

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 227**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

**G01N 33/48** (2006.01)

**C12M 3/00** (2006.01)

**G01N 1/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2012 PCT/US2012/070696**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO13101603**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2012 E 12862848 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2798087**

54 Título: **Análisis celular de fluidos corporales**

30 Prioridad:

**27.12.2011 US 201161580623 P**

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

**18.04.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WU, JIONG;  
LIN, EMILY, H. y  
YANG, JIHPING**

74 Agente/Representante:

**ILLESCAS TABOADA, Manuel**

ES 2 664 227 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

Análisis celular de fluidos corporales

5 **Antecedentes**

Se utilizan una variedad de métodos para análisis celular, incluyendo inspección visual y/o automatizada a través de microscopía óptica o microscopía óptica de fluorescencia. Los exámenes celulares y análisis de este tipo se practican habitualmente para obtener información con respecto al linaje celular, etapa de maduración y recuento de células en una muestra.

La citometría de flujo es un método para identificar y diferenciar entre diferentes tipos de células en una muestra no homogénea. En el citómetro de flujo, las células se pasan una a una o casi una a una a través de una región de detección en la que cada célula es irradiada por una fuente de energía. Normalmente, se utilizan las fuentes luminosas de longitud de onda única (p. ej., láser, etc.) como fuente de energía y uno o diversos sensores graban datos basándose en la interacción de las células con la energía aplicada. La citometría de flujo se utiliza comúnmente en hematología y ha sido particularmente exitosa en el diagnóstico de cánceres hematológicos. Además de la citometría de flujo, otros métodos analíticos se utilizan en hematología y en la caracterización de una población de células.

Las muestras sanguíneas tienden a tener una concentración alta de células. El análisis de las muestras con concentraciones de células significativamente más bajas, ya sea por citometría de flujo o por otras técnicas, es más difícil y por lo tanto menos común. Además, los analizadores hematológicos tradicionales, que están diseñados para medir muestras de sangre entera, tienden a tener una sensibilidad de detección limitada para concentraciones bajas de células diferenciadas. En algunos casos, el único método disponible para el análisis celular es el examen manual de las muestras. En los campos de la medicina, la microbiología y en otros campos, son deseables métodos mejorados de análisis de muestras con bajo número de células.

El documento US2011275064 (Abbott Laboratories) divulga un método mediante el cual se utilizan uno o más colorantes fluorescentes para unir y teñir ácidos nucleicos en ciertas células sanguíneas, tales como, por ejemplo, glóbulos blancos, glóbulos rojos nucleados y reticulocitos y para inducir emisiones fluorescentes tras la excitación de fotones a partir de una fuente de luz determinada, tal como, por ejemplo, un láser a una longitud de onda apropiada. Más particularmente, la presente invención proporciona un método mediante el cual se utiliza un activador fluorescente en una etapa de recopilación de datos para recopilar eventos que emiten una fuerte fluorescencia, con el fin de separar glóbulos blancos y glóbulos rojos nucleados de glóbulos rojos y plaquetas sin necesidad de utilizar un agente de lisis.

**Sumario**

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para analizar un fluido corporal como se define en la reivindicación 1.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para diferenciar células según la reivindicación 11.

45 **Breve descripción de los dibujos**

La **FIG. 1** proporciona una imagen esquemática de un aspecto de un método de análisis de fluidos corporales descrito en la presente memoria. Los GBs se separan de los GRs tras la interacción del colorante con ADN y la posterior emisión de fluorescencia. La información de fluorescencia, así como otras señales de dispersión de luz, se utilizan en el análisis celular de muestras de fluidos corporales. FL1 indica la fluorescencia recogida con un filtro de recorrido de banda de  $530 \pm 20$  nm. ALL e IAS son las señales de dispersión de luz recogidas entre 0 a 1 grados y entre 3 a 10 grados, respectivamente.

La **FIG. 2A** es un diagrama de dispersión (ALL vs IAS) del análisis celular para una muestra de fluidos corporales. GBs = 89/ $\mu$ l (referencia = 81/ $\mu$ l); GRs = 2012/ $\mu$ l (referencia = 1733/ $\mu$ l).

La **FIG. 2B** es un diagrama de dispersión (FL1 vs ALL) del análisis celular para una muestra de fluidos corporales. GBs y GRs están muy separados en fluorescencia (FL1). GBs = 89/ $\mu$ l (referencia = 81/ $\mu$ l); GRs = 2012/ $\mu$ l (referencia = 1733/ $\mu$ l).

La **FIG. 3A** es un diagrama de dispersión (ALL vs IAS) del análisis celular de otra muestra de fluidos corporales. GBs = 0,95/ $\mu$ l (referencia = 0,33/ $\mu$ l); GRs = 142/ $\mu$ l (referencia = 122/ $\mu$ l).

La **FIG. 3B** es un diagrama de dispersión (FL1 vs ALL) del análisis celular de otra muestra de fluidos corporales. GBs y GRs están muy separados en fluorescencia (FL1). GBs = 0,95/ $\mu$ l (referencia = 0,33/ $\mu$ l); GRs = 142/ $\mu$ l (referencia = 122/ $\mu$ l).

La **FIG. 4A** es un diagrama de dispersión FL1 vs IAS de la primera dilución de una dilución en serie de seis niveles de una muestra de capa leucocitaria. La muestra original de capa leucocitaria contiene  $6,1 \times 10^3$ / $\mu$ l de GBs y  $15 \times 10^3$ / $\mu$ l de GRs. Los seis niveles, (A), (B), (C), (D), (E) y (F), se prepararon en base a diluciones con TFS 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1.000 y 1:3.000, respectivamente. Todas las muestras se midieron utilizando una

dilución en un analizador prototipo.

La **FIG. 4B** es un diagrama de dispersión FL1 vs IAS de la segunda dilución de una dilución en serie de seis niveles de una muestra de capa leucocitaria. La muestra original de capa leucocitaria contiene  $6,1 \times 10^3/\mu\text{l}$  de GBs y  $15 \times 10^3/\mu\text{l}$  de GRs. Los seis niveles, (A), (B), (C), (D), (E) y (F), se prepararon en base a diluciones con TFS 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1.000 y 1:3.000, respectivamente. Todas las muestras se midieron utilizando una dilución en un analizador prototipo.

La **FIG. 4C** es un diagrama de dispersión FL1 vs IAS de la tercera dilución de una dilución en serie de seis niveles de una muestra de capa leucocitaria. La muestra original de capa leucocitaria contiene  $6,1 \times 10^3/\mu\text{l}$  de GBs y  $15 \times 10^3/\mu\text{l}$  de GRs. Los seis niveles, (A), (B), (C), (D), (E) y (F), se prepararon en base a diluciones con TFS 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1.000 y 1:3.000, respectivamente. Todas las muestras se midieron utilizando una dilución en un analizador prototipo.

La **FIG. 4D** es un diagrama de dispersión FL1 vs IAS de la cuarta dilución de una dilución en serie de seis niveles de una muestra de capa leucocitaria. La muestra original de capa leucocitaria contiene  $6,1 \times 10^3/\mu\text{l}$  de GBs y  $15 \times 10^3/\mu\text{l}$  de GRs. Los seis niveles, (A), (B), (C), (D), (E) y (F), se prepararon en base a diluciones con TFS 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1.000 y 1:3.000, respectivamente. Todas las muestras se midieron utilizando una dilución en un analizador prototipo.

La **FIG. 4E** es un diagrama de dispersión FL1 vs IAS de la quinta dilución de una dilución en serie de seis niveles de una muestra de capa leucocitaria. La muestra original de capa leucocitaria contiene  $6,1 \times 10^3/\mu\text{l}$  de GBs y  $15 \times 10^3/\mu\text{l}$  de GRs. Los seis niveles, (A), (B), (C), (D), (E) y (F), se prepararon en base a diluciones con TFS 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1.000 y 1:3.000, respectivamente. Todas las muestras se midieron utilizando una dilución en un analizador prototipo.

La **FIG. 4F** es un diagrama de dispersión FL1 vs IAS de la sexta dilución de una dilución en serie de seis niveles de una muestra de capa leucocitaria. La muestra original de capa leucocitaria contiene  $6,1 \times 10^3/\mu\text{l}$  de GBs y  $15 \times 10^3/\mu\text{l}$  de GRs. Los seis niveles, (A), (B), (C), (D), (E) y (F), se prepararon en base a diluciones con TFS 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1.000 y 1:3.000, respectivamente. Todas las muestras se midieron utilizando una dilución en un analizador prototipo.

La **FIG. 5** proporciona gráficos de correlación de GBs (medida vs calculada) entre los seis niveles de las muestras diluidas de capa leucocitaria (A) y solo tres muestras de límite inferior (B). Múltiples puntos en cada nivel indican que se llevaron a cabo múltiples ejecuciones. Las correlaciones globales fueron:  $Y = 1,0239 X - 4,9$  ( $R^2 = 0,9984$ ) para los seis niveles e  $Y = 1,0787 X - 1,5$  ( $R^2 = 0,9598$ ) para los tres niveles con las concentraciones de células más bajas.

La **FIG. 6** proporciona gráficos de correlación de GBs (método actual vs referencia) para 91 muestras de fluidos corporales. Las correlaciones se representaron en diferentes intervalos: (A) intervalo completo ( $\sim 40.000/\mu\text{l}$ ), (B)  $< 2.000/\mu\text{l}$ , (C)  $< 200/\mu\text{l}$  y (D)  $< 50/\mu\text{l}$ . La relación de dilución fue de 1:35 (espécimen correspondiente al reactivo de marcaje).

La **FIG. 7** proporciona gráficos de correlación de GRs (método actual vs referencia) para 91 muestras de fluidos corporales. Las correlaciones se representaron en diferentes intervalos: (A) intervalo completo ( $\sim 200.000/\mu\text{l}$ ), (B)  $< 3.000/\mu\text{l}$ , (C)  $< 200/\mu\text{l}$  y (D)  $< 50/\mu\text{l}$ . Las muestras con numerosos fantasmas de GRs no se incluyeron en el análisis de correlación. La relación de dilución fue de 1:35 (espécimen correspondiente al reactivo de marcaje).

La **FIG. 8** es un gráfico de correlación de GBs (método inventado vs referencia) para 72 muestras de fluidos corporales con concentraciones muy bajas de células (GBs  $< 50/\mu\text{l}$ ). La relación de dilución fue de 1:10 (espécimen correspondiente al reactivo de marcaje).

La **FIG. 9** es un gráfico de correlación de GRs (método actual vs referencia) para 38 muestras de fluidos corporales con concentraciones muy bajas de células (GRs  $< 50/\mu\text{l}$ ). Las muestras con numerosos fantasmas de GRs no se incluyeron en el análisis de correlación. La relación de dilución fue de 1:10 (espécimen correspondiente al reactivo de marcaje).

## Divulgación detallada

### DEFINICIONES

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "fluido corporal" se refiere a fluidos presentes u obtenidos de un animal, incluyendo fluidos tales como líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, líquido pericárdico, líquido pleural, líquido sinovial, orina, saliva, lágrimas, semen, líquido amniótico, esputo, y similares, así como fluidos obtenidos a partir de quistes, tumores, y similares. A menos que se especifique lo contrario, la expresión "fluido corporal" no incluye sangre entera, a pesar de que un fluido corporal puede contener glóbulos rojos (GRs) y/o glóbulos blancos (GBs).

En algunos aspectos, la divulgación proporciona métodos y materiales para el análisis de fluidos con un número bajo de células. Por número bajo de células se entiende fluidos que tienen menos de aproximadamente 100 células/ $\mu\text{l}$ , o menos de aproximadamente 80 células/ $\mu\text{l}$ , o menos de aproximadamente 60 células/ $\mu\text{l}$ , o menos de aproximadamente 40 células/ $\mu\text{l}$ , o menos de aproximadamente 30 células/ $\mu\text{l}$ , o menos de aproximadamente 20 células/ $\mu\text{l}$ , o menos de aproximadamente 10 células/ $\mu\text{l}$ , o menos de aproximadamente 5 células/ $\mu\text{l}$ . En algunas realizaciones, tal número bajo de células es el resultado de la dilución de una muestra original más concentrada. En otras realizaciones, tal número bajo de células es una característica natural del fluido a analizar (es decir, no es necesaria una dilución para alcanzar el número bajo de células).

Los fluidos a analizar utilizando los métodos y materiales descritos en la presente memoria son, en algunas realizaciones, seleccionados entre un fluido corporal. En otras realizaciones, los fluidos a analizar son de naturaleza biológica, pero no son fluidos corporales. En algunas realizaciones, el fluido a analizar es "sintetizado", lo que significa que una población de células se añade a un fluido, en el que el fluido es biológicamente compatible, pero no es el fluido en el que normalmente se encuentran las células. Las soluciones acuosas tamponadas y similares son ejemplos de tales fluidos.

## MATERIALES

En algunas realizaciones, los métodos de interés implican la puesta en contacto de una población de células con una composición de marcaje adecuada para ayudar en la caracterización deseada de las células. En algunas realizaciones, la composición de marcaje comprende un colorante fluorescente, y opcionalmente comprende además componentes adicionales tales como los descritos en la presente memoria a continuación. Los componentes de la composición de marcaje y la concentración relativa de tales componentes se pueden variar de acuerdo a las necesidades y requisitos del uso previsto. La composición de marcaje, con o sin el colorante presente, puede ser alternativamente referida en la presente memoria como "reactivo".

Los métodos y materiales de interés implican un colorante fluorescente (también referido en la presente memoria como "colorante"). El colorante fluorescente puede ser cualquier colorante adecuado que tenga las características necesarias o adecuadas para llevar a cabo los métodos de interés. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el colorante es soluble en agua. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el colorante fluorescente tiene una solubilidad acuosa de al menos 1 µg/l, o al menos 5 µg/l, o al menos 10 µg/l, o al menos 20 µg/l, o al menos 50 µg/l. En algunas realizaciones, el colorante es estable en soluciones acuosas, lo que significa que el colorante no se degrada significativamente en la escala temporal adecuada para los métodos de análisis descritos en la presente memoria. Por ejemplo, el colorante es estable en una solución acuosa tamponada (p. ej., reactivo celular) a temperatura ambiente (p. ej., aproximadamente 20-25 °C) durante al menos 30 min, o al menos 1 h o al menos 6 h, o al menos 12 h, o al menos 24 h, o al menos 2 días, o al menos 7 días, o al menos 1 mes. También, por ejemplo, el colorante es estable en una solución acuosa tamponada (p. ej., reactivo celular) en condiciones de refrigeración (p. ej., por debajo de aproximadamente 10 °C) durante al menos 1 h, o al menos 12 h, o al menos 24 h, o al menos 2 días, o al menos 7 días, o al menos 1 mes, o al menos 6 meses, o al menos 12 meses.

En algunas realizaciones, el colorante es capaz de penetrar en una membrana celular, tal como las paredes de las células sanguíneas o similares. En algunas realizaciones, el colorante es capaz de penetrar aún más en un núcleo celular una vez en el interior de una célula.

