

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 831**

51 Int. Cl.:

| | |
|-------------------|-----------|
| G01N 15/14 | (2006.01) |
| G01N 15/10 | (2006.01) |
| G01N 1/30 | (2006.01) |
| G01N 1/31 | (2006.01) |
| G01N 15/00 | (2006.01) |
| G01N 33/49 | (2006.01) |
| G01N 21/53 | (2006.01) |
| G01N 33/50 | (2006.01) |
| G01N 33/80 | (2006.01) |
| G01N 21/05 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2014 PCT/US2014/030851**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14145984**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2014 E 14721152 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2972208**

54 Título: **Método y composición para la tinción y el procesamiento de muestras**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361799152 P

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

28.09.2018

73 Titular/es:

**IRIS INTERNATIONAL, INC. (100.0%)
250 S Kraemer Blvd
Brea CA 92821, US**

72 Inventor/es:

**CREMINS, JACK y
QUON, CAROL**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 683 831 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 la tinción y el procesamiento de muestras

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a agentes de contraste de partículas generalmente y más específicamente a composiciones de agentes de contraste de partículas para su uso en dispositivos completa o parcialmente automatizados para discriminar y cuantificar partículas tales como células sanguíneas en una muestra.

10

Antecedentes

El análisis de células sanguíneas es una de las pruebas médicas realizadas más comúnmente para proporcionar una visión general del estado de salud de un paciente. Puede extraerse una muestra de sangre del cuerpo de un paciente y almacenarse en un tubo de ensayo que contiene un anticoagulante para impedir la coagulación. Una muestra de sangre completa comprende normalmente tres clases principales de células sanguíneas incluyendo glóbulos rojos (eritrocitos), glóbulos blancos (leucocitos) y plaquetas (trombocitos). Cada clase puede dividirse además en subclases de miembros. Por ejemplo, los cinco tipos principales o subclases de glóbulos blancos (GB) tienen diferentes formas y funciones. Los glóbulos blancos pueden incluir neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos. Hay también subclases de los tipos de glóbulos rojos. El aspecto de las partículas en una muestra puede diferir según los estados patológicos, la madurez de las células y otras causas. Las subclases de glóbulos rojos pueden incluir reticulocitos y glóbulos rojos nucleados.

Puede hacerse un hemograma que estima la concentración de GR, GB o plaquetas manualmente o usando un analizador automático. Cuando los hemogramas se realizan manualmente, se aplica una gota de sangre a un portaobjetos de microscopio como un frotis fino. Tradicionalmente, se ha usado el examen manual de un frotis de sangre teñido, secado sobre un portaobjetos de microscopio para determinar el número o las cantidades relativas de los cinco tipos de glóbulos blancos. Se han usado tinciones y colorantes histológicos para teñir células o estructuras celulares. Por ejemplo, la tinción de Wright es una tinción histológica que se ha usado para teñir frotis de sangre para su examen bajo microscopio óptico. La tinción de una muestra 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 de la degradación y mantener la estructura celular. Después de eso, puede aplicarse un agente de permeabilización 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 aclararse adicionalmente para la 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 en la muestra pueden degradarse antes de fijarse y se pierde cualquiera 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. Las técnicas de tinción actuales requieren múltiples etapas y un tiempo significativo.

Las técnicas de tinción actuales requieren la dilución de muestras en los agentes de contraste generalmente a alrededor de 1:500 o 1:5000. Por tanto, la tinción apropiada con técnicas de tinción actuales puede dar como resultado

Los analizadores automatizados son cada vez más prevalentes. Puede obtenerse un hemograma completo (HC) usando un analizador automatizado, un tipo del cual cuenta el número de partículas o células diferentes en una muestra de sangre basándose en la impedancia o dispersión de luz dinámica a medida que las partículas o células pasan a través de un área de detección a lo largo de un tubo pequeño. El HC automatizado puede emplear instrumentos o métodos para diferenciar entre diferentes tipos de células que incluyen GR, GB y plaquetas (PLT), que pueden contarse por separado. Por ejemplo, podría usarse una técnica de recuento que requiere un volumen o tamaño de partícula mínimo para contar sólo células grandes. Determinadas células tales como células anómalas en la sangre pueden no contarse o identificarse correctamente. Células pequeñas que se adhieren entre sí pueden contarse erróneamente como una célula grande. Cuando se sospecha de recuentos erróneos, puede requerirse la revisión manual de los resultados del instrumento para verificar e identificar células.

Las técnicas de recuento de células sanguíneas automatizadas pueden implicar citometría de flujo. La citometría de flujo implica proporcionar una trayectoria de flujo estrecha, y detectar y contar el paso de células sanguíneas individuales. Se han usado métodos de citometría de flujo para detectar partículas suspendidas en un líquido, tales como células en una muestra de sangre, y para analizar las partículas según el tipo de partícula, la dimensión y

distribución de volumen para deducir la concentración del tipo de partícula respectiva o el volumen de partículas en la muestra de sangre. Los ejemplos de métodos adecuados para analizar partículas suspendidas en un líquido incluyen sedimentación, caracterización microscópica, recuento basándose en la impedancia y dispersión de luz dinámica. Estas herramientas están sujetas a errores de pruebas. Por otro lado, la caracterización precisa de los tipos y la concentración de partículas puede ser crítica en aplicaciones tales como diagnóstico médico.

En técnicas de recuento basadas en obtención de imágenes, se capturan imágenes de datos de píxeles de una muestra preparada que puede hacerse pasar a través de un área de observación usando una lente objetivo de microscopio acoplada a una cámara digital. Los datos de imágenes de píxeles pueden analizarse usando técnicas de procesamiento de datos, y también presentarse en un monitor.

