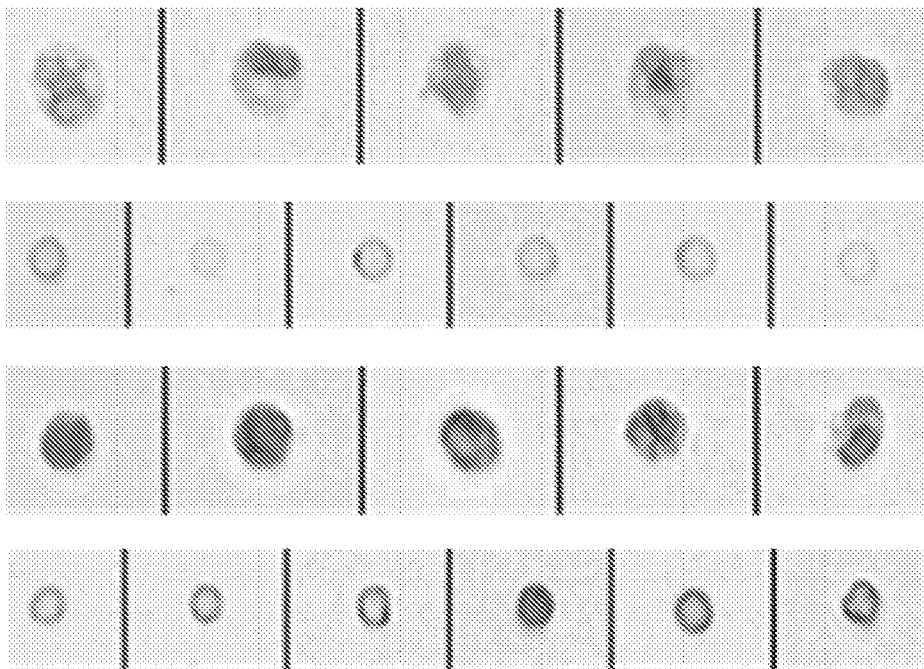


FIG. 13

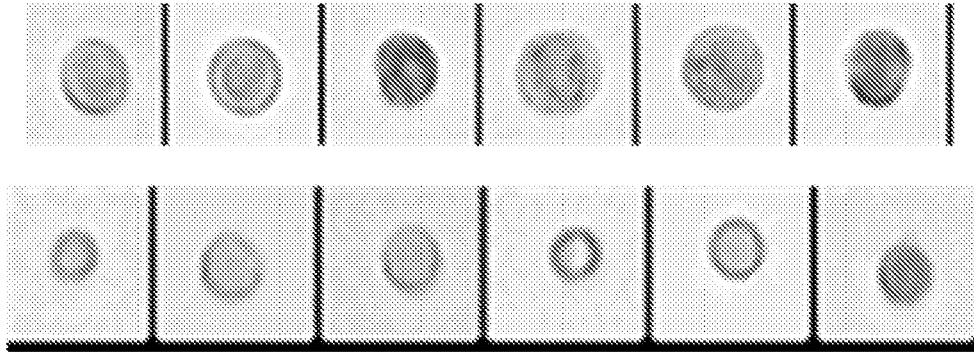


FIG. 14

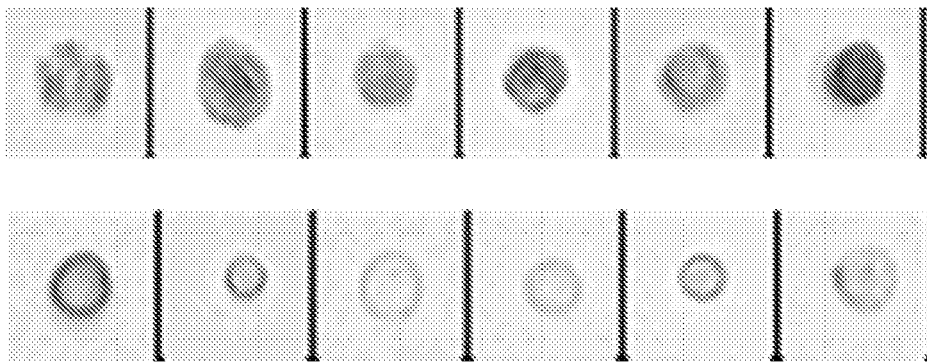


FIG. 15