En algunas realizaciones, el colorante se une a un ácido nucleico. En algunas realizaciones, el colorante se une al ADN. En algunas realizaciones, los colorantes de interés se unen a ADN, pero no se unen a ARN. En algunas realizaciones, los colorantes de interés se unen preferentemente a ADN sobre ARN. En algunas realizaciones, la unión del colorante a una molécula de ADN implica la unión a hidrógeno u otra interacción no covalente. En algunas realizaciones, el colorante se une a una cadena monocatenaria de ADN o a un complejo de ADN monocatenario o bicatenario. En algunas realizaciones, el colorante se une a cadenas de un complejo de ADN bicatenario.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, un colorante unido a ADN hace referencia a un complejo colorante. En algunas realizaciones, el colorante se une al ADN con una alta afinidad y una constante de unión alta. En algunas realizaciones, y como se ha mencionado en la presente memoria, la afinidad y la concentración del colorante es lo suficientemente grande como para que el colorante sea suficiente para "teñir" (después de la penetración y unión al ADN) al menos 250.000 células/µl.

En algunas realizaciones, el colorante es fluorescente. De este modo, el colorante absorbe la luz incidente en una longitud de onda o un grupo de longitudes de onda alrededor de una longitud de onda de absorción máxima (también referida como una longitud de onda de excitación máxima), y emite luz a otra longitud de onda o a un grupo de longitudes de onda alrededor de una longitud de onda de emisión máxima. En algunas realizaciones, la longitud de onda de absorción máxima es diferente de la longitud de onda de emisión máxima. Además, en algunas realizaciones, la longitud de onda de adsorción máxima y/o la longitud de onda de emisión máxima es/son dependiente(s) del entorno del colorante. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la longitud de onda de absorción máxima y/o la longitud de onda de emisión máxima para un colorante unido a ADN (es decir, un complejo colorante) difieren de la longitud de onda de adsorción máxima y/o longitud de onda de emisión máxima para un colorante no unido.

En algunas realizaciones, la longitud de onda de absorción máxima y la longitud de onda de emisión máxima para un complejo colorante difieren en al menos 10 nm, o al menos 15 nm, o al menos 20 nm, o al menos 25 nm, o al menos 30 nm, o al menos 35 nm, o al menos 40 nm, o al menos 45 nm, o al menos 50 nm. En algunas realizaciones, la longitud de onda de absorción máxima para un complejo colorante está en el intervalo de 400-700 nm. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la absorción máxima está en el intervalo de 425-550 nm, o en el intervalo de 450-525 nm, o en el intervalo de 475-500 nm, o en el intervalo de 480-495 nm, o en el intervalo de 485-490 nm. También, por ejemplo, en algunas realizaciones, la absorción máxima está en el intervalo de 500-700 nm, o en el

intervalo de 550-675 nm, o en el intervalo de 600-650 nm, o en el intervalo de 620-640 nm.

En algunas realizaciones, la longitud de onda de emisión máxima para un complejo colorante está en el intervalo de 425-800 nm, por ejemplo en el intervalo de 425-700 nm. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la emisión máxima está en el intervalo de 450-650 nm, o en el intervalo de 475-625 nm, o en el intervalo de 500-550 nm, o en el intervalo de 510-540 nm, o en el intervalo de 520-530 nm.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, el colorante fluorescente se selecciona entre naranja de tiazol o 1-metil-4-[(3-metil-2-(3H)-benzotiazolilideno)metil]quinolinio p-tosilato, azul de tiazol, yoduro de 4-[(3-metil-2-(3H)-benzotiazolilideno)metil]-1-[3-(trimetilamonio)propil]quinolinio, yoduro de 3,3'-dimetiloxacarbocianina o yoduro de 3-metil-2-[3(3-metil-2(3H)-benzotiazolilideno-1-propenil) benzoxazolio, tioflavina T, las tinciones SYTO® y TOTO® (Life Technologies), bromuro de etidio, yoduro de propidio, naranja de acridina, corifosfina O, auramina O, las tinciones HOECHST 33258® (hidrato del trihidrocloruro de (2'-(4-hidroxifenil)-5-(4 metil-1-piperizinil)-2,5'-bi-1H-bencimidazol) y HOECHST 33342® (trihidrocloruro de 2'-(4-etoxifenil)-5-(4-metil-1-piperizinil)-2,5'-bi-1H-bencimidazol), dihidrocloruro de 4' 6-diamino-2-fenilindol (DAPI), dihidrocloruro de 4',6-(diimidazolin-2-il)-2-fenilindol (DIP1), 7-aminoactinomicina D, actinomicina D, y LDS 751 (2-(4-(4-dimetilaminofenil)-1,3-butadienil)-3-étilbenzotiazolio perclorato), o un colorante vendido bajo la marca registrada SYBR® (Life Technologies, p. ej., SYBR Green, SYBR Gold, SYBR 11, etc.), o similares.

En algunas realizaciones, además de un colorante como se ha descrito anteriormente, una composición de marcaje de interés comprende además uno o más de los componentes identificados en los párrafos siguientes. Se apreciará que el listado de abajo es solamente representativo, y que se pueden realizar sustituciones, cuando se desee, utilizando materiales química y/o biológicamente equivalentes.

En algunas realizaciones, la composición de marcaje contiene un tensioactivo o detergente. Los tensioactivos iónicos y neutros se pueden emplear. Por ejemplo, pueden ser utilizados tensioactivos zwitteriónicos tales como glucósidos esteroideos (p. ej., Big CHAP, Big Doxy CHAP, etc.) y glucopiranosidos, así como otros tensioactivos conocidos en la técnica. Los tensioactivos pueden estar presentes en la composición de marcaje en cualquier cantidad adecuada, tal como 0,0001-0,1 % (p/v).

En algunas realizaciones, la composición de marcaje contiene además un tampón o modificador del pH. Ejemplos de tampones o modificadores del pH incluyen, entre otros, TFS, MOPS y HEPES. Ejemplos adicionales de tampones o modificadores del pH incluyen: ácidos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, y similares; bases tales como hidróxido sódico, carbonato sódico, bicarbonato sódico, aminas orgánicas (p. ej., imidazol, trietilamina, etc.), y similares; y sales tales como cloruro sódico, cloruro cálcico, y similares. Por ejemplo, un material orgánico utilizado como tampón, tal como imidazol, puede estar presente en la composición de marcaje a una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,001-3 % (p/v). También, por ejemplo, un material inorgánico, tal como HCl, puede estar presente en una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,001-5 % (p/v). Del mismo modo, una sal, tal como NaCl, puede estar presente en una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,001-3 % (p/v). Como se ha mencionado previamente, se conocen equivalentes de tales materiales y pueden ser sustituidos cuando sea apropiado.

En algunas realizaciones, los métodos y materiales de interés implican además componentes adicionales según sea necesario o deseado. Ejemplos de tales componentes adicionales incluyen colorantes, conservantes, agentes antimicrobianos, reguladores de la osmolalidad, y co-disolventes.

Por ejemplo, pueden estar presentes un agente antimicrobiano tal como Proclin (p. ej., Proclin 150, 200, 300, etc.), vancomicina, penicilina y similares. El agente antimicrobiano puede estar presente en una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,001-0,5 % (p/v).

En algunas realizaciones, las soluciones madre de los diversos componentes pueden fabricarse durante la preparación de las composiciones de marcaje de interés. Por ejemplo, pueden fabricarse las soluciones madre a partir de cualquier componente (p. ej., compuesto colorante, etc.), para ayudar en la solubilización de los componentes o para medir con precisión los volúmenes de los componentes. Las soluciones madre se pueden fabricar utilizando agua como disolvente, o utilizando un disolvente orgánico tal como dimetilsulfóxido, isopropanol, etanol o metanol, o utilizando una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, los métodos y materiales de interés implican una solución acuosa de los componentes anteriormente identificados. Se apreciará que la concentración de los diferentes componentes presentes en la composición de marcaje puede variar según el uso previsto. Los párrafos anteriores y siguientes proporcionan algunas pautas para concentraciones de materiales presentes en la composición de marcaje. Como se indica en la presente memoria, en algunas realizaciones, la composición de marcaje se combina con un fluido a analizar (p. ej., un fluido corporal). Por consiguiente, aunque las pautas proporcionadas en la presente memoria se refieran a cantidades de los diversos componentes presentes en la composición de marcaje, se apreciará que tales pautas son también aplicables a la combinación de la composición de marcaje y el fluido a analizar (es decir, en algunas realizaciones, el material que realmente se analiza en un analizador hematológico como se describe en la presente

memoria contendrá porcentajes similares y cantidades relativas de los diversos componentes).

En algunas realizaciones, el colorante está presente en la composición de marcaje en una concentración predeterminada. Se apreciará que la concentración predeterminada pueda variar dependiendo de la identidad del colorante (es decir, de la estructura química, de la afinidad de unión de la diana de ácido nucleico, etc.), así como los parámetros operativos del analizador a utilizar. En algunas realizaciones, el componente colorante está presente en una cantidad necesaria para teñir al menos el número de células presentes en el fluido corporal, tal como 10 células/ $\mu$ l o más, o 50 células/ $\mu$ l o más. Por ejemplo, el colorante está presente en una cantidad necesaria para teñir 100.000 células/ $\mu$ l o más, o 200.000 células/ $\mu$ l o más, o 250.000 células/ $\mu$ l o más. En algunas realizaciones, la cantidad de compuesto colorante presente está en el intervalo de 0,000001-0,5 %, o 0,00001-0,5 %, o 0,0001-0,5 %, o 0,001-0,1 % (p/v).

En algunas realizaciones, un agente amortiguador orgánico está presente en la composición de marcaje. Ejemplos de tal material incluyen aminas orgánicas, tales como trietilamina, trimetilamina, y aminas cíclicas tales como imidazol, y similares. El agente amortiguador orgánico (junto con cualquier otro tampón) puede estar presente en una cantidad necesaria para crear y mantener un pH deseado en la composición de analitos.

En algunas realizaciones, la composición de marcaje que contiene un colorante de interés es isotónica o esencialmente isotónica (es decir, aproximadamente 20 % isotónica, o aproximadamente 10 % isotónica, o aproximadamente 5 % isotónica). En algunas realizaciones, la composición de marcaje que contiene un colorante de interés tiene un pH neutro o un pH esencialmente neutro (es decir, dentro de un rango de pH de aproximadamente 6-8, o aproximadamente 6,5-7,5). Estas características de la composición de marcaje ayudan a reducir el daño en las células de cualquier tipo durante la preparación y análisis de la muestra y, por lo tanto, resultan en un análisis celular de muestras de fluidos corporales más preciso.

## MÉTODOS

En algunas realizaciones, los métodos de interés implican la puesta en contacto de la población de células con la composición de marcaje. En algunas de dichas realizaciones, la puesta en contacto implica la mezcla de la composición de marcaje con un fluido (p. ej., un fluido corporal) que contiene las células a analizar. De este modo, en algunas realizaciones, los métodos de interés implican la dilución de una muestra de fluido que contiene células con una composición de marcaje, en la que la composición de marcaje comprende agua y un colorante, y opcionalmente comprende otros componentes tales como los proporcionados en la presente memoria. En algunas de dichas realizaciones, los métodos implican una única etapa de dilución (es decir, la adición de la composición de marcaje a la muestra de fluido solo una vez) en una relación de dilución predeterminada que proporciona una concentración óptima de analito para la detección y la medición de fluorescencia.

En algunas realizaciones, debido a que los colorantes de interés se unen al ADN, las células que carecen de ADN no son capaces de formar un complejo colorante cuando han sido expuestas al colorante. Las células que carecen de ADN expuestas al colorante no exhiben, por lo tanto, las características de emisión del complejo colorante cuando se analizan utilizando los métodos descritos en la presente memoria (p. ej., cuando se exponen a una fuente de energía de excitación de fluorescencia) o solo emiten fluorescencia mínima o débil debido a la autofluorescencia. En cambio, las células que contienen ADN son capaces de formar un complejo colorante. Tales células, cuando se tiñen con un colorante de interés, exhiben las características de emisión del complejo colorante cuando se analizan utilizando los métodos descritos en la presente memoria. En vista de esta distinción, en algunas realizaciones, los métodos de interés proporcionan un medio para diferenciar las células que contienen ADN de células que carecen de ADN. En algunas realizaciones, los métodos de interés también proporcionan un medio para diferenciar las células que contienen un núcleo de células que carecen de un núcleo, en particular cuando el núcleo contiene ADN. En algunas realizaciones, la diferenciación se proporciona basándose en las mediciones de fluorescencia que, o bien observan fluorescencia de una célula (lo que indica la presencia de ADN y, posiblemente, indica la presencia de un núcleo) o no observan fluorescencia de una célula (lo que indica la falta de ADN y posiblemente indica la falta de un núcleo en la célula). Asimismo, los eventos no celulares (p. ej., objetos no celulares que carecen de ADN) presentes en el fluido que está siendo analizado se diferencian por la falta de emisión de fluorescencia característica.

Por ejemplo, cuando los GRs están expuestos al colorante, los GRs maduros (que carecen de núcleo y carecen de ADN) no forman el complejo colorante. Por lo tanto, los GRs expuestos al colorante no exhiben las características de emisión del complejo colorante cuando se analizan utilizando los métodos descritos en la presente memoria. En cambio, los GBs contienen un núcleo y ADN, y por lo tanto forman el complejo colorante cuando se exponen al colorante. En algunas realizaciones, por lo tanto, los métodos de interés permiten la diferenciación de los GBs de los GRs en una muestra que contiene dichas células. La diferenciación se basa en la presencia o ausencia de una señal fluorescente indicativa de la formación del complejo colorante.

Además de la diferenciación descrita anteriormente, la formación del complejo colorante entre un colorante de interés y el ADN también permite el recuento de células que contienen ADN en una muestra de fluido que contiene células. Por ejemplo, los métodos de interés incluyen el recuento de GBs en una muestra de fluido que contiene

dichas células. El recuento se basa en la observación de la fluorescencia indicativa de la formación del complejo colorante en un método adecuado para el recuento de células. Los métodos adecuados incluyen analizadores hematológicos automatizados, tales como citómetros de flujo y otros métodos de recuento de células basados en fluorescencia.

5 Como se ha mencionado en la presente memoria, los métodos de interés permiten el recuento y diferenciación de GBs en una muestra que contiene GBs y otros objetos (p. ej., GRs y eventos no celulares). En algunas realizaciones, la muestra es un fluido tal como un fluido corporal, y contiene una concentración muy baja de células como se describe con más detalle en la presente memoria. En algunas realizaciones, los métodos de la presente divulgación permiten además la clasificación de GBs en diferencias de 2 partes, 3 partes o 5 partes utilizando tecnologías de dispersión multi-ángulo. En ciertas realizaciones, los GRs se pueden separar aún más de otras partículas sin GRs utilizando tecnologías de dispersión de múltiples ángulos.

15 En algunas realizaciones, los métodos de interés no implican un agente de lisis y no implican el lisado de células antes de la grabación de datos. Por ejemplo, los métodos de interés no implican la adición de un agente de lisis a la muestra de fluido que contiene células antes del análisis de la muestra de fluido. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la composición de marcaje no contiene un agente de lisis. Las muestras de fluido que se analizan no son lisadas y no contienen contenidos celulares que hayan sido liberados de una célula a través de lisis. En algunas realizaciones, las muestras de fluido a analizar contienen GRs intactos y tales GRs no se lisan antes de las mediciones de fluorescencia. Se entiende que "agente de lisis" incluye cualquier material que cause lisis celular significativa, en particular (pero no limitado a) lisis de GRs. Los agentes de lisis incluyen, entre otros, diversos tipos de tensioactivos, enzimas, anticuerpos, agentes reguladores del pH, osmolitos (agentes reguladores de la osmolalidad), y similares que son conocidos en la técnica o descubiertos más tarde.