Se dan a conocer aspectos de sistemas de diagnóstico automatizados con células de flujo en la patente estadounidense n.º 6.825.926 concedida a Turner *et al.* y en las patentes estadounidenses n.ºs 6.184.978; 6.424.415; y 6.590.646, todas concedidas a Kasdan *et al.*

Se han usado sistemas automatizados que usan dispersión de luz dinámica o impedancia para obtener un hemograma completo (HC): recuento de glóbulos blancos (GB) total, volumen celular total de glóbulos rojos (distribución de GR), hemoglobina HGB (la cantidad de hemoglobina en la sangre); volumen celular medio (VCM) (volumen medio de los glóbulos rojos); VPM (volumen medio de plaquetas); hematocrito (HCT); HCM (HGB/GR) (la cantidad promedio de hemoglobina por glóbulo rojo); y CHCM (HGB/HCT) (la concentración promedio de hemoglobina en las células). Se han usado procedimientos automatizados o parcialmente automatizados para facilitar el recuento diferencial de las cinco partes de glóbulos blancos y los análisis de muestras de sangre.

Los diversos sistemas automatizados descritos anteriormente se basan en el análisis rápido de muestras. El número de y la duración de las etapas del procedimiento 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 procedimiento de tinción se acorta, y además más eficientes si el procedimiento 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 EP 0656540 A2 se refiere a agentes colorantes y a un aparato para el análisis de imágenes de partículas de tinción de tipo flujo.

El documento US2012/0322099 A1 se refiere a formulaciones, sistemas y métodos que permiten la preparación automatizada de muestras para su examen.

El documento US 2007/0111276 A1 se refiere a un reactivo y procedimiento para la identificación y el recuento de células biológicas en una muestra.

Sumario

La invención se define en las reivindicaciones. Por tanto, se da a conocer una composición de agentes de contraste de partículas para teñir una muestra de líquido sanguíneo de la que están obteniéndose imágenes en un sistema de análisis de partículas automatizado. La composición de agentes de contraste de partículas incluye al menos dos agentes de contraste de partículas seleccionados del grupo que consiste en cristal violeta, nuevo azul de metileno, verde de metilo, eosina Y y safranina O. La composición de agentes de contraste de partículas incluye además un agente de permeabilización que incluye saponina presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de entre aproximadamente 50 mg/l y aproximadamente 750 mg/l en condiciones de tinción. La composición de agentes de contraste de partículas incluye además un agente de fijación seleccionado del grupo que consiste en glutaraldehído y formaldehído.

En una realización, el agente de permeabilización es saponina presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de entre aproximadamente 50 mg/l y aproximadamente 750 mg/l en condiciones de tinción. El agente de fijación puede ser glutaraldehído presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones a o por debajo del 0,1% en condiciones de tinción.

En una realización, los al menos dos agentes de contraste de partículas pueden incluir cristal violeta, nuevo azul de metileno y eosina-Y. La razón del cristal violeta con respecto al nuevo azul de metileno puede ser de entre aproximadamente 1:90 y aproximadamente 1:110 en condiciones de tinción. La eosina-Y puede estar presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 3 µM a aproximadamente 300 µM en condiciones de tinción.

En una realización, el cristal violeta puede estar presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 6 µM a aproximadamente 10 µM en condiciones de tinción. El nuevo azul de metileno puede estar presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 70 µM a aproximadamente 2,4 mM en condiciones de tinción. La eosina-Y puede estar presente

en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 50 μM en condiciones de tinción.

5 En algunas realizaciones, el cristal violeta es aproximadamente el 90% puro o más. El nuevo azul de metileno puede ser aproximadamente el 70% puro o más. La eosina-Y puede ser aproximadamente el 80% pura o más.

10 En algunas realizaciones, el cristal violeta está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 7,8 μM en condiciones de tinción. El nuevo azul de metileno está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 735 μM en condiciones de tinción. La eosina-Y puede estar presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 27 μM en condiciones de tinción. En algunas realizaciones, la composición de agentes de contraste de partículas puede incluir adicionalmente componentes de tampón.

15 Según las reivindicaciones, se da a conocer un método para tratar partículas de una muestra de líquido sanguíneo de la que se obtendrán imágenes usando un sistema de análisis de partículas automatizado. El método incluye combinar la muestra de líquido sanguíneo con una composición de agentes de contraste de partículas tal como se define en las reivindicaciones para obtener una mezcla de muestra e incubar la mezcla de muestra a una temperatura de entre aproximadamente 37°C y aproximadamente 60°C durante menos de 90 segundos. La composición de agentes de contraste de partículas incluye al menos dos agentes de contraste de partículas seleccionados del grupo que consiste en cristal violeta, nuevo azul de metileno, verde de metilo, eosina Y y safranina O; un agente de permeabilización que incluye saponina presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de entre aproximadamente 50 mg/l y aproximadamente 750 mg/l en condiciones de tinción; y un agente de fijación seleccionado del grupo que consiste en glutaraldehído y formaldehído.

25 En algunas realizaciones, los agentes de contraste de partículas pueden incluir cristal violeta y nuevo azul de metileno en cantidades suficientes para dar como resultado una razón del cristal violeta con respecto al nuevo azul de metileno de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:500 en condiciones de tinción. La saponina se incluye en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de entre aproximadamente 50 mg/l y aproximadamente 750 mg/l en condiciones de tinción. El glutaraldehído puede incluirse en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones a o por debajo del 0,1% en condiciones de tinción. El método puede incluir la mezcla de muestra que se incuba durante menos de 60 segundos.

35 En algunas realizaciones, la composición de agentes de contraste de partículas puede incluir cristal violeta presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones a de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 10 μM en condiciones de tinción. El nuevo azul de metileno puede estar presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 70 μM a aproximadamente 2,4 mM en condiciones de tinción. La eosina-Y puede estar presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 50 μM en condiciones de tinción. La muestra de líquido sanguíneo puede combinarse con la composición de agentes de contraste de partículas a una razón de la muestra de líquido sanguíneo con respecto a la composición de agentes de contraste de partículas de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:10.

45 En algunas realizaciones, el método puede incluir calentar la mezcla de muestra hasta entre 46°C y aproximadamente 49°C durante entre 40 y 50 segundos.

En alguna realización, el cristal violeta puede ser aproximadamente el 90% puro o más. El nuevo azul de metileno puede ser aproximadamente el 70% puro o más. La eosina-Y puede ser aproximadamente el 80% pura o más.