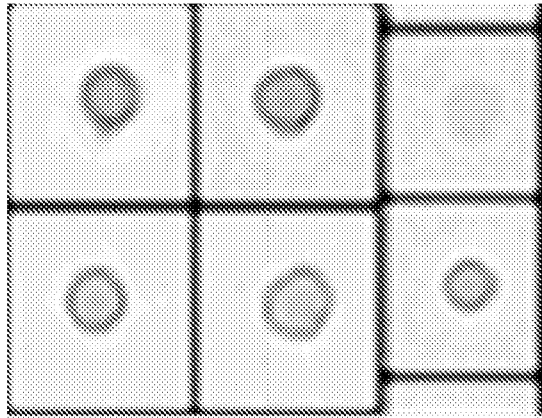
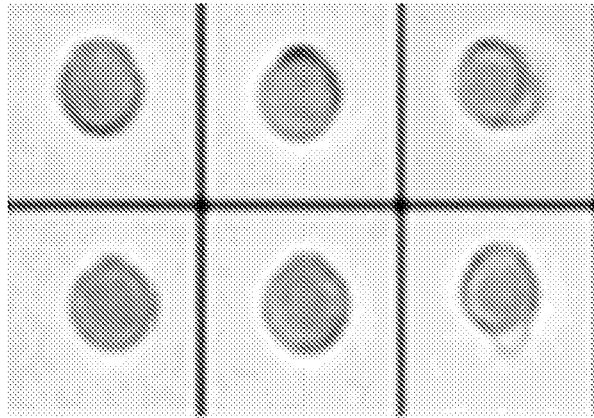


FIG. 16

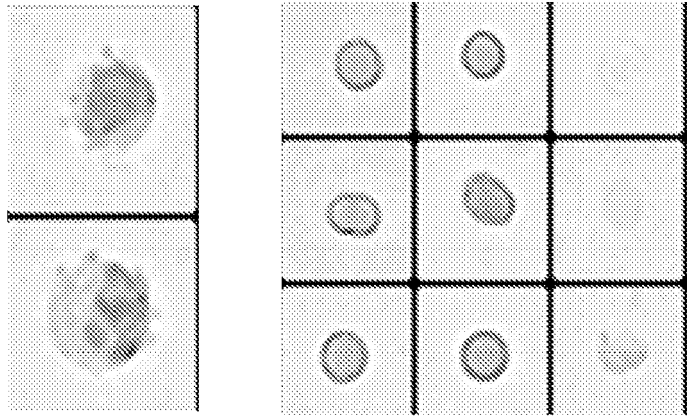
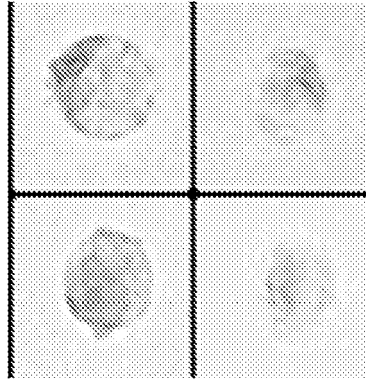