25 Debido a que no se utilizan agentes de lisis en la preparación de muestras de fluido a analizar, los GBs presentes en el fluido no están dañados como estarían o podrían estar si se hubieran empleado agentes de lisis. Esto es particularmente ventajoso en los fluidos corporales que contienen GBs, debido a que los GBs contenidos en los mismos son normalmente más frágiles que los GBs en la sangre entera.

30 Como se ha mencionado anteriormente, en algunas realizaciones, los métodos de interés implican la dilución con una cantidad predeterminada de composición de marcaje para proporcionar una relación de dilución deseada y una concentración de analitos deseada. La cantidad predeterminada puede determinarse en base a límites de detección en el aparato utilizado para el análisis de la muestra de fluidos. En algunas realizaciones, el límite de detección se optimiza mediante ajustes en la velocidad de inyección de la muestra (con respecto a la velocidad de la celda de flujo), duración de la medición, y similares. Por ejemplo, un analizador prototipo con una relación de dilución 1:10 (sangre:reactivo), una velocidad de inyección de 4,0  $\mu$ l por segundo, y medición de la muestra de 60 segundos (recopilación de datos), daría lugar a una recogida de aproximadamente 240 eventos para una muestra con 10 células por  $\mu$ l, suficiente para soportar un análisis celular preciso.

40 En algunas realizaciones, los métodos de interés son adecuados para el análisis de cualquier muestra de fluido con GBs. Como se ha mencionado previamente, tales muestras de fluidos incluyen fluidos corporales, y también incluyen otras muestras de fluidos tales como soluciones acuosas preparadas de células, soluciones a base de plantas y derivadas de plantas y similares, particularmente cuando tales fluidos de muestra contienen un número bajo de células (p. ej., menos de 40 células/ $\mu$ l, o menos de 30 células/ $\mu$ l, etc.).

45 En algunas realizaciones, los métodos de interés proporcionan un medio simple, fiable y preciso para contar y diferenciar los GBs en un fluido de muestra que contiene GBs y opcionalmente que contiene GRs. La detección de la fluorescencia utilizando analizadores hematológicos automatizados asegura la precisión y la fiabilidad, y el uso de una dilución en una única etapa proporciona simplicidad en la preparación de la muestra. El fluido de muestra que contiene células se tiñe con una sonda fluorescente contenida en una composición de marcaje, en la que la sonda fluorescente penetra en las paredes celulares y se une al ADN para crear un complejo colorante. Los GBs teñidos emiten señales de emisión fluorescente indicativas del complejo colorante, mientras que los GRs no emiten tales señales o emiten tales señales con una intensidad significativamente menor. La composición de marcaje está libre de agentes de lisis y no se añaden agentes de lisis a la muestra de fluido, protegiendo de este modo los GBs presentes. Los límites de detección óptimos se determinan por ajuste de variables que incluyen el caudal de la muestra, la frecuencia de detección, y similares.

## RESULTADO Y VENTAJAS

60 En algunas realizaciones, el análisis de los fluidos teñidos dio lugar a una variedad de información adecuada para el análisis multidimensional de datos, gráficos, y similares. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria proporcionan un recuento preciso total de GBs. En algunas realizaciones, los métodos proporcionan datos en cuanto a las proporciones relativas de los diferentes tipos de GBs en una muestra (p. ej., recuentos celulares de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, y/o monocitos, o diversas combinaciones de los mismos). Tales datos se pueden utilizar, por ejemplo, como información de diagnóstico en el tratamiento de pacientes.

Como se ha mencionado en la presente memoria, en algunas realizaciones, los métodos de interés implican la tinción selectiva de GBs en una muestra de fluido mediante la introducción de un colorante que se une selectivamente al ADN y emite fluorescencia cuando está unido de esta forma. En consecuencia, el análisis de un fluido de muestra teñida incluye el registro de las emisiones de fluorescencia más fuertes que se originan a partir de células que contienen un complejo colorante (p. ej., GBs) en comparación con las emisiones de fluorescencia débiles o inexistentes que se originan a partir de células que carecen del complejo colorante (p. ej., GRs). Las mediciones de fluorescencia se pueden obtener utilizando, por ejemplo, analizadores de dispersión óptica de múltiples canales.

En algunas realizaciones, los materiales y métodos de interés permiten el análisis celular de fluidos corporales y otros fluidos útiles, por ejemplo, en el diagnóstico médico. El análisis celular de muestras de fluido con un número muy bajo de células (p. ej., menos de 40 por  $\mu\text{l}$ , o menos de 10 por  $\mu\text{l}$ , etc.) es posible gracias a los métodos de la presente memoria, incluyendo fluidos corporales que tienen células particularmente frágiles. La simplicidad de los métodos permite que tales muestras se analicen en un plazo de 1-2 horas después de una extracción de muestra de un paciente, ayudando también en el análisis de células frágiles. La falta de agentes de lisis celular en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria se suma además a la capacidad de analizar las muestras que contienen células frágiles. El daño a las células frágiles en los fluidos de interés origina potencialmente análisis inexactos tales como recuentos celulares inexactos y de diferenciación celular.

Las relaciones de dilución óptimas ofrecidas por los métodos descritos en la presente memoria son una mejora adicional sobre el análisis hematológico tradicional. Por ejemplo, las relaciones de dilución (es decir, sangre:diluyente = 1:300 para dilución de GRs) utilizadas por los analizadores hematológicos tradicionales no son lo suficientemente sensibles para soportar la medición de muestras con concentraciones muy bajas de células. Por el contrario, en algunas realizaciones, los métodos de la presente memoria permiten que una única dilución proporcione una relación de dilución óptima para una detección de fluorescencia óptima.

Los métodos de la presente divulgación son simples, p. ej., en algunas realizaciones, se requiere solamente un solo reactivo y una sola dilución. En algunas realizaciones, las relaciones de dilución se pueden ajustar y/o optimizarse con facilidad. Además, la implementación de los métodos de la presente divulgación es simple, y dichos métodos se pueden realizar, por ejemplo, en un analizador hematológico tradicional, sin la necesidad de amplios ajustes y/o modificaciones.

Estas y otras ventajas resultarán evidentes para un experto en la materia basándose en la divulgación proporcionada en la presente memoria, que incluye los ejemplos siguientes.

### Ejemplos

Procedimiento general de ensayo: (A) Modificar el conjunto de instrucciones del flujo y el algoritmo de un analizador hematológico CELL-DYN Sapphire para permitir que sea utilizado para un ensayo de fluido corporal. (B) Todos los ensayos de fluido corporal (FC) se llevaron a cabo utilizando (ligeramente modificados) un modo de recuento ampliado de GBs: aspiración de muestra de FC (~120  $\mu\text{l}$ ), seguido de la mezcla de la muestra (FC) con el reactivo (reactivo de reticulocitos Sapphire), relación de 1 a 35, seguido de incubación de la muestra mezclada (40 °C x 25 s), seguido de una muestra incubada entregada a la celda de flujo para la medición (mediciones de 32 s), seguido de la recopilación de datos, datos brutos grabados como archivos .fcs, seguido por el uso de software tal como FCS Express para analizar los datos brutos.

Todos los resultados de referencia se midieron utilizando procedimientos de recuento manual en cámara convencional.

El reactivo se formuló utilizando los siguientes componentes y concentraciones:

Componente	Concentración <sup>1</sup>
Imidazol	0,3400 %
HCl 1N	2,5325 %
NaCl	0,6800 %
Proclin 300	0,0315 %
BIGCHAP	0,0050 %
SYBR 11	0,0002 %
DMSO <sup>2</sup>	0,0220 %
Agua	hasta el 100 %
<sup>1</sup> 1 % = 1 g/100 ml	
<sup>2</sup> DMSO (dimetilsulfóxido) se utilizó para fabricar una solución madre del componente colorante.	

**Ejemplo 1****ANÁLISIS DE MUESTRAS CON UN NÚMERO BAJO DE CÉLULAS**

5 Un analizador prototipo con una relación de dilución 1:35 (sangre:reactivo), una velocidad de inyección de 2,3 µl por segundo, y una medición de la muestra de 32 segundos (recopilación de datos), da lugar a un conjunto de más de 20 eventos para una muestra con 10 células por µl.

10 Las **FIGS. 2A y 2B** muestran diagramas de dispersión del análisis celular de una muestra de fluidos corporales. Las células fueron enumeradas después del análisis: GBs = 89/µl (referencia = 81/µl); GRs = 2012/µl (referencia = 1733/µl). Las **FIGS. 3A y 3B** muestran diagramas de dispersión del análisis celular de otra muestra de fluidos corporales. Las células fueron enumeradas después del análisis: GBs = 0,95/µl (referencia = 0,33/µl); GRs = 142/µl (referencia = 122/µl).

**Ejemplo 2**

15

**ANÁLISIS DE MUESTRAS CON UN NÚMERO BAJO DE CÉLULAS**

20 El límite de detección fue validado en un estudio utilizando muestras diluidas de la capa leucocitaria. Se prepararon seis niveles de muestras diluidas de la capa leucocitaria utilizando diluciones en serie. Los diagramas de dispersión FL1 vs IAS para los seis niveles de muestras diluidas de capa leucocitaria se muestran en las **FIGS. 4A-4F**. La **FIG. 5** muestra la correlación de GBs (medida vs calculada). Se lograron correlaciones muy buenas: **(A)**  $Y = 1,0239 X - 4,9$  ( $R^2 = 0,9984$ ) para los seis niveles y **(B)**  $Y = 1,0787 X - 1,5$  ( $R^2 = 0,9598$ ) para los tres niveles con concentraciones más bajas de células.

**Ejemplo 3****ANÁLISIS CELULAR DE LAS MUESTRAS DE FLUIDO CORPORAL CON UNA RELACIÓN DE DILUCIÓN DE 1:35**

30 Un estudio exhaustivo de fluidos corporales se realizó para evaluar los métodos proporcionados en la presente memoria. Un total de 91 especímenes de fluido corporal, incluyendo líquido LCR, pleural, peritoneal, y líquido ascítico, se midieron y se analizaron en un analizador prototipo con una relación de dilución 1:35 (sangre:reactivo), una velocidad de inyección de 2,3 µl por segundo, y una medición de la muestra de 32 segundos (recopilación de datos). Los valores de referencia de GBs y GRs se lograron mediante un recuento manual en cámara.

35 Se lograron excelentes correlaciones en GBs entre los métodos descritos anteriormente y el método de referencia: **(FIG. 6)** **(A)**  $Y = 1,1305 X - 9,8411$ ,  $R^2 = 0,997$  (intervalo completo, hasta aproximadamente 40.000/µl); **(B)**  $Y = 1,017 X + 7,1395$ ,  $R^2 = 0,9765$  (<2.000/µl); **(C)**  $Y = 1,0899 X + 1,1253$ ,  $R^2 = 0,9663$  (<200/µl); y **(D)**  $Y = 1,149 X + 1,1461$ ,  $R^2 = 0,8459$  (<50/µl). Se lograron correlaciones muy buenas en GRs entre los métodos descritos anteriormente y el método de referencia **(FIG. 7)**: **(A)**  $Y = 0,8996 X + 403,62$ ,  $R^2 = 0,9595$  (intervalo completo, hasta aproximadamente 200.000/µl); **(B)**  $Y = 1,0833 X - 11,427$ ,  $R^2 = 0,9513$  (<3.000/µl); **(C)**  $Y = 0,979 X - 1,0747$ ,  $R^2 = 0,8284$  (<200/µl); y **(D)**  $Y = 0,9994 X + 0,5951$ ,  $R^2 = 0,6917$  (<50/µl). Para el análisis de GRs, las muestras con fantasmas de GRs numerosos no se incluyeron en el análisis de correlación.

**Ejemplo 4**

45

**ANÁLISIS CELULAR DE LAS MUESTRAS DE FLUIDO CORPORAL CON UNA RELACIÓN DE DILUCIÓN DE 1:10**

50 Se realizó otro estudio exhaustivo de fluidos corporales para evaluar los métodos proporcionados en la presente memoria. Un total de 155 especímenes de fluido corporal, incluyendo líquido CLR, pleural, peritoneal, y líquido ascítico, se midieron y se analizaron en un analizador prototipo con una relación de dilución 1:10 (sangre:reactivo), una velocidad de inyección de 2,3 µl por segundo, y una medición de la muestra de 32 segundos (recopilación de datos). Los valores de referencia de GBs y GRs se lograron mediante recuento manual en cámara.

55 Se lograron excelentes correlaciones en GBs entre los métodos descritos anteriormente y el método de referencia, incluso para las muestras con concentraciones de GBs de límite inferior **(FIG. 8)**:  $Y = 1,1327 X + 1,1937$ ,  $R^2 = 0,8195$  (GBs <50/µl, 72 muestras). Se lograron correlaciones muy buenas en GBs entre los métodos descritos anteriormente y el método de referencia, incluso para las muestras con concentraciones de GRs de límite inferior **(FIG. 9)**:  $Y = 0,8244 X + 0,6128$ ,  $R^2 = 0,7465$  (GRs <50/µl, 38 muestras). Para el análisis de GRs, las muestras corporales con fantasmas de GRs numerosos no se incluyeron en el análisis de correlación.

60

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* para analizar un fluido corporal que contiene células, en que dicho método comprende:

5       teñir un fluido corporal que comprende menos de 100 células/ $\mu$ l y seleccionado entre líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, líquido pericárdico, líquido pleural, líquido sinovial, orina, saliva, lágrimas, semen, líquido amniótico, esputo y líquido ascítico, con un colorante fluorescente, en el que el colorante fluorescente está presente en una cantidad entre 0,000001 y 0,5 % (p/v), penetra en una membrana celular y se une a un ácido nucleico para formar un complejo colorante en el interior de la célula;  
10       irradiar el fluido corporal teñido con energía procedente de una fuente de energía;  
      medir una señal de fluorescencia emitida por el complejo colorante en el fluido corporal teñido; y diferenciar células con núcleos de células sin núcleos, basándose en la presencia o ausencia del colorante fluorescente.

15       2. El método de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico es un ADN o un ARN.

      3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la fuente de energía produce una luz monocromática que tiene una longitud de onda en el espectro visible, y en el que la longitud de onda de la luz monocromática y la longitud de onda de la señal de fluorescencia son diferentes.

20       4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que un colorante fluorescente no unido emite menos luz fluorescente cuando se irradia con energía procedente de la fuente de energía en comparación con el complejo colorante.

25       5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que un colorante fluorescente no unido no presenta fluorescencia cuando se irradia con energía procedente de la fuente de energía mientras no está unido al ácido nucleico, de manera que las células que carecen del complejo colorante no emiten ninguna señal fluorescente.

      6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la medición implica el recuento y la diferenciación de glóbulos rojos (GRs) y glóbulos blancos (GBs).

30       7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el método no implica la lisis de GRs antes de la medición.