50 En algunas realizaciones, el agente de contraste de partículas puede incluir cristal violeta presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones a aproximadamente 7,8 μM en condiciones de tinción; nuevo azul de metileno presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 735 μM en condiciones de tinción; y eosina-Y presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 27 μM en condiciones de tinción. La composición de agentes de contraste de partículas puede incluir además componentes de tampón. La muestra de líquido sanguíneo puede combinarse con la composición de agentes de contraste de partículas a una razón de la muestra de líquido sanguíneo con respecto a la composición de agentes de contraste de partículas de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 1:4. La mezcla de muestra puede calentarse hasta aproximadamente 47°C durante aproximadamente 45 segundos.

60 Lo descrito anteriormente y muchas otras características y ventajas relacionadas de 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

65 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 líquido de muestra según una realización.

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

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

La figura 4 es una ilustración representativa de glóbulos blancos seleccionados teñidos según el procedimiento de tinción rápido, de una etapa según una realización.

La figura 5 es una ilustración representativa de glóbulos blancos seleccionados de una muestra teñida con una composición de agentes de contraste de partículas según una realización.

La figura 6 es una ilustración representativa de células teñidas según un ejemplo 1 temprano.

La figura 7 es una ilustración representativa de células teñidas según un ejemplo 2 temprano.

La figura 8 es una ilustración representativa de células teñidas según un ejemplo 3 temprano.

La figura 9 es una ilustración representativa de células teñidas según un ejemplo 4 temprano.

La figura 10 es una ilustración representativa de células teñidas según un ejemplo temprano.

La figura 11 es una ilustración representativa de células teñidas según un ejemplo 5 temprano.

La figura 12 es una ilustración representativa de células teñidas según un ejemplo 6 temprano.

Descripción detallada

La presente divulgación se refiere a una composición de agentes de contraste de partículas sorprendente e inesperada para generar rápidamente distinciones visuales en una muestra. La composición de agentes de contraste de partículas puede ser especialmente útil en sistemas de citometría de flujo automatizados. La composición de agentes de contraste de partículas está compuesta por una combinación de al menos dos agentes de contraste de partículas, un agente de permeabilización y un agente de fijación. En una realización, la composición de agentes de contraste de partículas es una mezcla de cristal violeta, nuevo azul de metileno, saponina y glutaraldehído. 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 7,8 μM , el nuevo azul de metileno está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 735 μM , la saponina está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de entre aproximadamente 50 mg/l y aproximadamente 750 mg/l, la composición incluye además eosina-Y presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 27 μM y el glutaraldehído está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones a o por debajo del 0,1%.

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 pero, 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.

La composición de agentes de contraste de partículas de la invención, cuando se aplica a una muestra de líquido sanguíneo, provoca la tinción de las células en tal muestra similar a la de un frotis de sangre tratado con una tinción de frotis de sangre convencional, y en particular similar a una tinción de frotis de sangre con tinción de Wright. La tinción de Wright es una tinción histológica que facilita la diferenciación de tipos de células sanguíneas (por ejemplo, GB). Se usa principalmente para teñir frotis de sangre periférica y aspirados de médula ósea que se examinan bajo un microscopio óptico. En citogenética, se usa para teñir cromosomas para facilitar el diagnóstico de síndromes y enfermedades. Hay tinciones relacionadas conocidas como tinción de Wright tamponada, tinción de Wright-Giemsa y tinción de Wright-Giemsa tamponada. Debido a que el proceso de tinción de Wright implica disolvente de alcohol, este procedimiento de tinción destruye las células viables y no da como resultado células sustancialmente intactas. La tinción de May-Grünwald, que produce una coloración más intensa, también tarda más tiempo en realizarse.

Los aspectos y realizaciones de la presente invención se basan en el descubrimiento sorprendente e inesperado de que determinadas composiciones de agentes de contraste de partículas, incluyendo por ejemplo, composiciones de

tinte/colorante, y/o combinaciones de los mismos, tienen propiedades y eficacia inesperadas cuando se usan para realizar análisis de muestras automatizados, basados en imágenes, tales como análisis de sangre.

HEMATOLOGÍA - SISTEMA DE ANÁLISIS DE PARTÍCULAS

5 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 hematología. 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 de
10 citometría de flujo conocidos, tradicionales. 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 descritos en breve detalle a continuación y descritos adicionalmente en las solicitudes presentadas junto con la presente tituladas "Flowcell Systems And Method For Particle Analysis In Blood Samples", n.º de solicitud 14/216.533, presentada el 17 de marzo de 2014, y "Hematology Systems and Methods", n.º de solicitud
15 PCT/US2014/030942, presentada el 18 de marzo de 2014.

La figura 1 es una representación esquemática de una célula 22 de flujo a modo de ejemplo para transportar un líquido de muestra (por ejemplo, la mezcla de muestra descrita más adelante) a través de una zona 23 de observación de un dispositivo 24 de obtención de imágenes de alta resolución óptica en una configuración para
20 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 a una fuente 25 de líquido de muestra que puede haberse sometido a procesamiento, tal como contacto con una composición de agentes de contraste de partículas tal como se describe en detalle adicional a continuación. La célula 22 de flujo también está acoplada a una o más fuentes 27 de un líquido de alineamiento de orgánulos intracelulares y/o partículas (PIOAL), tal como una disolución de glicerol transparente que tiene una viscosidad que es mayor que la viscosidad del líquido de muestra.