FIG. 17

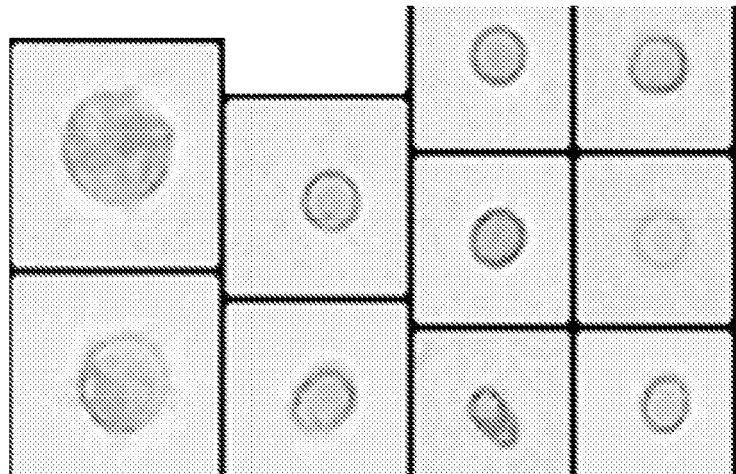
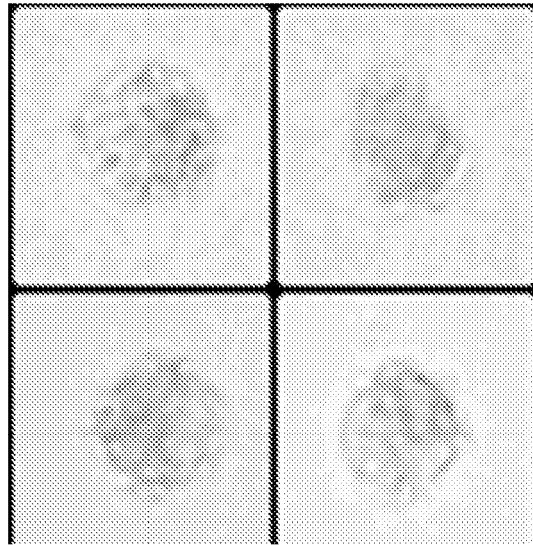