35       8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el fluido corporal comprende GBs y GRs intactos.

      9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la medición se lleva a cabo utilizando un analizador hematológico automatizado, un citómetro de flujo u otro analizador de diagnóstico para muestras de fluido corporal.

40       10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la medición comprende el flujo del fluido corporal a través de una celda de flujo en un citómetro.

45       11. Un método *in vitro* para diferenciar células en un fluido corporal, en que dicho método comprende:

      poner en contacto las células de un fluido corporal que comprende menos de 100 células/ $\mu$ l y seleccionado entre líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, líquido pericárdico, líquido pleural, líquido sinovial, orina, saliva, lágrimas, semen, líquido amniótico, esputo y líquido ascítico, con una solución que comprende un colorante fluorescente, en el que el colorante fluorescente es soluble en agua, está presente en una cantidad entre  
50       0,000001 y 0,5 % (p/v), penetra en una membrana celular y se une a un ácido nucleico;  
      irradiar las células con una luz de excitación procedente de una fuente de luz de excitación;  
      medir las emisiones de luz procedente de las células;  
      diferenciar las células que contienen ácidos nucleicos de las células que carecen de ácidos nucleicos, basándose en las emisiones de luz medidas; y  
55       clasificar las células como glóbulos blancos (GBs) o glóbulos rojos (GRs), basándose en una pluralidad de datos ópticos obtenidos a partir de la muestra utilizando uno o más detectores de dispersión de luz.

60       12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra comprende menos de 5 células/ $\mu$ l, 5 a 20 células/ $\mu$ l o 20-40 células/ $\mu$ l.