El líquido 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 PIOAL se ha establecido sustancialmente dando como resultado un flujo laminar estable y simétrico del PIOAL por encima y por
30 debajo (o en lados opuestos de) la corriente de muestra con forma de cinta. Las corrientes de muestra y PIOAL pueden suministrarse mediante bombas dosificadoras de precisión que mueven el PIOAL con el líquido de muestra inyectado a lo largo de una trayectoria de flujo que se estrecha sustancialmente. El PIOAL envuelve y comprime el líquido de muestra en la zona 21 en donde la trayectoria de flujo se estrecha. Por tanto, la disminución en el grosor de la trayectoria de flujo en la zona 21 puede contribuir a un enfoque geométrico de la corriente 32 de muestra. La cinta 32 de líquido de muestra se envuelve y se transporta junto con el PIOAL aguas abajo de la zona 21 de estrechamiento, pasando enfrente 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 imágenes, por ejemplo, usando una CCD. La cinta de líquido de muestra fluye junto con el PIOAL 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 líquido 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 líquido de muestra puede entrar en la envuelta de PIOAL a medida que la corriente de PIOAL se comprime por la zona 21 en la que el tubo de inyección de líquido de muestra tiene un orificio de salida distal a través del cual se inyecta líquido de muestra en el líquido de cubierta de flujo, estando el orificio de salida distal acotado por la disminución del tamaño de trayectoria de flujo de la célula de flujo.

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 33 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.

55 COMPOSICIÓN DE AGENTES DE CONTRASTE DE PARTÍCULAS

La figura 2 es un diagrama esquemático de la preparación de una composición de agentes de contraste de partículas según una realización. En el bloque 208, se combinan un agente 202 de contraste de partículas, un agente 204 de permeabilización y un agente 206 de fijación para crear la composición 210 de agentes de contraste
60 de partículas. En una realización, el agente 202 de contraste de partículas, agente 204 de permeabilización y agente 206 de fijación se combinan al mismo tiempo. En otras realizaciones, uno del agente 202 de contraste de partículas, agente 204 de permeabilización y agente 206 de fijación se combina con otro del agente 202 de contraste de partículas, agente 204 de permeabilización y agente 206 de fijación, que entonces se combina con el último del agente 202 de contraste de partículas, agente 204 de permeabilización y agente 206 de fijación, en cualquier orden.
65 La combinación en el bloque 208 puede realizarse en cualquier orden y de cualquier modo adecuado.

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

- 5 La composición 210 de agentes de contraste de partículas puede proporcionarse como parte de un kit. La composición 210 de agentes de contraste de partículas puede proporcionarse ya preparada o como uno o más componentes que deben combinarse.

AGENTE DE CONTRASTE DE PARTÍCULAS

- 10 Los ejemplos de agentes de contraste incluyen azul alción y azul alción 86 (mucosustancias neutras y ácidas PAS); rojo de alizarina S; rojo allura AC (colorante azoico rojo colorante n.º 40); azul de anilina (cilios intensificados con ácido oxálico); auramina O; Azure B; Azure C; marrón de Bismarck; azul brillante FCF (azul de Comassie); azul de cresilo brillante; verde brillante; carmín (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 Darrow; eosina azulada; eritrosina B (colorante rojo n.º 3); etileosina; verde rápido FCF (colorante verde n.º 3); fucsina básica (núcleos y flagelos); fluoresceína (mercurocromo); frotis de sangre periférica con Giemsa; tinción nuclear regresiva con hematoxilina de Harris; carmín de 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 de tetracromo); verde malaquita; naranja de metilo; amarillo de Martius; tinción nuclear progresiva con hematoxilina de Mayer; violeta de metilo 2B; plata de metenamina-ácido peryódico; violeta de metileno; tinción hematológica de May Grunwald; tinción de MTT-formazán; tinción de tumores primarios con mucicarmín; rojo neutro; nigrosina; azul Nilo A; rojo rápido nuclear C.I. 60760; naftol AS; colorante de azul de nitro tetrazolio-formazán rápido; naranja G; naranja II; orceína; tinción de Papanicolaou EAS-tinción citoplasmática brillante; pararosanilina; pararosanilina; ácido peryódico-Schiff (PAS, tinción específica de hidratos de carbono); filoxina B; protargol S; pironina B; pironina Y; resazurina; Romanowsky-Giemsa; rosa 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; colorante de TTC-rojo de formazán; azul de toluidina O; tinción de Wright (fijador, tampón y tinción para frotis de sangre convencional); y Wright Giemsa.

- 30 A través de esfuerzos y experimentación no triviales, se ha encontrado que pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces en la composición 210 de agentes 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 dos de cristal violeta, nuevo azul de metileno, 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 categorización y subcategorización 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 "de manera similar a Wright" de células vitales y/o sustancialmente intactas.

- 40 En una realización, el agente 202 de contraste de partículas incluye cristal violeta. El cristal violeta puede estar presente en cantidades suficientes para lograr entre aproximadamente 1 μM y aproximadamente 100 μM 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 puede estar presente en cantidades suficientes para lograr entre aproximadamente 6 μM y aproximadamente 10 μM en condiciones de tinción. El cristal violeta puede estar presente en cantidades suficientes para lograr aproximadamente 7,8 μM en condiciones de tinción. El cristal violeta puede estar presente en cantidades suficientes para lograr muy cerca de 7,8 μM en condiciones de tinción. El cristal violeta puede purificarse hasta al menos el 90% puro. El cristal violeta puede purificarse hasta al menos el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97% o el 98% puro. El cristal violeta puede purificarse hasta al menos el 99% puro.

- 50 En una realización, el agente 202 de contraste de partículas incluye nuevo azul de metileno. El nuevo azul de metileno puede estar presente en cantidades suficientes para lograr entre aproximadamente 70 μM y aproximadamente 2,4 mM en condiciones de tinción. El nuevo azul de metileno puede estar presente en cantidades suficientes para lograr entre aproximadamente 500 μM y aproximadamente 950 μM en condiciones de tinción. El nuevo azul de metileno puede estar presente en cantidades suficientes para lograr aproximadamente 735 μM en condiciones de tinción. El nuevo azul de metileno puede estar presente en cantidades suficientes para lograr muy cerca de 735 μM en condiciones de tinción. El nuevo azul de metileno puede purificarse hasta al menos el 70% puro. El nuevo azul de metileno puede purificarse hasta al menos 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% puro. El nuevo azul de metileno puede purificarse hasta al menos el 100% puro.