FIG. 18

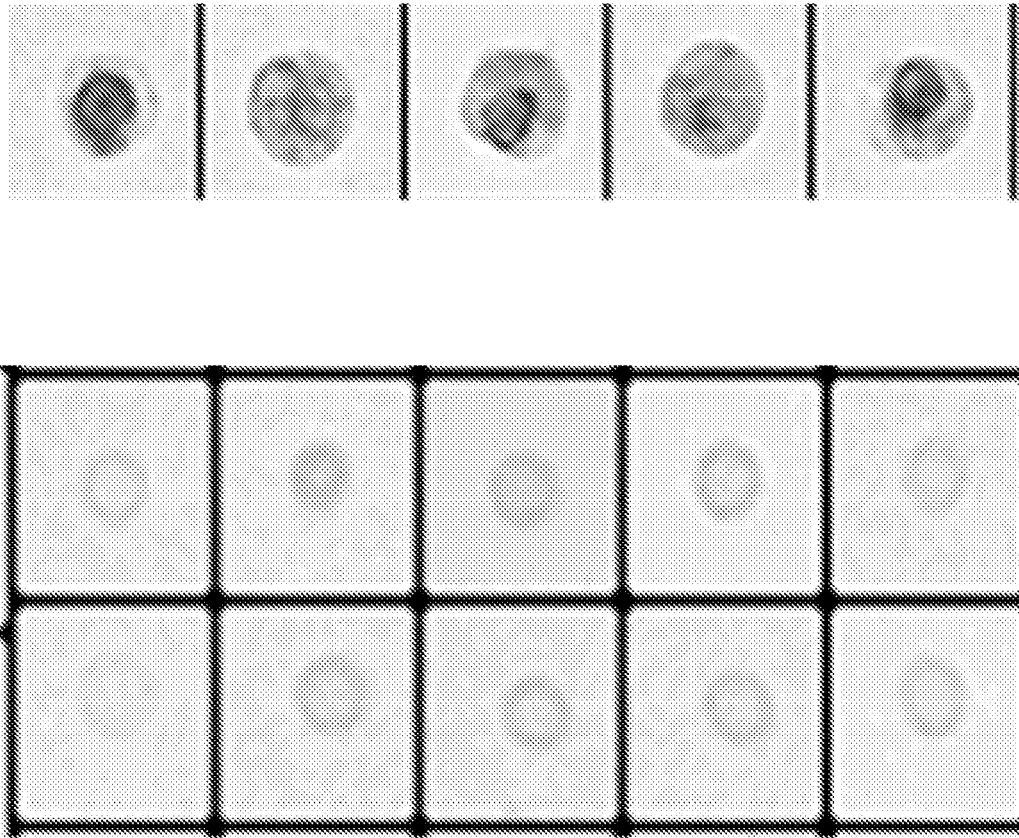


FIG. 19



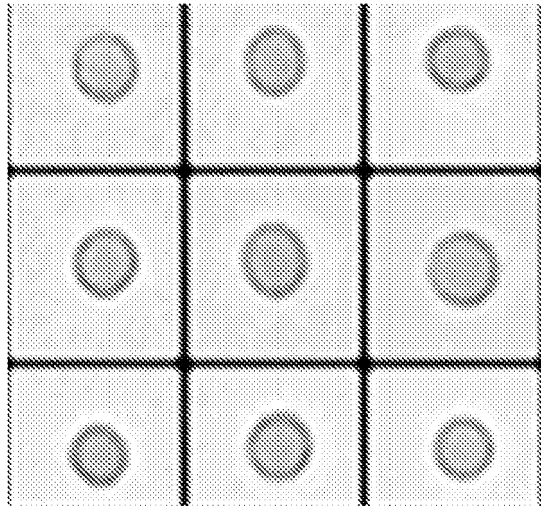
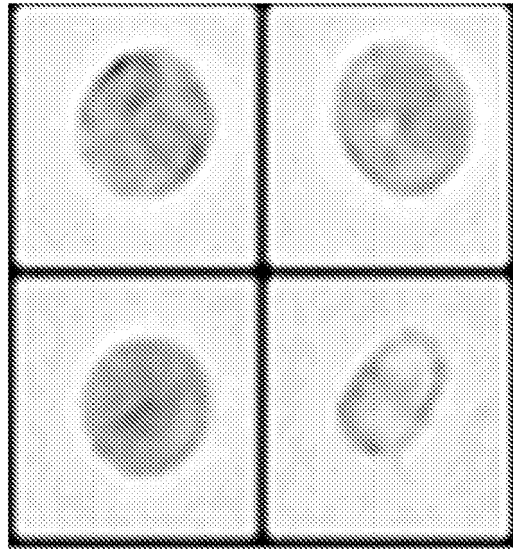


FIG. 20

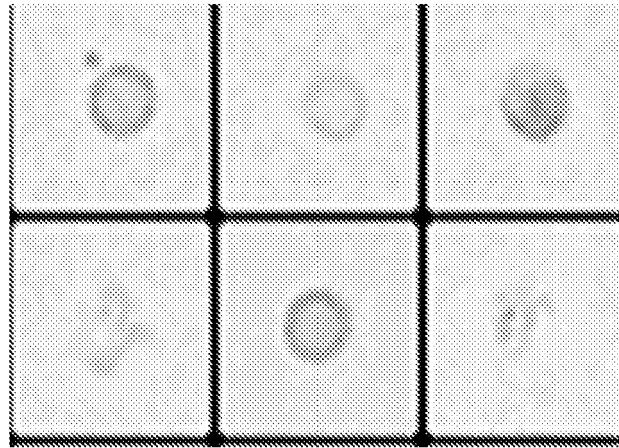
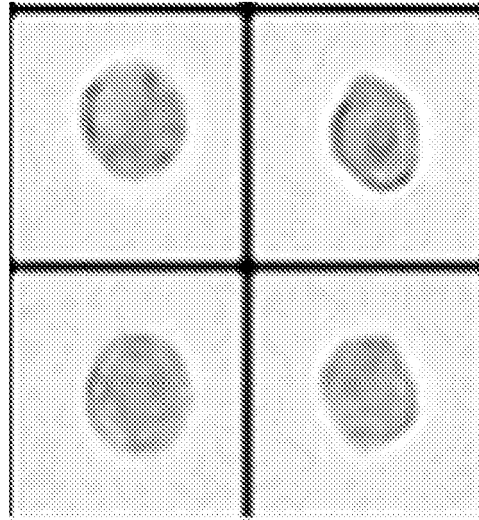


FIG. 21