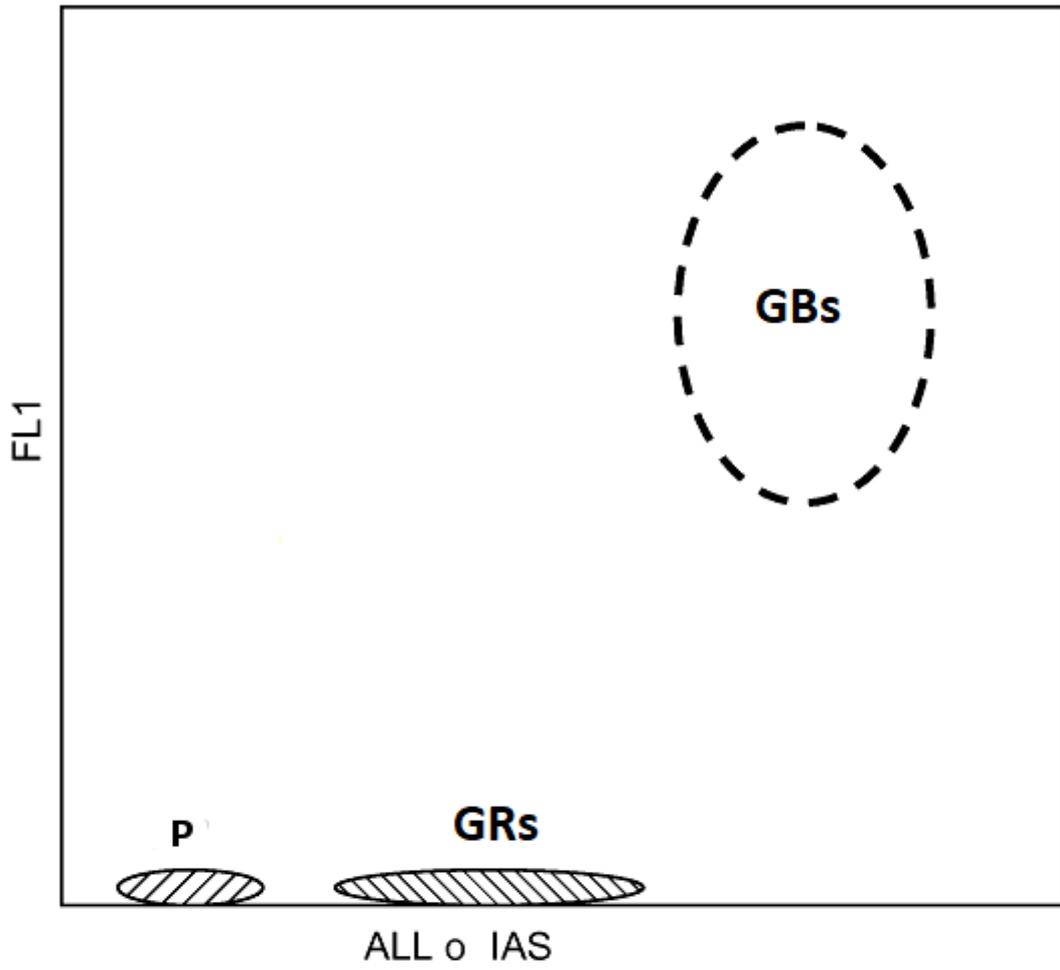


FIG. 1

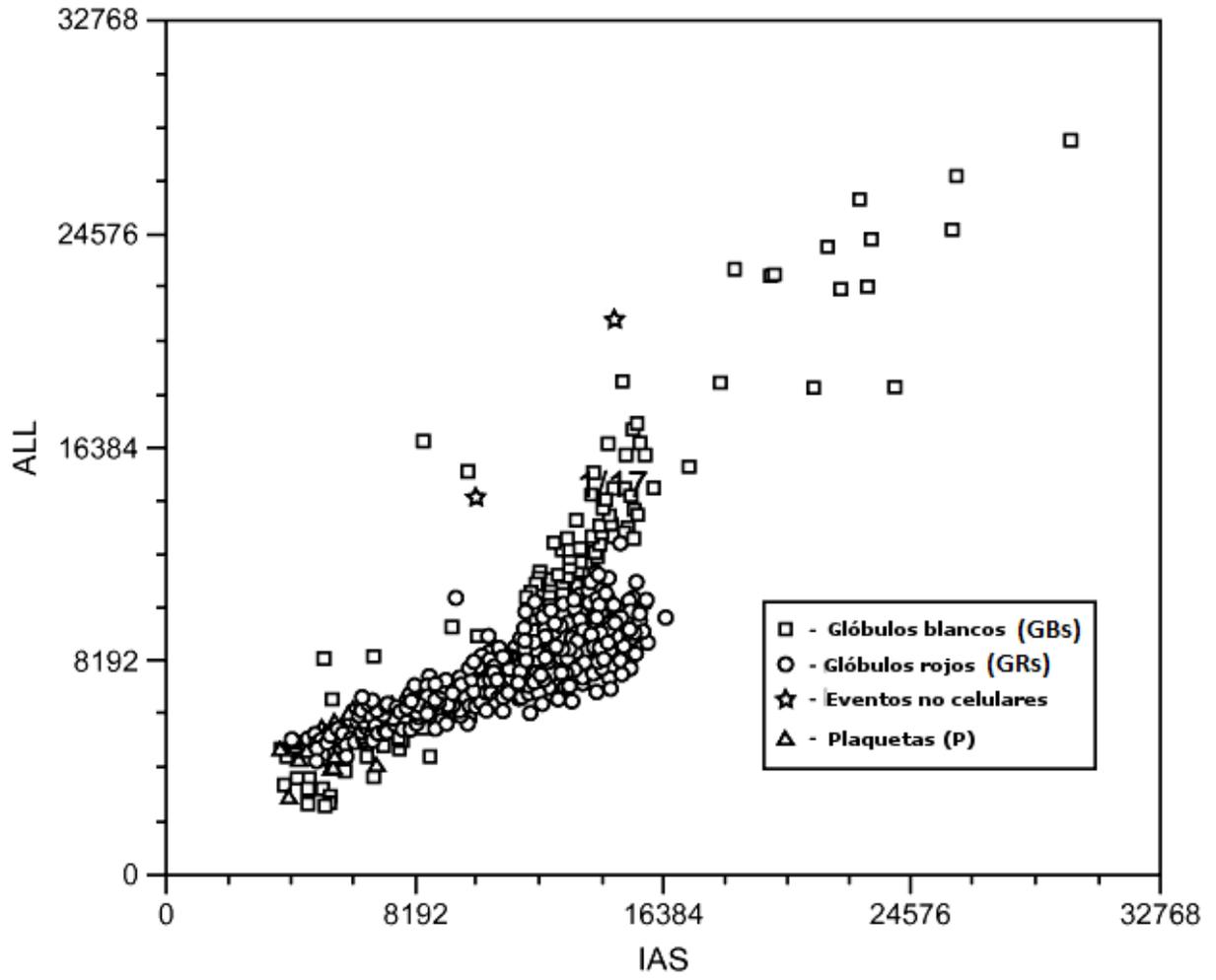


FIG. 2A

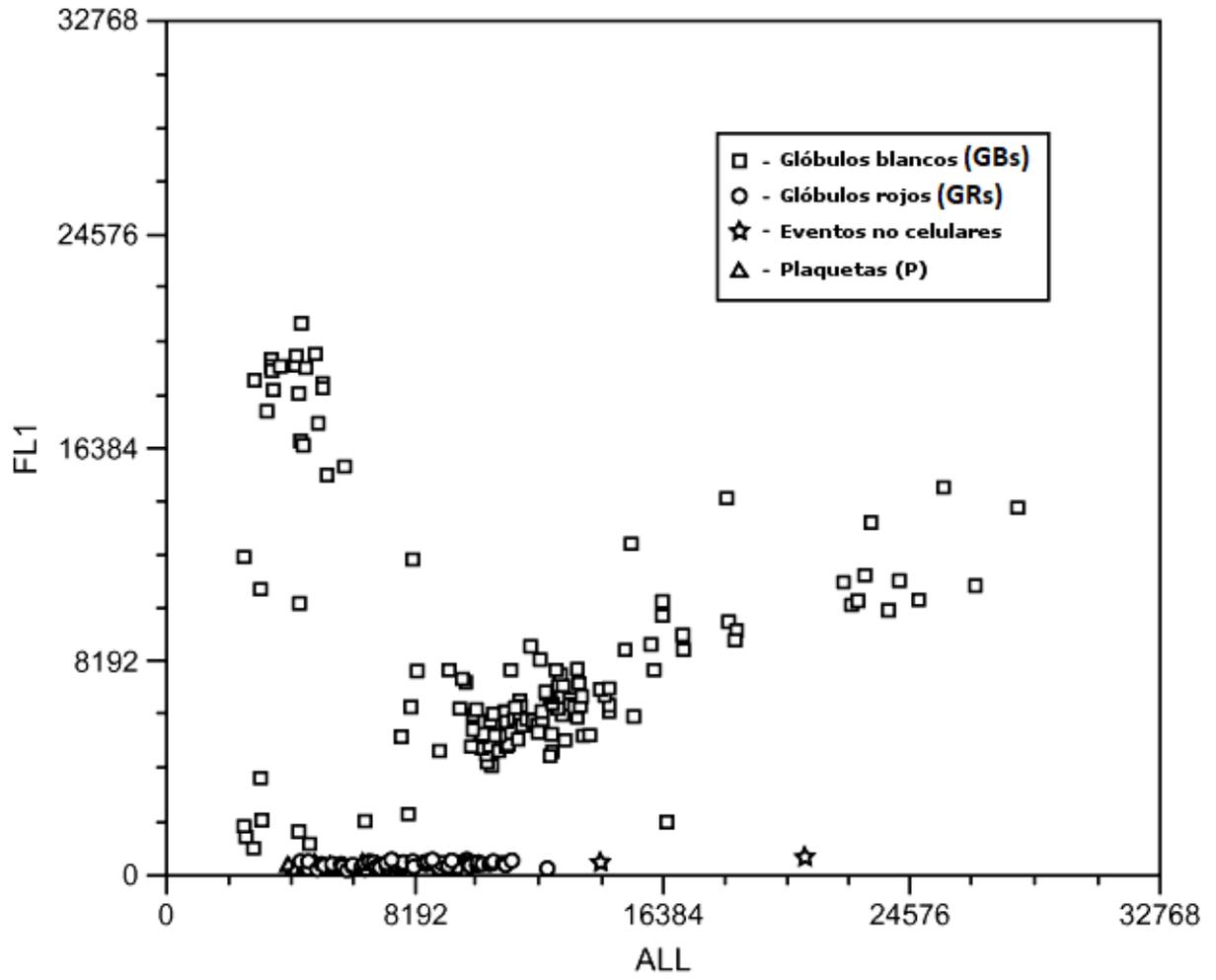


FIG. 2B

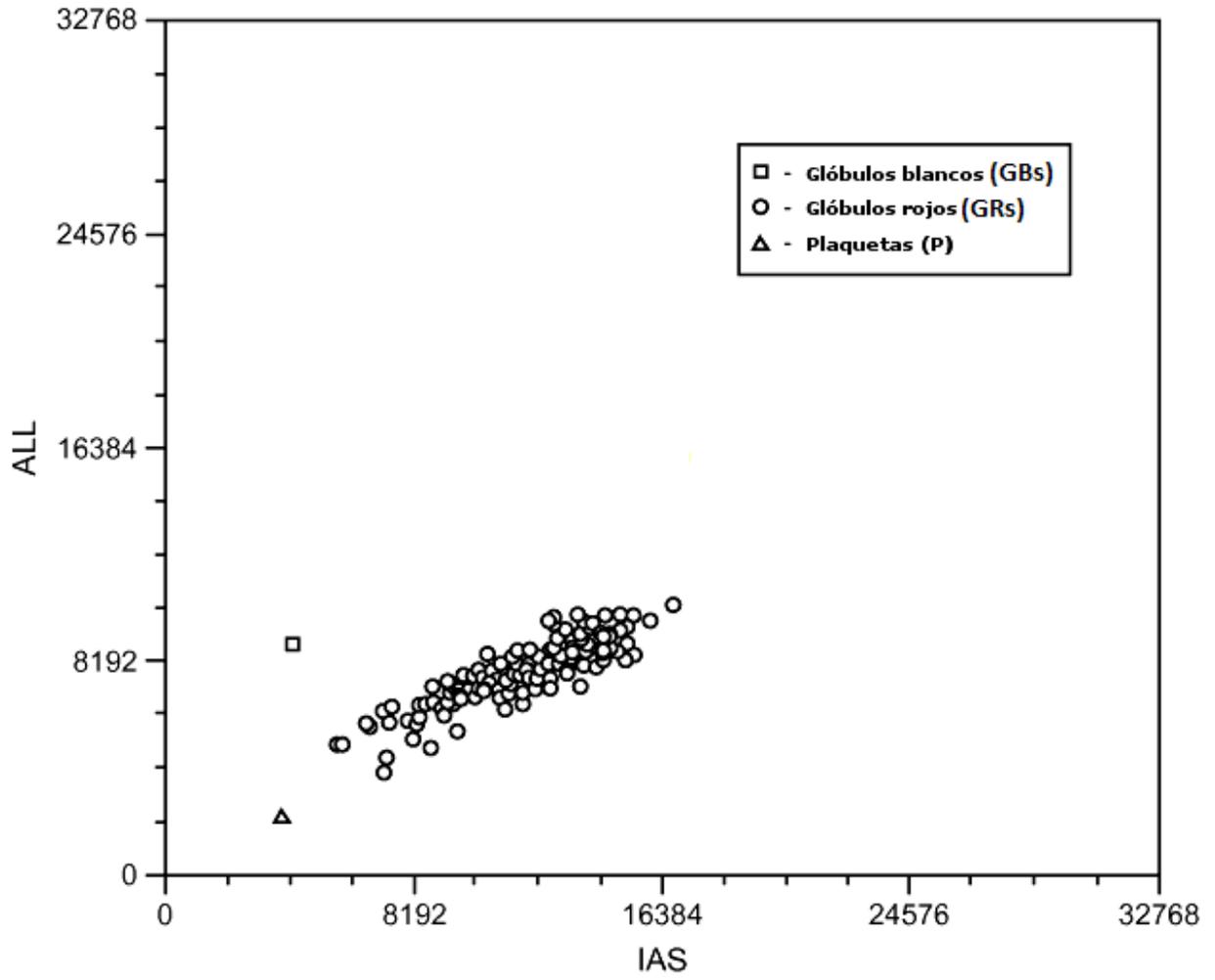


FIG. 3A

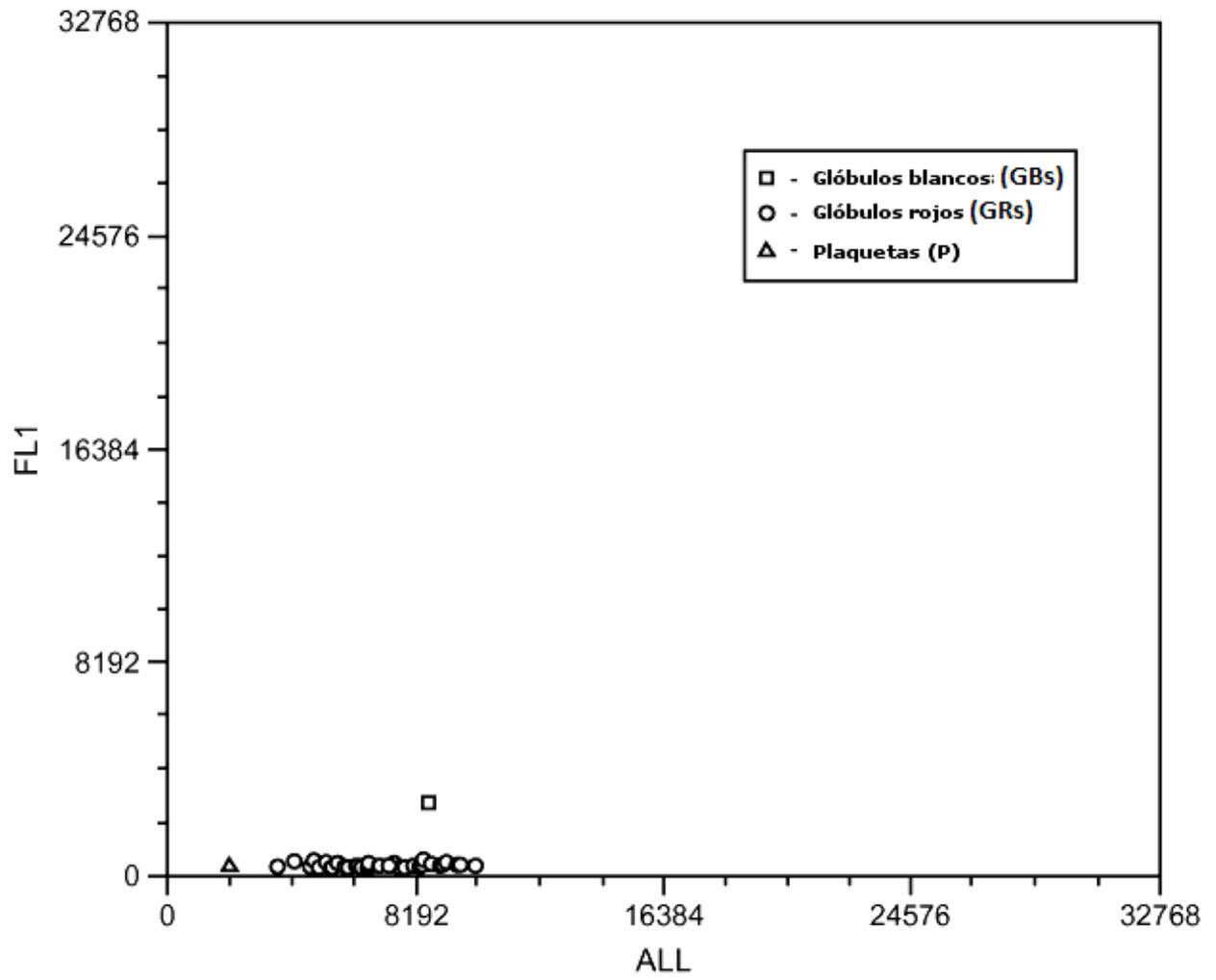


FIG. 3B