- 60 En algunas realizaciones, se logran resultados sorprendentemente eficaces cuando el agente 202 de contraste de partículas incluye tanto cristal violeta como nuevo azul de metileno. La razón de cristal violeta con respecto a nuevo azul de metileno puede ser de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:500 (molar/molar). La razón de

crystal violeta con respecto a nuevo azul de metileno puede ser de entre aproximadamente 1:50 y aproximadamente 1:160 (molar/molar). La razón de crystal violeta con respecto a nuevo azul de metileno puede ser de entre aproximadamente 1:90 y aproximadamente 1:110 (molar/molar).

5 En una realización, el agente 202 de contraste de partículas incluye eosina Y. La eosina Y puede estar presente en cantidades suficientes para lograr entre aproximadamente 3 μM y aproximadamente 300 μM en condiciones de tinción. La eosina Y puede estar presente en cantidades suficientes para lograr entre aproximadamente 10 μM y aproximadamente 50 μM en condiciones de tinción. La eosina Y puede estar presente en cantidades suficientes para lograr aproximadamente 27 μM en condiciones de tinción. La eosina Y puede estar presente en cantidades
10 suficientes para lograr muy cerca de 27 μM en condiciones de tinción. La eosina Y puede purificarse hasta al menos el 80% pura. La eosina Y puede purificarse hasta al menos 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% pura. La eosina Y puede purificarse hasta al menos el 100% pura.

15 En algunas realizaciones, se logran resultados sorprendentemente eficaces cuando el agente 202 de contraste de partículas es una combinación de crystal violeta, nuevo azul de metileno y eosina Y, teniendo cada uno cualquier combinación de concentraciones y purezas tal como se describió anteriormente. En algunas realizaciones, el agente 202 de contraste de partículas es específicamente crystal violeta presente en cantidades suficientes para lograr aproximadamente 7,8 μM , nuevo azul de metileno presente en cantidades suficientes para lograr aproximadamente
20 735 μM y eosina Y presente en cantidades suficientes para lograr aproximadamente 27 μM . En algunas realizaciones, el agente 202 de contraste de partículas es específicamente crystal violeta al menos el 99% puro presente en cantidades suficientes para lograr aproximadamente 7,8 μM , nuevo azul de metileno al menos el 99% puro presente en cantidades suficientes para lograr aproximadamente 735 μM y eosina Y al menos el 99% pura presente en cantidades suficientes para lograr aproximadamente 27 μM .

25 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 1 μM y aproximadamente 100 μM en condiciones de tinción. La safranina O puede estar presente en cantidades suficientes para lograr entre aproximadamente 3 μM y aproximadamente 30 μM en condiciones de tinción. La safranina O puede estar presente
30 en cantidades suficientes para lograr aproximadamente 9 μM en condiciones de tinción. La safranina O puede estar presente en cantidades suficientes para lograr muy cerca de 9 μM en condiciones de tinción. La safranina O puede purificarse hasta al menos el 80% pura. La safranina O puede purificarse hasta al menos 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% pura. La safranina O puede purificarse hasta al menos el 100% pura.

35 En una realización, el agente 202 de contraste de partículas incluye verde de metilo. El verde de metilo puede estar presente en cantidades suficientes para lograr aproximadamente 0,1 g/l en condiciones de tinción. El verde de metilo puede estar presente en cantidades suficientes para lograr muy cerca de 0,1 g/l en condiciones de tinción. El verde de metilo puede purificarse hasta al menos el 80% puro. El verde de metilo puede purificarse hasta al menos el 81%,
40 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% puro. El verde de metilo puede purificarse hasta al menos el 100% puro.

45 En algunas realizaciones, el agente 202 de contraste de partículas incluye dos o más de crystal violeta, nuevo azul de metileno, 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 presentan para obtener imágenes. El agente 202 de contraste de partículas puede estar presente en cantidades suficientes para potenciar y/o teñir estructuras subcelulares de neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos así como reticulocitos, glóbulos rojos nucleados, plaquetas, blastocisto, promielocito, mielocito, metamielocito o fragmentos celulares. Las distinciones visuales o visualizables pueden incluir cualquier
50 característica de las partículas o dentro de las partículas que pueden visualizarse o detectarse de otra forma usando cualquier fuente de luz (por ejemplo, UV, visible, IR).

La composición 210 de agentes de contraste de partículas incluye dos o más agentes 202 de contraste de partículas tal como se define en las reivindicaciones. Las cantidades de cada uno de los agentes 202 de contraste de partículas pueden 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 categorización y subcategorización de partículas.
55

AGENTE DE PERMEABILIZACIÓN

60 En algunas realizaciones, el agente 204 de permeabilización puede incluir un tensioactivo. Tal como se define en las reivindicaciones, el agente 204 de permeabilización incluye saponina presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de entre aproximadamente 50 mg/l y aproximadamente 750 mg/l en condiciones de tinción. El agente de permeabilización puede alterar la permeabilidad de una célula con el fin de aumentar la
65 accesibilidad del agente 202 de contraste de partículas al contenido intracelular. El agente de permeabilización

puede seleccionarse e incluirse en cantidades suficientes para permitir un procedimiento de tinción rápido, de una etapa.

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 polioxietilenetanol, 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) esterificados 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 tensioactivos 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 o reducido), y otros.

En una realización, el agente 204 de permeabilización puede incluir 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 Brij® 35 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 Brij® 35 puede estar presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 0,012 g/l a aproximadamente 0,14 g/l.

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

En algunas realizaciones, el agente 204 de permeabilización incluye un agente suficiente para lisar glóbulos rojos. En algunas realizaciones, el agente 204 de permeabilización incluye un agente suficiente para lisar glóbulos rojos distintos de reticulocitos o glóbulos rojos nucleados. En algunas realizaciones, el agente 204 de permeabilización incluye un agente suficiente para lisar glóbulos rojos mientras que los glóbulos blancos, reticulocitos, glóbulos rojos nucleados, plaquetas y otras células permanecen sustancialmente intactos. En algunas realizaciones, el agente 204 de permeabilización hace que los miembros y/o membranas nucleares de glóbulos blancos, reticulocitos, glóbulos rojos nucleados y/o plaquetas sean más permeables y/o porosas para facilitar el acceso del agente 202 de contraste de partículas.

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

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 agentes de contraste de partículas con el uso de un agente 204 de permeabilización que incluye 5PD-Lytic disponible de Clinical Diagnostic Solutions (CDS) en Ft. Lauderdale, Florida. 5PD-Lytic incluye saponina. 5PD-Lytic se describe en general en la patente estadounidense 6.632.676.

A través de esfuerzos y experimentación no triviales, se ha encontrado que pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces con el uso de un agente 204 de permeabilización que incluye saponina presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 50 mg/l a aproximadamente 750 mg/l. En algunas realizaciones, la saponina puede ser un éter de saponina sustituido con amonio cuaternario.

AGENTE DE FIJACIÓN

En algunas realizaciones, el agente 206 de fijación puede seleccionarse para garantizar que los glóbulos blancos no se degradan durante la tinción y la obtención de imágenes. En algunas realizaciones, el agente 206 de fijación puede garantizar que otras células y estructuras celulares no se degradan. Los ejemplos de agentes de fijación pueden incluir glutaraldehído y formaldehído. Los ejemplos adicionales no dentro del alcance de las reivindicaciones incluyen agentes de reticulación; picrato de amoníaco en solución salina isotónica (por ejemplo, para la tinción con azul de metileno); alcohol etílico; metanol (por ejemplo, a temperatura ambiente, -20°C o -70°C); Susa de Heidenhain - HgCl₂, NaCl-ácido tricloroacético, formalina; fijador de Bouin - ácido pícrico, formalina, ácido acético; Duboseq-Brazil - Bouin con EtOH al 80%; fijador de Carnoy - EtOH, cloroformo, ácido acético; fijador de Zenker - HgCl₂, K₂CrO₇, NaSO₄.H₂O; acetocarmín; fijador de Gatenby - ácido crómico, tetróxido de osmio, NaCl; fijador de Baker - formalina, CaCl₂; fijador de Smith - K₂Cr₂O₇, formalina, ácido acético; verde de metilo al 1%, ácido acético al

1%; fenol, formalina, glicerol, violeta de genciana; fijador de Schaudin - HgCl₂, EtOH, ácido acético; fijador de Champy - ácido crómico, K₂CrO₇, OsO₄; fijador de Fleming - ácido crómico, OsO₄, ácido acético; formol-plata-formaldehído, AgNO₃; fijador de tejido de Streck - bronopol, diazolidinilurea, ZnSO₄·7H₂O, citrato de sodio; imidazolidinilurea al 1% en PBS; glioxal: Glyofix, Prefer, Safefix, Histochoice; Glydant-hidantoína; dimetilolurea; hidroximetilglicinato de sodio; fijador de Karnovsky; cloruro mercúrico (B-5); fijador de Hollande; y otros.

A través de esfuerzos y experimentación no triviales, se ha encontrado que pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces con el uso de un agente 206 de fijación seleccionado de glutaraldehído y formaldehído.

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

COMPONENTES ADICIONALES

En algunas realizaciones, pueden combinarse opcionalmente componentes 212 adicionales opcionales en el bloque 208 en la composición 210 de agentes de contraste de partículas. Los ejemplos de componentes 212 adicionales pueden incluir componentes de tampón, agentes modificadores de la viscosidad, un agente antimicrobiano, un agente de ajuste osmótico, un modificador de la fuerza iónica, un tensioactivo, un agente quelante, y otros. En algunas realizaciones, pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces cuando la composición 210 de agentes de contraste de partículas incluye una solución salina tamponada con fosfato.

Los agentes modificadores de la viscosidad a modo de ejemplo incluyen hidrocoloides naturales (y derivados), tales como carragenanos, goma de algarrobo, goma guar y gelatina; azúcares (y derivados), tales como dextrosa, fructosa; povidex; dextrans; povidexanos; sacáridos; y polisacáridos; hidrocoloides semisintéticos (y derivados), tales como metilcelulosa, carboximetilcelulosa; hidrocoloides sintéticos (y derivados), tales como Carbopol®; y arcillas (y derivados), tales como bentonita y Veegum®.

PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN RÁPIDO, DE UNA ETAPA

La figura 3 es un diagrama de flujo de un procedimiento 300 de tinción rápido, de una etapa según una realización. Aunque el procedimiento 300 de tinción rápido, de una etapa puede contener varias subetapas, el término "una etapa" se usa para identificar que no es necesario introducir la muestra en múltiples disoluciones diferentes durante el procedimiento de tinción. La composición 210 de agentes 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 sangre basado en imágenes con una necesidad disminuida de revisar adicionalmente imágenes o portaobjetos, o microscopía preparada manualmente.

En el bloque 308, la composición 210 de agentes de contraste de partículas se combina con la muestra. La composición 210 de agentes 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 agentes de contraste de partículas. La muestra puede diluirse con la composición 210 de agentes de contraste de partículas. La cantidad de dilución puede seleccionarse para proporcionar un número óptimo de células por fotograma durante un análisis basado en imágenes. La cantidad de dilución puede seleccionarse para proporcionar un número óptimo de glóbulos blancos por fotograma durante un análisis basado en imágenes. La cantidad de dilución puede seleccionarse por lo demás para proporcionar un volumen óptimo para cualquier otro análisis no 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 agentes de contraste de partículas con el uso de una razón de la composición 210 de agentes de contraste de partículas con respecto a la muestra a entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 20:1. La razón de la composición 210 de agentes de contraste de partículas con respecto a la muestra puede ser de entre aproximadamente 3:1 y aproximadamente 10:1. La razón de la composición 210 de agentes de contraste de partículas con respecto a la muestra puede ser de entre aproximadamente 3:1 y aproximadamente 4:1. La razón de la composición 210 de agentes de contraste de partículas con respecto a la muestra puede ser de entre aproximadamente 3:1 o aproximadamente 4:1. En algunas realizaciones, pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces usando una razón de la composición 210 de agentes de contraste de partículas con respecto a la muestra a muy cerca de 3:1 o muy cerca de 4:1.

Pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces usando agente de contraste de partículas con 40 ml de 5PD-Lytic y 50 ml de solución salina tamponada con fosfato con una razón de dilución de composición 210 de agentes de contraste de partículas con respecto a muestra de 10:1. Pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces usando agente de contraste de partículas con 40 ml de 5PD-Lytic, saponina extra y 40 ml de solución salina tamponada con fosfato con una razón de dilución de composición 210 de agentes de contraste de partículas con

respecto a muestra de 5:1. Pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces usando agente de contraste de partículas con 40 ml de 5PD-Lytic, saponina extra y 36 ml de solución salina tamponada con fosfato con una razón de dilución de composición 210 de agentes de contraste de partículas con respecto a muestra de 4:1.

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

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

15 En el bloque 310, la mezcla de muestra se incuba durante un determinado periodo 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 infiltre mejor las células o estructuras celulares. El tiempo y la temperatura de incubación pueden seleccionarse para permitir que la composición 210 de agentes de contraste de partículas permee, fije y tiña apropiadamente la muestra. El tiempo y la temperatura de incubación pueden seleccionarse para garantizar la lisis de glóbulos rojos al tiempo que se mantienen glóbulos blancos, plaquetas y glóbulos rojos nucleados sustancialmente intactos.

20 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 agentes de contraste de partículas con la incubación de la mezcla de muestra a temperaturas de entre aproximadamente 37°C y aproximadamente 60°C durante de aproximadamente 1 a 60 segundos. La mezcla de muestra puede calentarse hasta temperaturas de entre aproximadamente 46°C y aproximadamente 49°C. La mezcla de muestra puede incubarse durante entre 40 y 25 50 segundos. La mezcla de muestra puede incubarse hasta una hora. En algunas realizaciones, pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces incubando la mezcla de muestra a aproximadamente 48°C durante aproximadamente 45 segundos. En algunas realizaciones, pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces incubando la mezcla de muestra a aproximadamente 47°C durante aproximadamente 45 segundos.

30 En algunas realizaciones, la combinación en el bloque 308 y la incubación en el bloque 310 se completan en aproximadamente el mismo periodo 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 tomarse 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 35 de muestra y el equipo de obtención de imágenes se ha limpiado, pueden obtenerse imágenes inmediatamente de la segunda mezcla de muestra.

40 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 que están obteniéndose imágenes de una primera mezcla de muestra, una segunda mezcla de muestra puede estar lista para obtener 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 45 mezcla de muestra. La tercera mezcla de muestra puede finalizar 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 inmediatamente de la tercera mezcla de muestra, mientras 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 50 continuar indefinidamente para obtener imágenes de manera continua de las 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 agentes de contraste de partículas, determinados modos de combinar la composición 210 de agentes de contraste 55 de partículas con la muestra y determinados modos de incubar la mezcla de muestra.

Específicamente, pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces usando una composición 210 de agentes de contraste de partículas que incluye cristal violeta el 90% puro o más a aproximadamente 7,8 μM en condiciones de tinción, nuevo azul de metileno el 70% puro o más a aproximadamente 735 μM en condiciones de tinción, eosina-Y el 80% pura o más a aproximadamente 27 μM en condiciones de tinción, saponina pretratada a de 60 aproximadamente 50 mg/l a aproximadamente 750 mg/l en condiciones de tinción y glutaraldehído a aproximadamente el 0,1% o menos en condiciones de tinción; en donde el agente 210 de contraste de partículas se combina con la muestra a una razón de agente 210 de contraste de partículas con respecto a muestra de entre aproximadamente 3:1 y aproximadamente 4:1; y en donde la mezcla de muestra resultante se incuba a 65 aproximadamente 48°C durante aproximadamente 45 segundos.

Determinadas composiciones 210 de agentes de contraste de partículas y procedimientos de tinción eficaces permiten que se obtengan eficazmente imágenes teñidas “de manera similar a Wright” de células vitales y/o sustancialmente intactas con un analizador visual automatizado usando colorantes en un sistema de disolventes no basado en alcohol. Determinadas composiciones 210 de agentes de contraste de partículas y procedimientos de tinción eficaces permiten una tinción rápida de muestras de manera que diversos componentes nucleares, lóbulos nucleares y estructuras granulares son claramente distinguibles. Determinadas composiciones 210 de agentes de contraste de partículas y procedimientos de tinción eficaces son adecuados para tinción supravital. Determinadas composiciones 210 de agentes de contraste de partículas y procedimientos de tinción eficaces generan distinciones visuales para la categorización y subcategorización de partículas. Determinadas composiciones 210 de agentes de contraste de partículas y procedimientos de tinción eficaces son eficaces para potenciar las características de contenido intracelular de partículas en muestras 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 agentes de contraste de partículas y procedimientos de tinción eficaces son eficaces para teñir neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, basófilos, plaquetas, reticulocitos, glóbulos rojos nucleados, blastocitos, promielocitos, mielocitos, metamielocitos, cilindros, bacterias, células epiteliales y/o parásitos. Determinadas composiciones 210 de agentes de contraste de partículas y procedimientos de tinción eficaces son eficaces para generar distinciones visuales para la categorización y subcategorización de partículas, por ejemplo, proporcionando tinción diferencial de gránulos primarios y secundarios en células, tal como para ayudar en la subcategorización de granulocitos inmaduros y la determinación de su edad basándose en la tinción diferencial o potenciación de gránulos primarios y secundarios. Determinadas composiciones 210 de agentes de contraste de partículas y procedimientos de tinción eficaces son eficaces para generar distinciones visuales para contar y caracterizar glóbulos rojos, reticulocitos, glóbulos rojos nucleados y plaquetas, así como para el recuento diferencial de glóbulos blancos y la caracterización y análisis de glóbulos blancos. Determinadas composiciones 210 de agentes 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 agentes de contraste de partículas y procedimientos de tinción eficaces son eficaces para teñir estructuras subcelulares de neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos así como reticulocitos, glóbulos rojos nucleados, plaquetas, blastocito, promielocito, mielocito, metamielocito o fragmentos celulares.