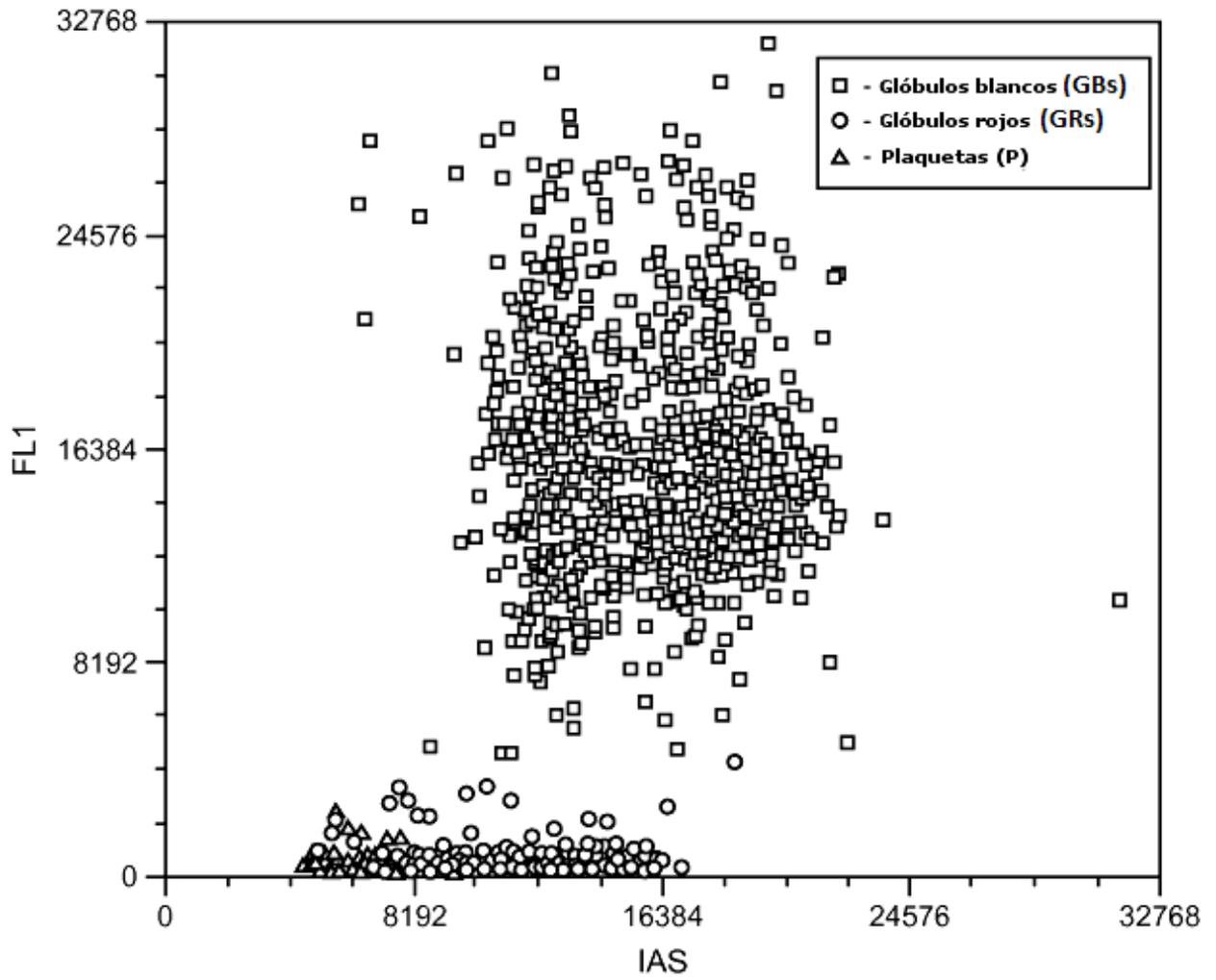


FIG. 4A

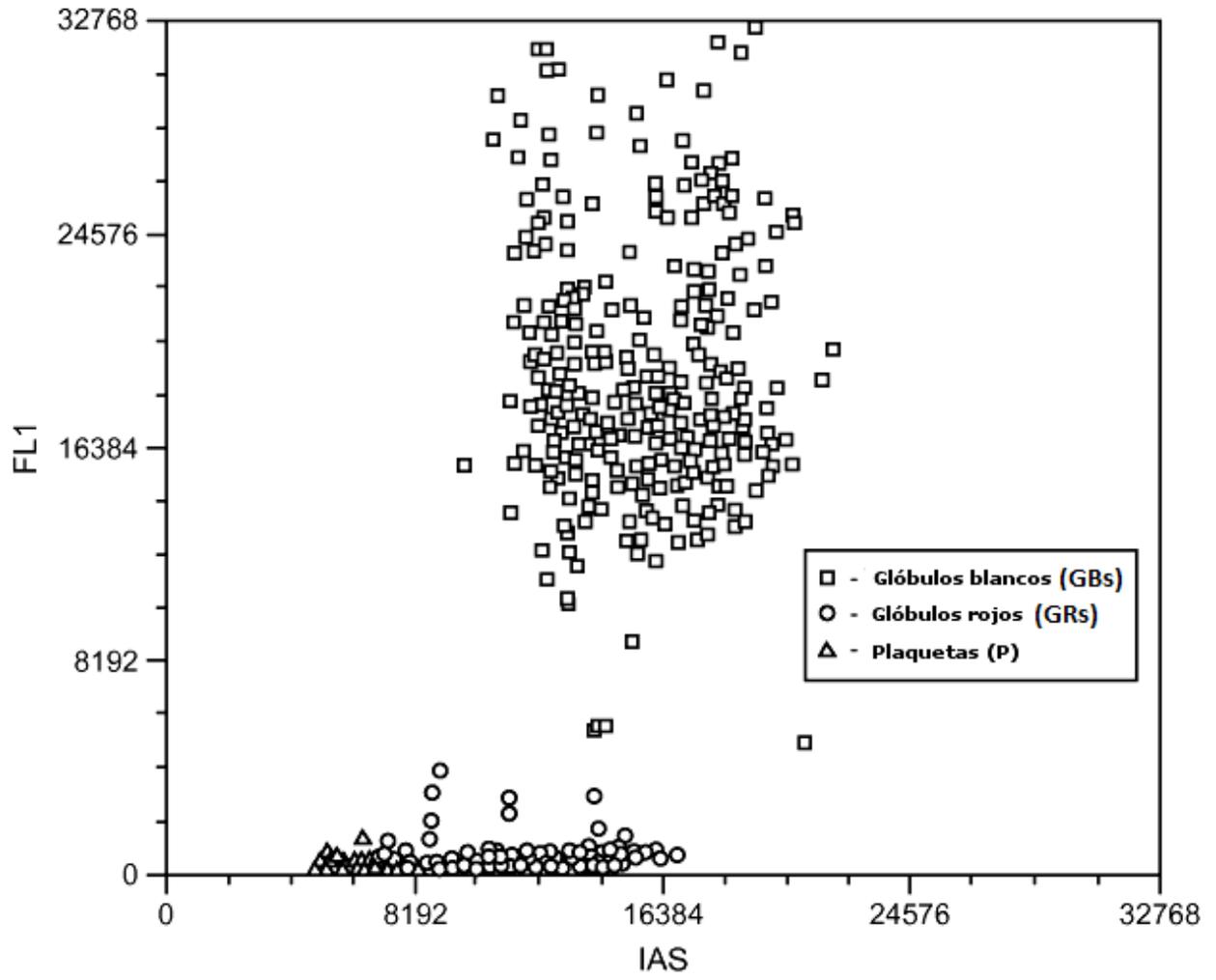


FIG. 4B

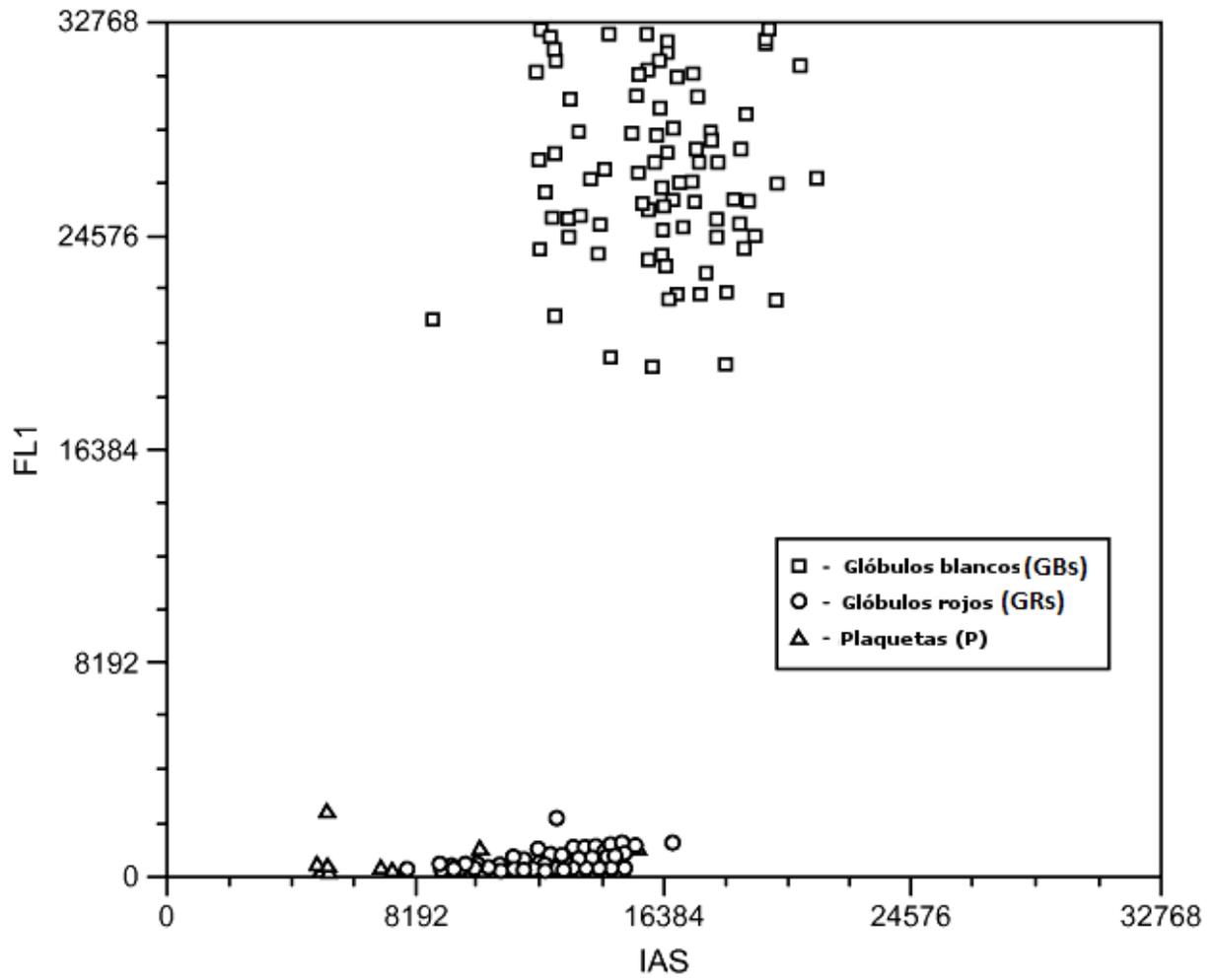


FIG. 4C

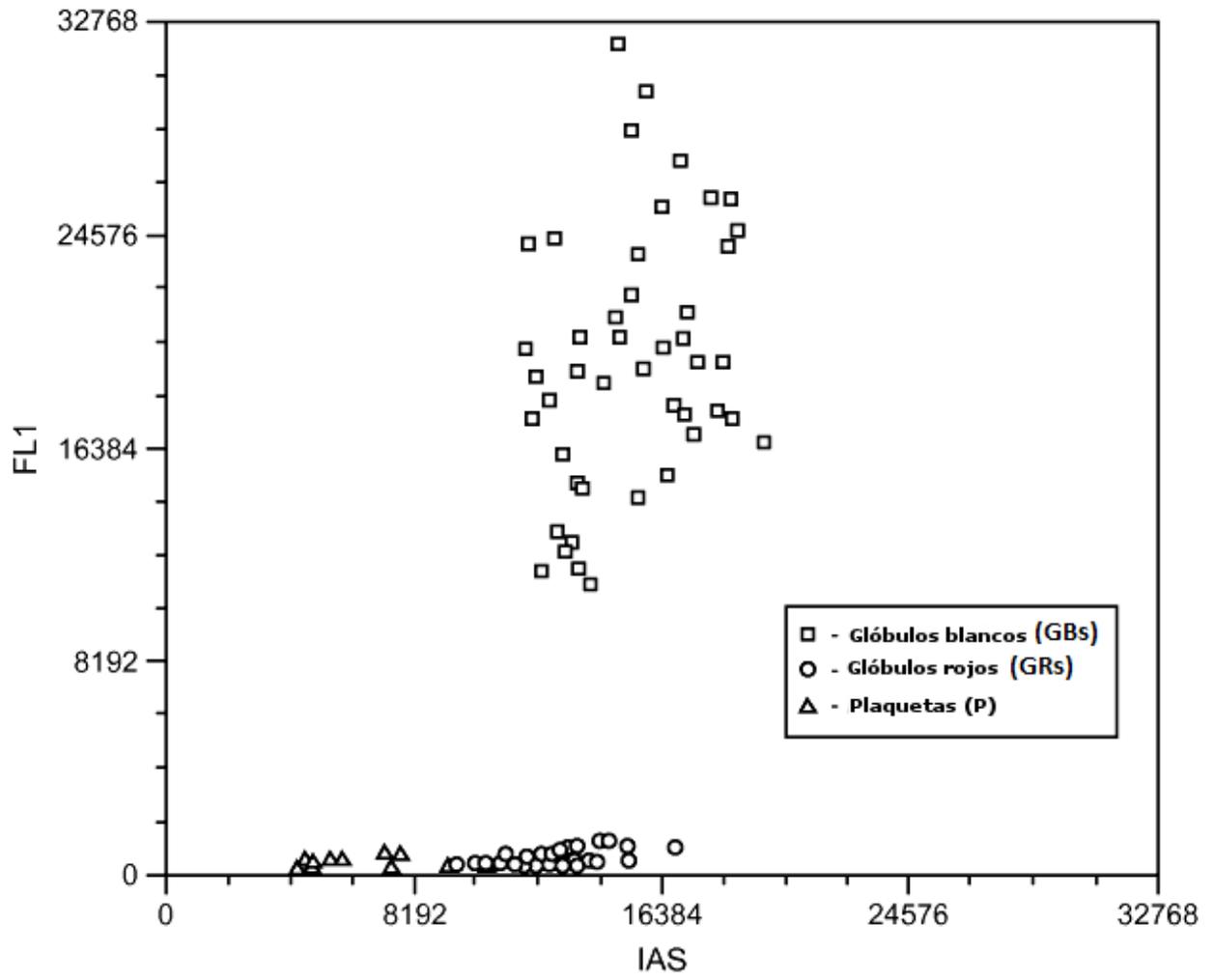


FIG. 4D

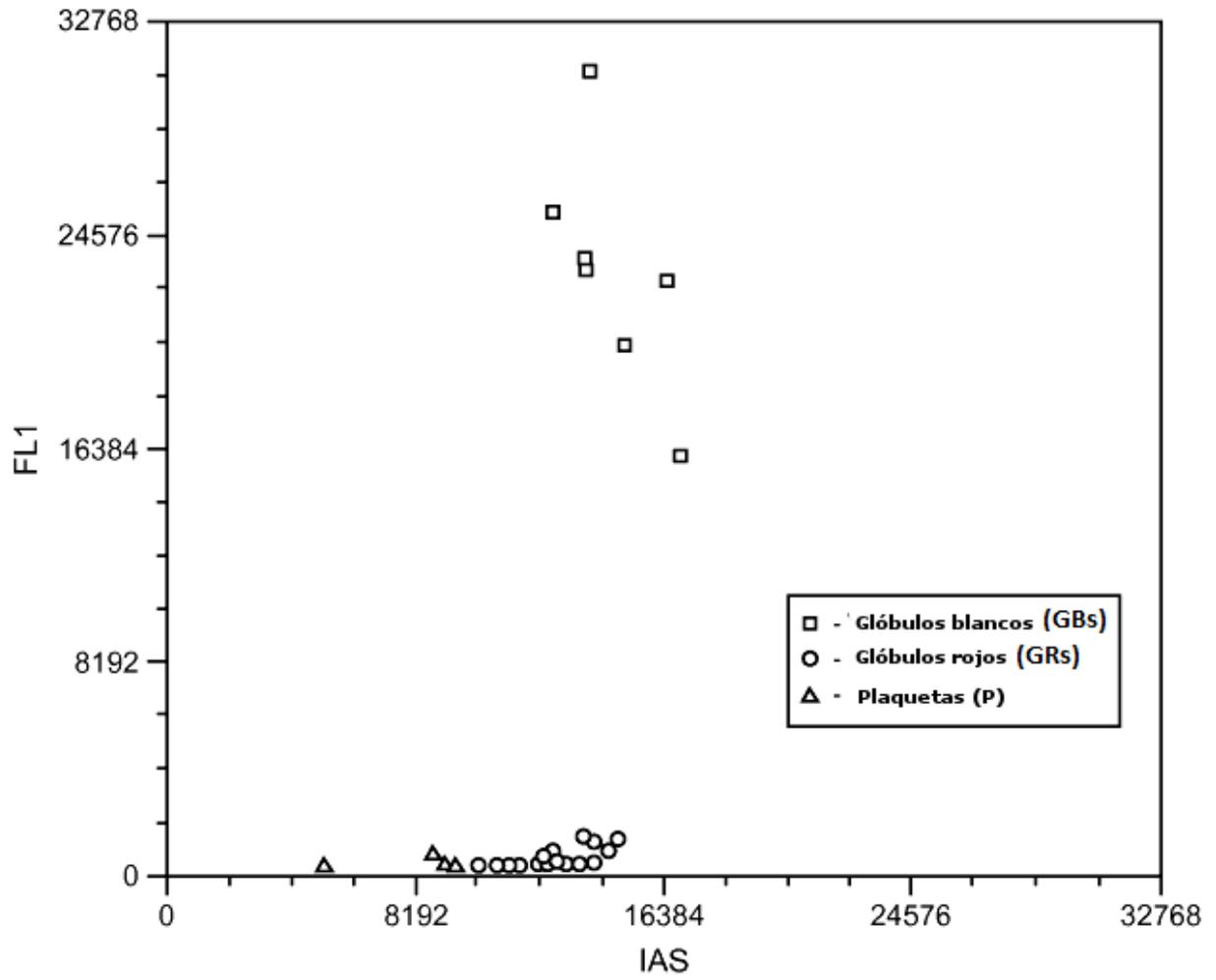


FIG. 4E

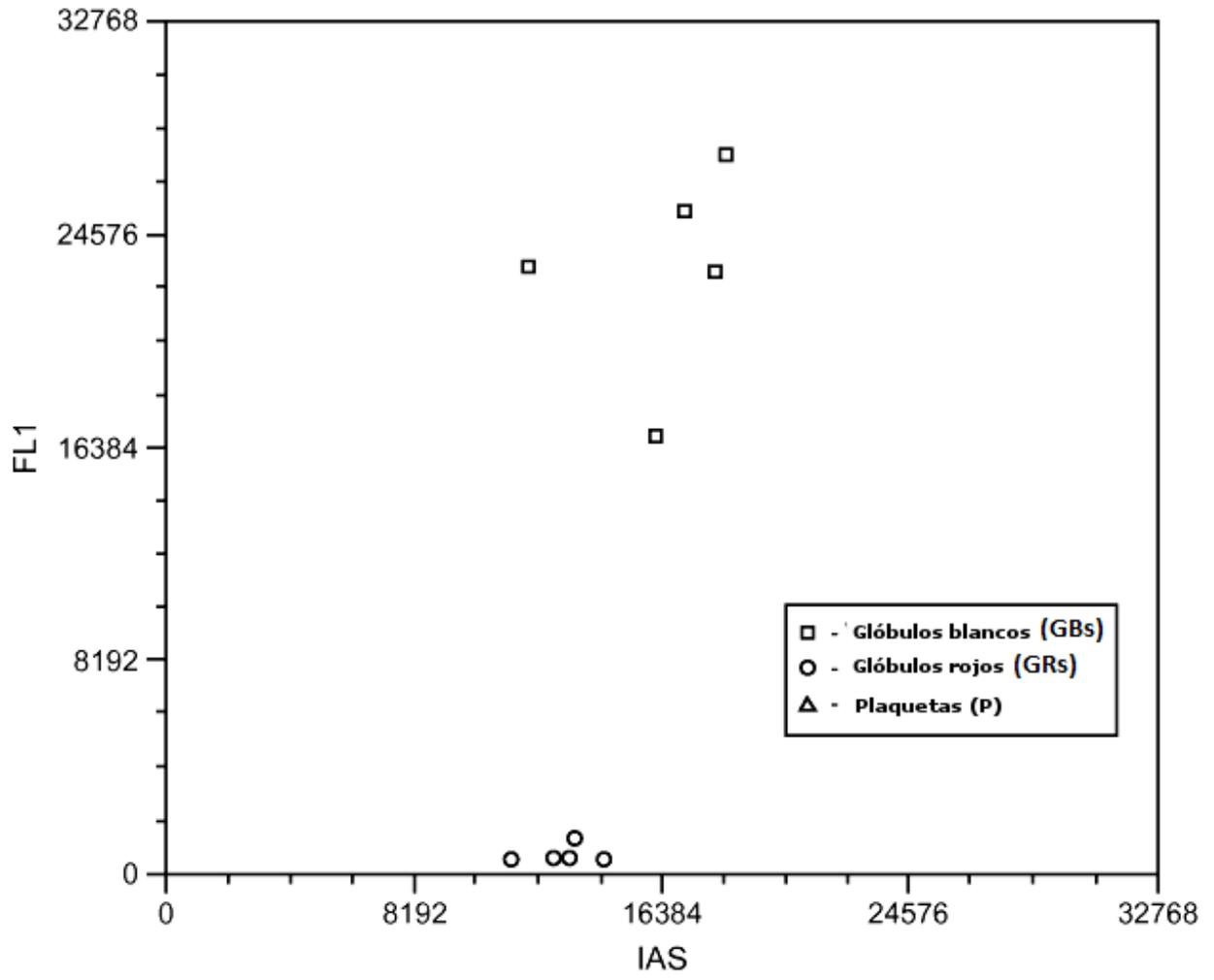


FIG. 4F

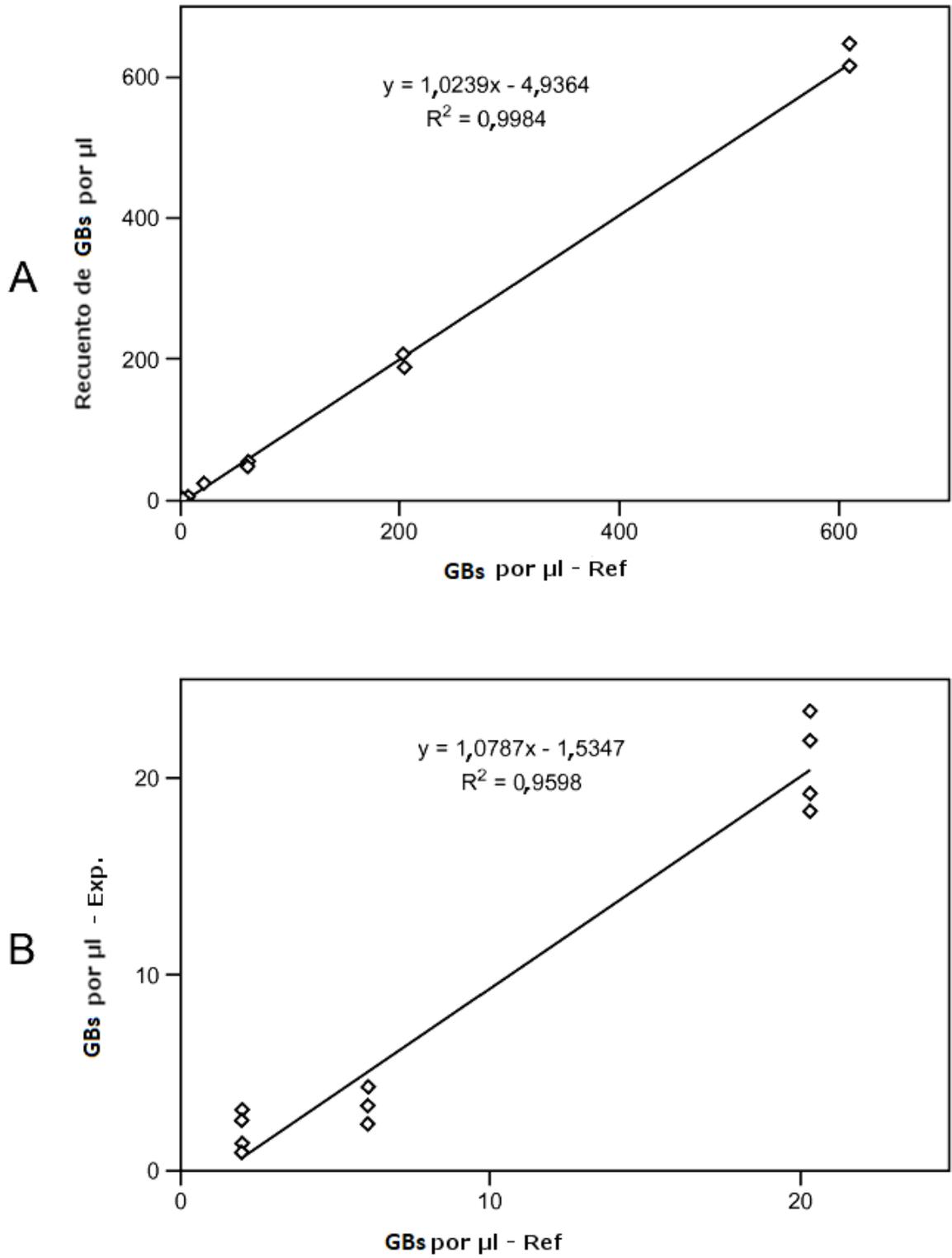


FIG. 5

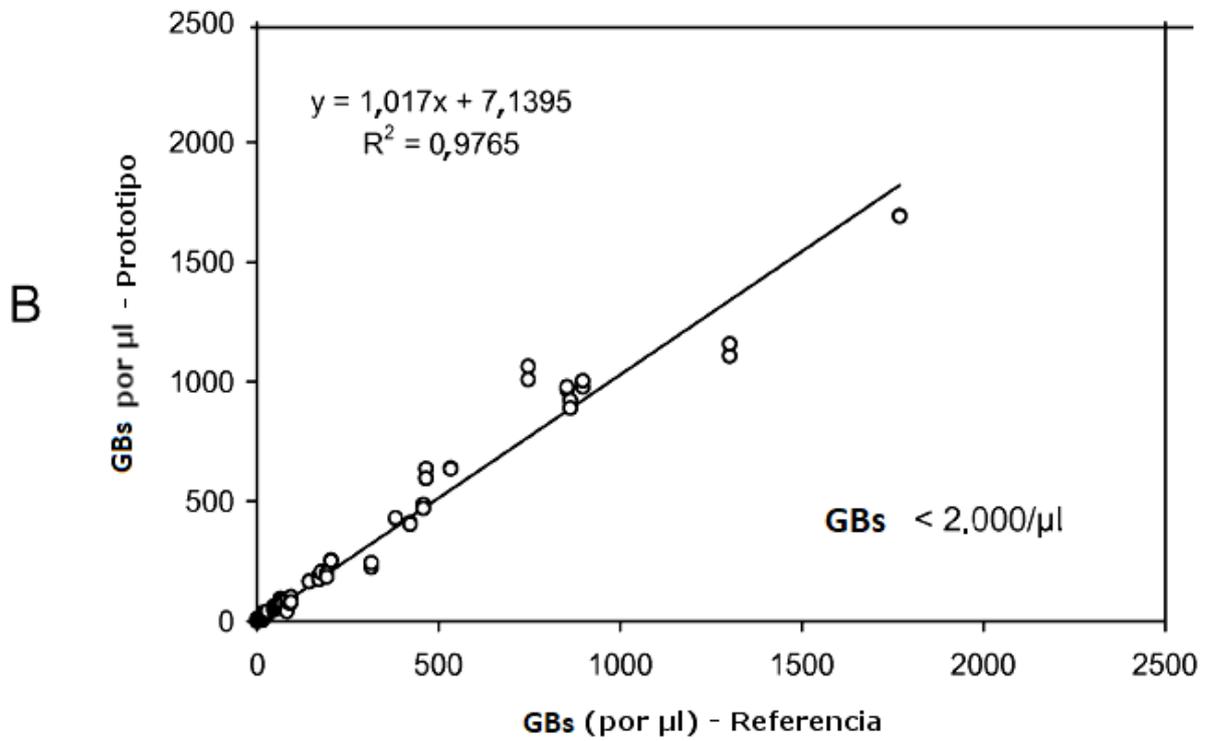
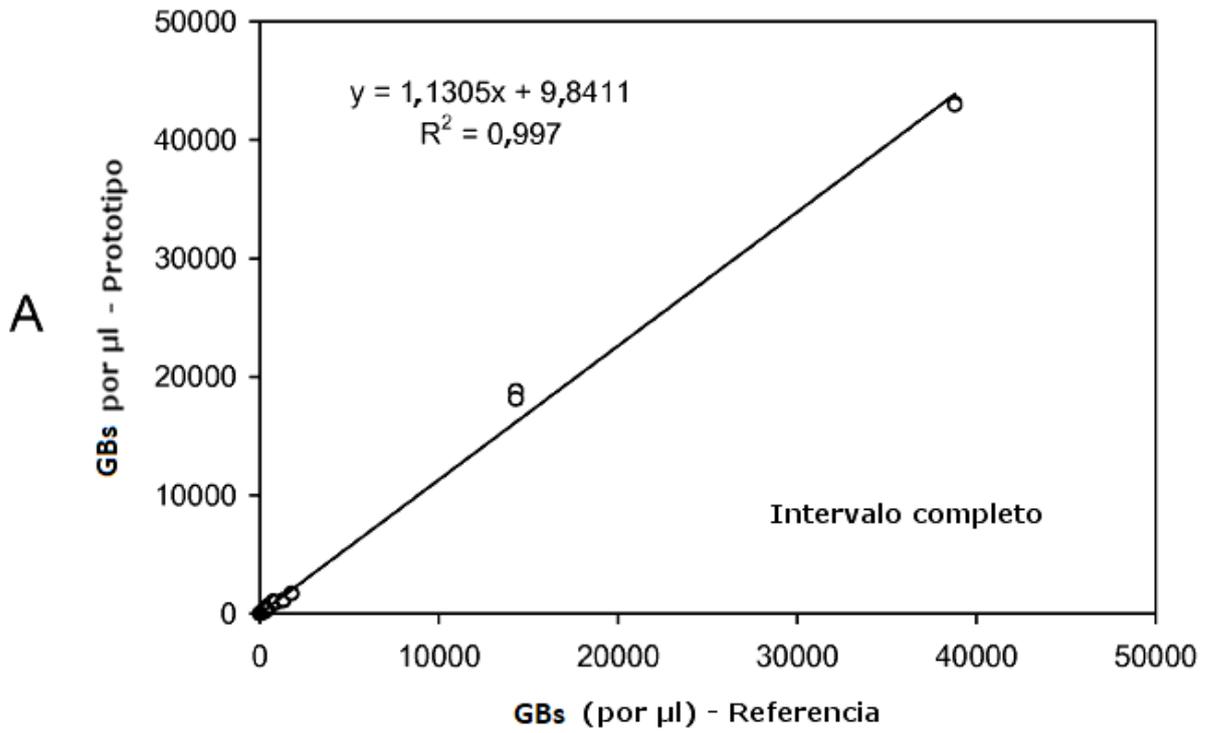


FIG. 6

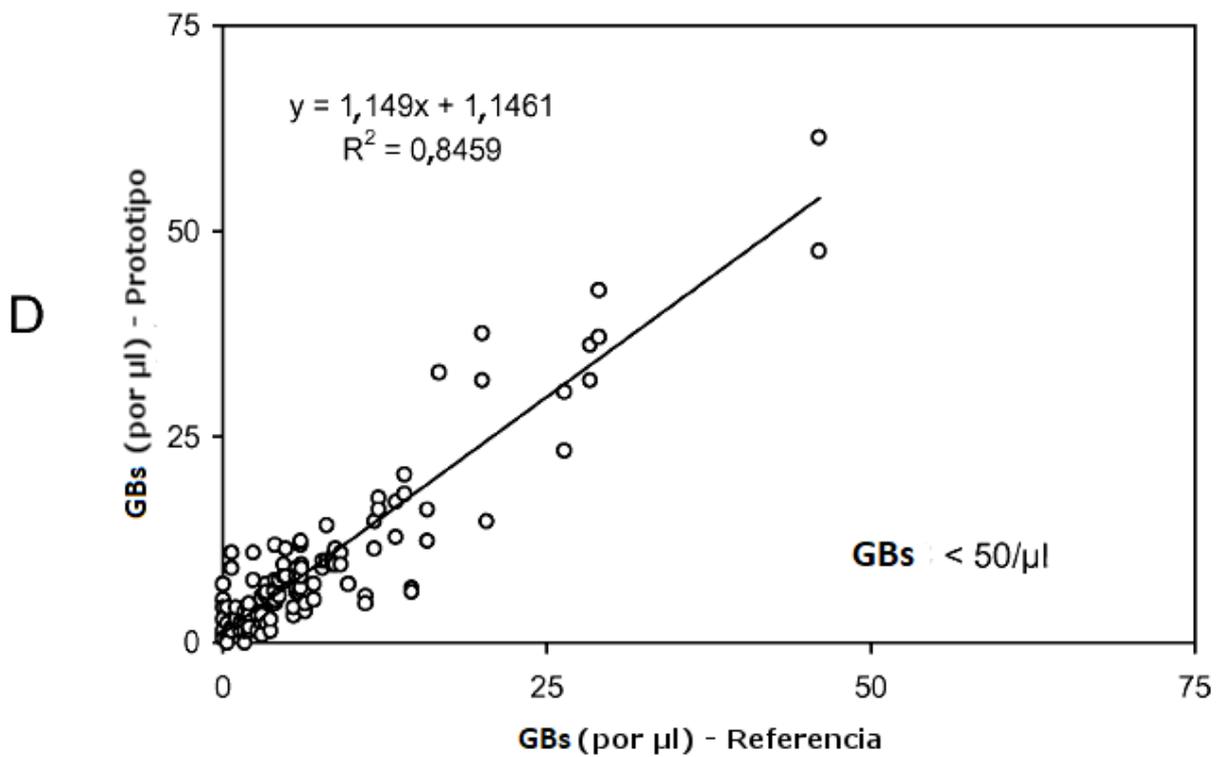
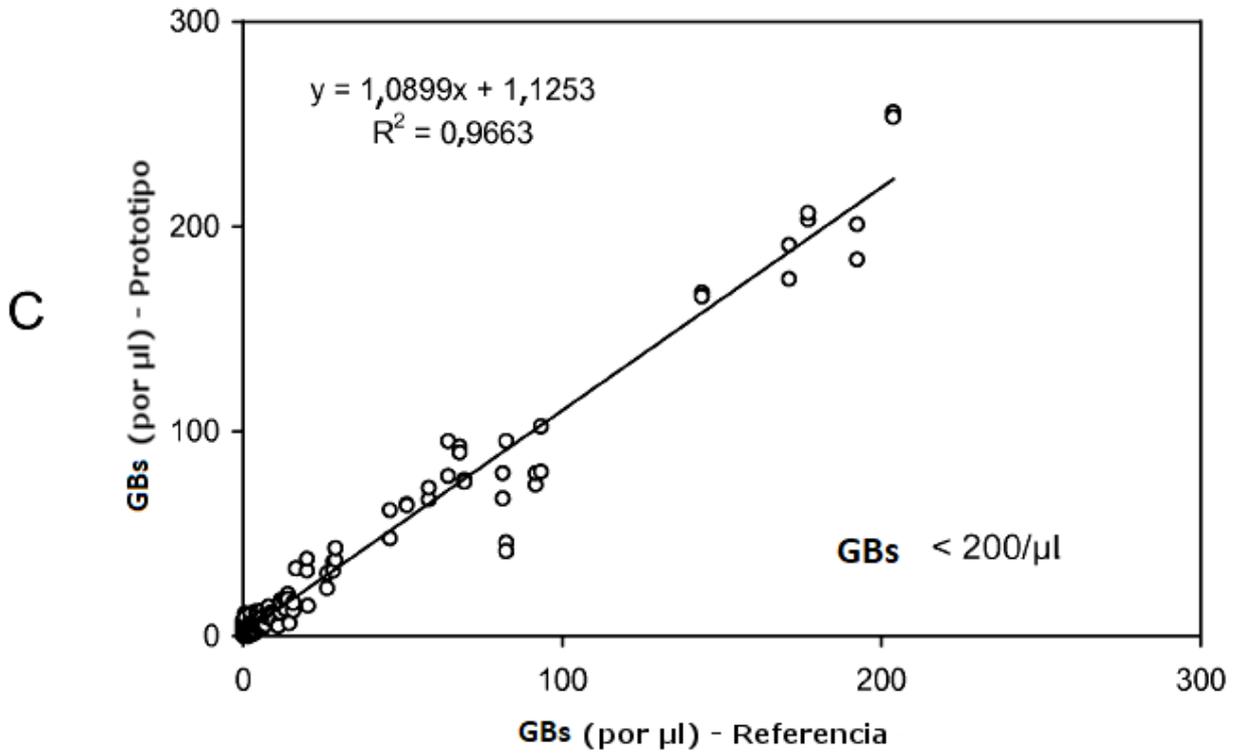


FIG. 6 (Continuación)

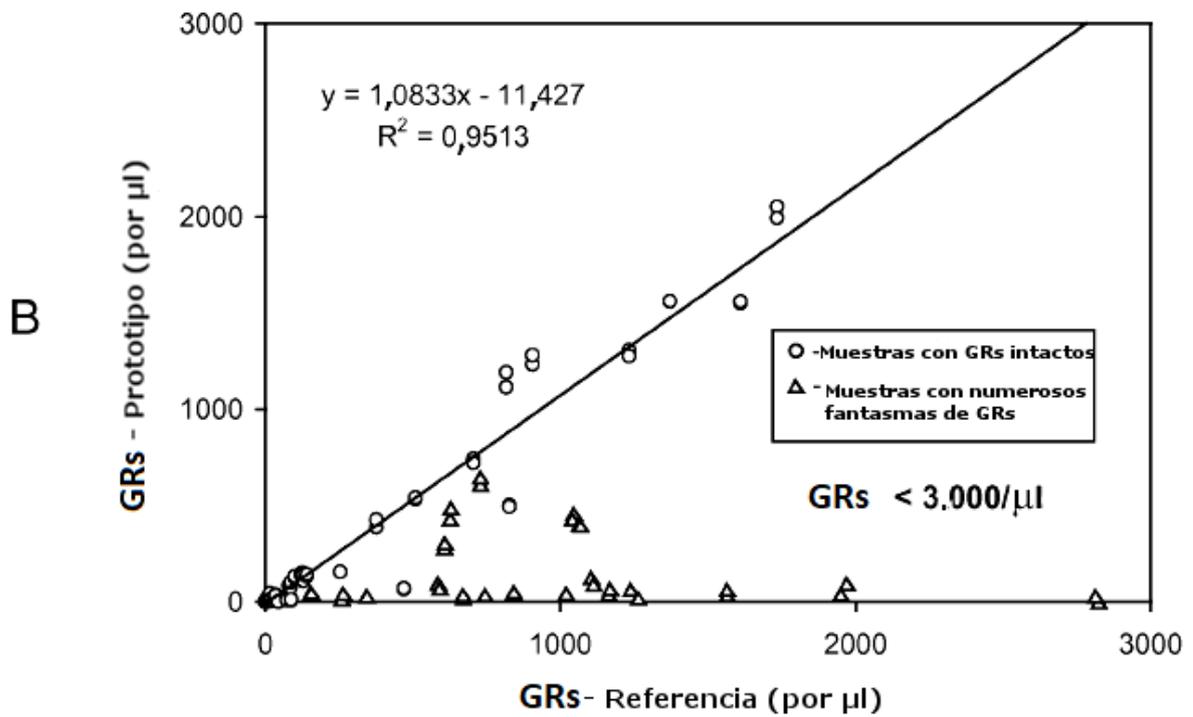
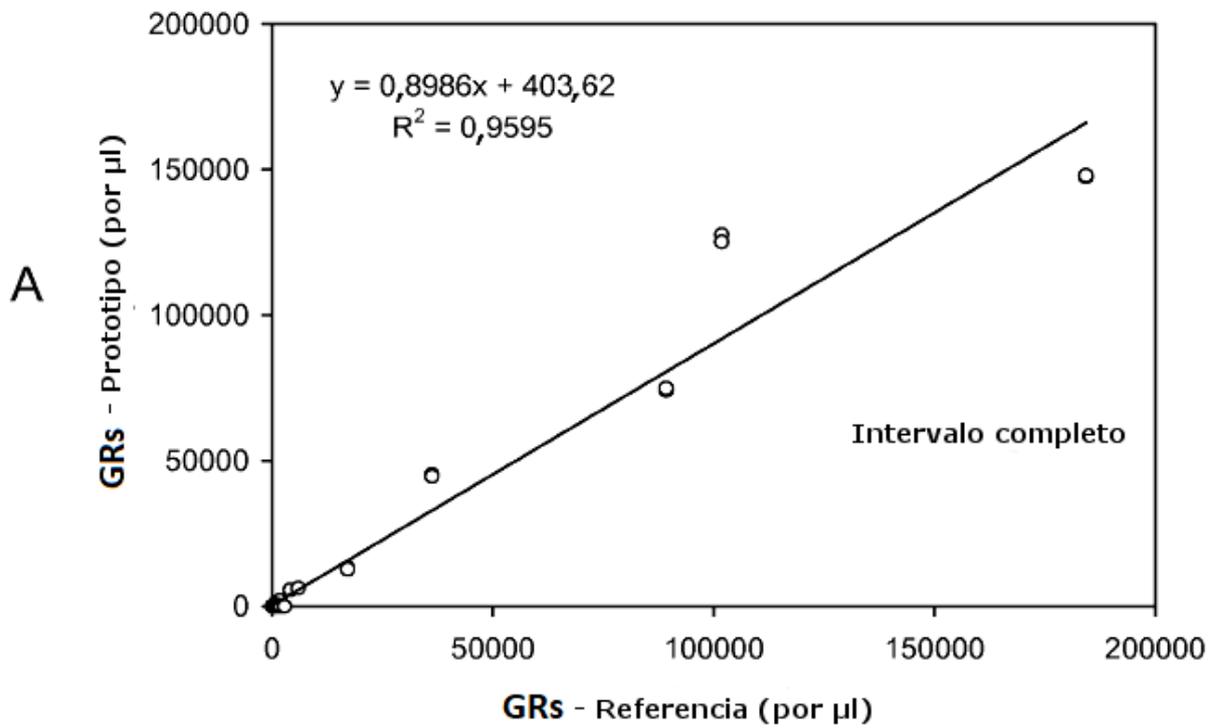


FIG. 7

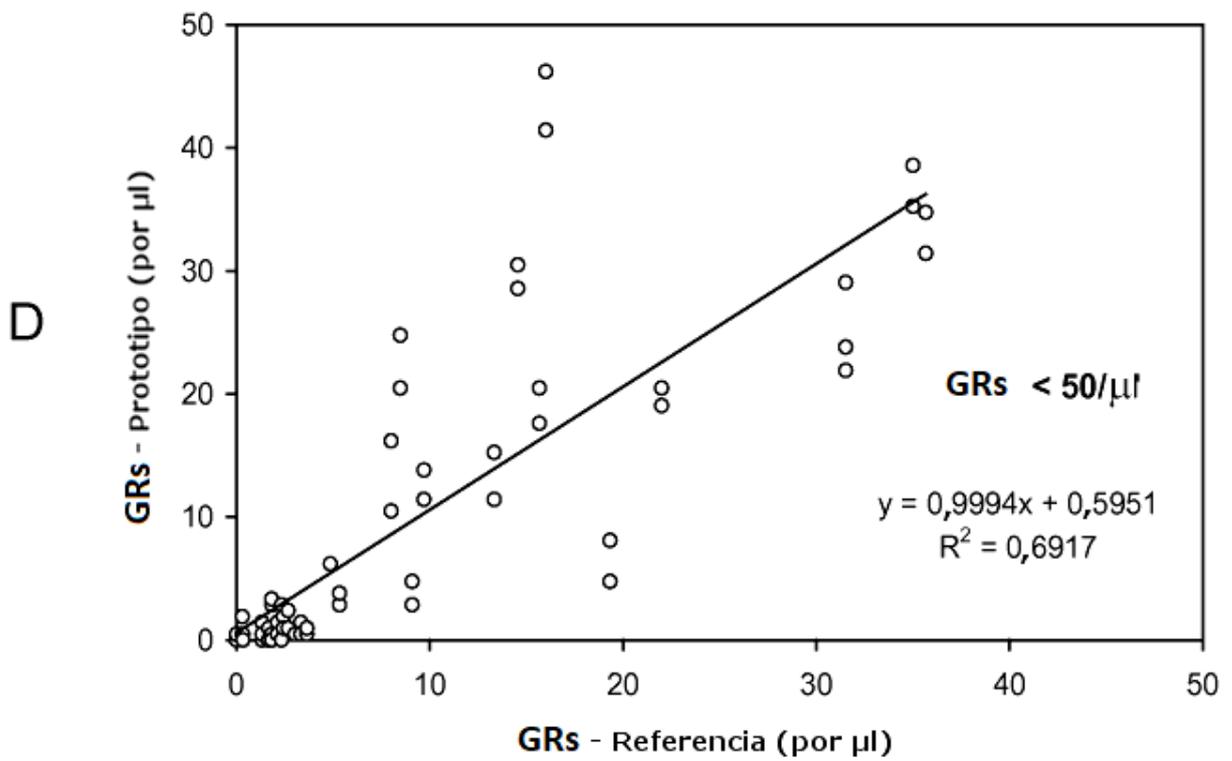
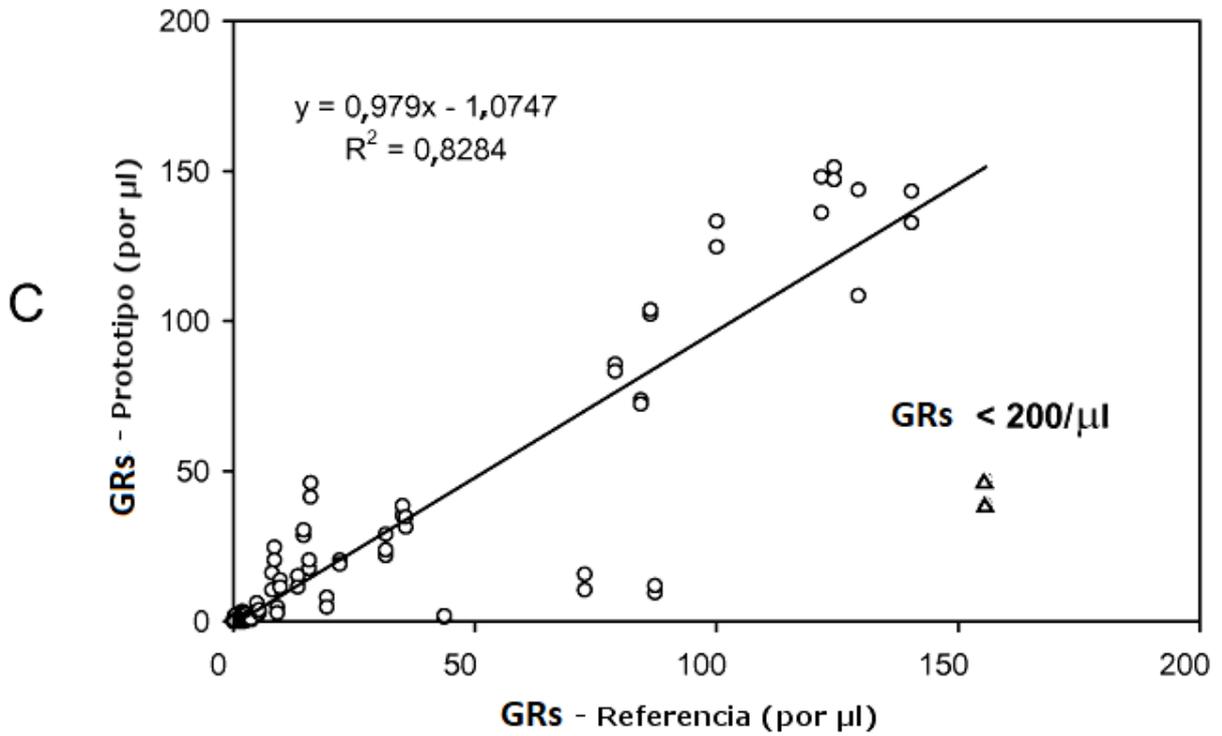


FIG. 7 (Continuación)

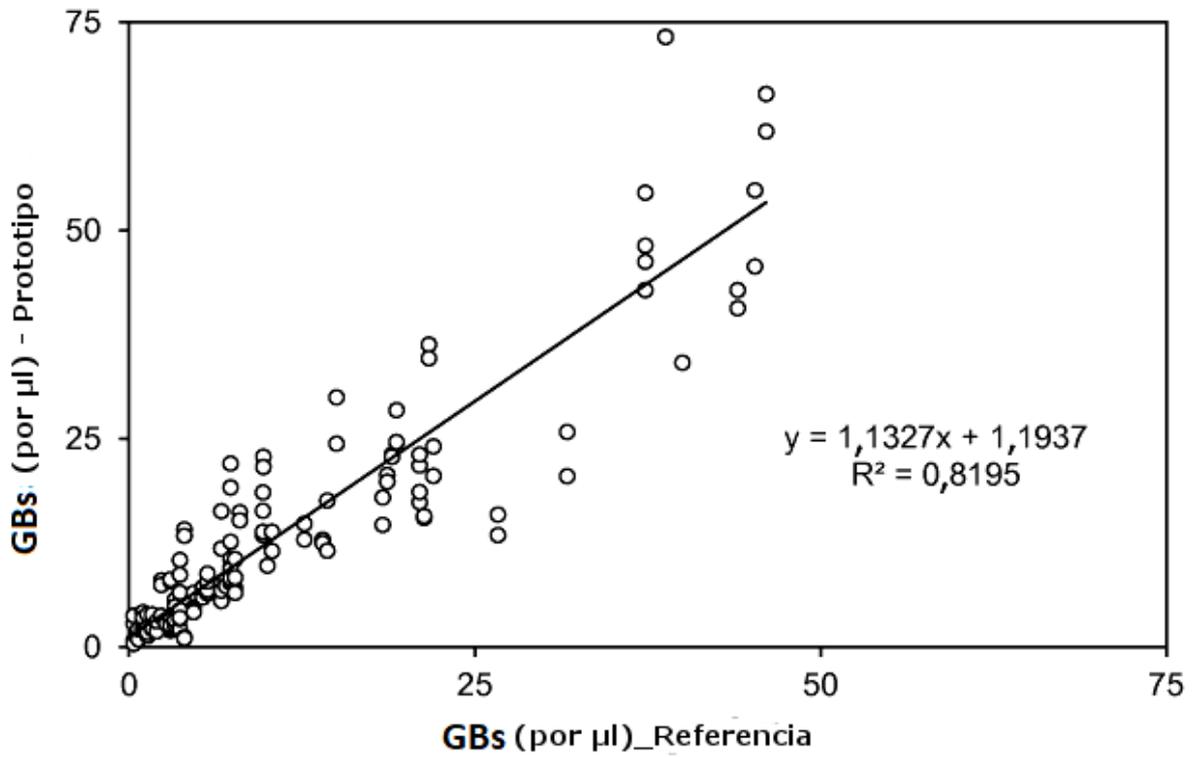


FIG. 8

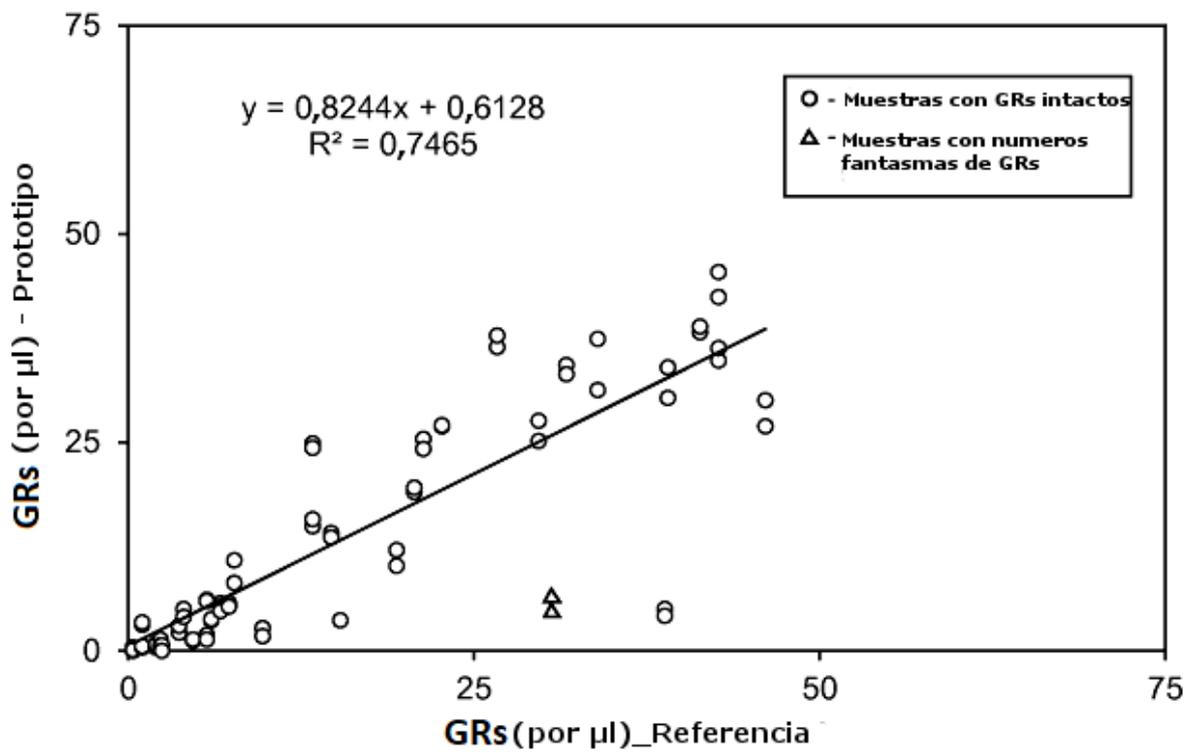


FIG. 9

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

5 La lista de referencias citadas por el solicitante es para conveniencia del lector solamente. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto gran cuidado para la recopilación de las referencias, no se puede excluir la existencia de errores u omisiones y la Oficina de Patentes Europea declina toda responsabilidad al respecto.

**Documentos de patente citados en la descripción**

10

- **US 2011275064 A [0004]**