La tinción rápida que permitieron determinadas composiciones 210 de agentes 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 con determinadas realizaciones de la composición 210 de agentes de contraste de partículas que comprende agentes de contraste de partículas en un sistema de disolventes no basados en alcohol que pueden, por primera vez según el conocimiento de los inventores, generar imágenes de tinción “similar a Wright” de células intactas vitales y/o sustancialmente intactas que pueden revelar diversos componentes celulares, lóbulos nucleares y estructuras granulares, y hacen que estas características de partículas y/o celulares sean visualmente distintas.

A través de esfuerzos y experimentación no triviales, se ha encontrado que pueden lograrse resultados sorprendentemente eficaces cuando se usa una composición 210 de agentes de contraste de partículas compuesta tal como se enumera en la tabla 1, en donde el reactivo de tinción de trabajo se prepara mezclando 40 ml de nuevo azul de metilo y 5 ml de cristal violeta.

TABLA 1

| | |
|---|--|
| 50 ml | Solución salina tamponada con fosfato |
| 40 ml | Reactivo de tinción de trabajo |
| 40 ml | Nuevo azul de metilo al 0,09% en CDS 5PD-Lytic |
| 5 ml | Cristal violeta al 0,009% en CDS 5PD-Lytic |
| 10 ml | Saponina al 0,5% |
| una cantidad suficiente para lograr el 0,1% en condiciones de tinción | Glutaraldehído |

La figura 4 es una ilustración representativa de glóbulos blancos seleccionados de una muestra teñida con la composición 210 de agentes de contraste de partículas expuesta en la tabla 1 y teñida usando los procedimientos de tinción rápidos, de una etapa expuestos anteriormente. Los glóbulos blancos están intactos y muestran características de tinción de una tinción de Wright. Los diversos tipos de glóbulos blancos (por ejemplo, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, etc.) son visualmente diferenciables.

En algunas realizaciones, se indican en la tabla 2 características de células teñidas mediante las composiciones de agentes de contraste de partículas de esta divulgación.

TABLA 2

| Tipo celular/ subestructura celular | Tamaño (en relación con GR) | Forma | Color | Detalles |
|--|--------------------------------|----------------------|--|---|
| GR | Convencional | Redonda | | Palidez central |
| GR nucleados | Convencional | Redonda | Núcleo teñido | |
| NEUT | Grande | Redonda a ovalada | Núcleo teñido | Gránulos citoplasmáticos |
| NEUT: Núcleo | % interm. | Segmenta | Coloreado por tinción | Múltiples lóbulos |
| LINF | Convencional a pequeño | Redonda a ovalada | Núcleo teñido | Citoplasma pequeño |
| LINF: Núcleo | % grande | Redonda | Coloreado por tinción | Un único lóbulo |
| MONO | Grande | Redonda | Núcleo teñido Citoplasma ligeramente coloreado | Citoplasma grande |
| MONO: Núcleo | % interm. | Irregular | Coloreado por tinción | Tinción del núcleo ligera |
| EOS | Intermedio | Redonda | Núcleo y gránulos teñidos | Gránulos grandes gruesos |
| EOS: Núcleo | % pequeño a interm. | Segmentada | Coloreado por tinción | Múltiples lóbulos grandes |
| BASO | Convencional a pequeño | Redonda | Núcleo y gránulos teñidos | Gránulos densos gruesos en el citoplasma |
| BASO: Núcleo | % grande | Segmentada | Coloreado por tinción | Puede estar oscurecido por gránulos oscuros |

5 En determinadas realizaciones, la composición de tinte/colorante se formula para lograr estabilidad, facilidad de almacenamiento, eliminación y/o toxicidad limitada.

10 La figura 5 es una ilustración representativa de glóbulos blancos seleccionados de una muestra teñida con la composición 210 de agentes de contraste de partículas según una realización, que incluye células de las que se obtienen imágenes a través de obtención de imágenes de flujo automática y obtención de imágenes de preparación en húmedo, manual.

EXPERIMENTACIÓN TEMPRANA

15 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.

20 En un ejemplo 1 temprano, existía un método de tinción de dos etapas en el que se combinaron una muestra y una realización temprana de una composición de agentes de contraste de partículas y se incubaron durante 40 segundos a 47,5°C, y luego se aplicó un reactivo de extinción a la mezcla de muestra. La composición de agentes de contraste de partículas incluía diluyente Coulter LH Series, reactivo lítico Coulter Lyse S III diff, kit de reactivos Coulter LH Series Pak y kit de reactivos Coulter LH Series RETIC PAK. Los resultados se observan en la figura 6.

25 En un ejemplo 2 temprano tras el ejemplo 1, se reemplazó el método de tinción de dos etapas del ejemplo 1 por un método de tinción de una etapa. En la figura 7 se observan los resultados mejorados de basófilos en comparación con los resultados del ejemplo 1.

30 En un ejemplo 3 temprano, una composición de agentes de contraste de partículas sin incluir glutaraldehído dio como resultado glóbulos blancos debilitados que se rompían debido a las fuerzas de cizalladura en la célula de flujo. En la figura 8 se muestran imágenes de los resultados del ejemplo 3 que muestran membranas dañadas.

35 En un ejemplo 4 temprano tras el ejemplo 3, se añadió glutaraldehído a la composición de agentes de contraste de partículas. Las membranas celulares de los glóbulos blancos estaban más intactas en el ejemplo 4, pero las membranas nucleares estaban todavía dañadas. Tras realizar el ajuste al PIOAL para reducir el contenido en glicerol, la morfología de los glóbulos blancos permanecía principalmente sin cambios durante la obtención de imágenes, tal como se muestra en la figura 9.

40 En ejemplos tempranos con tinciones de dos tintes usando composiciones de agentes de contraste de partículas de nuevo azul de metileno y cristal violeta, la mayoría de los tipos celulares podían distinguirse bien excepto los

eosinófilos, que eran algo desiguales y no siempre fáciles de distinguir de los neutrófilos, tal como se muestra en la figura 10. En ejemplos 5 y 6 posteriores, se añadió un tercer agente de contraste de partículas a la composición de agentes de contraste de partículas.

5 En el ejemplo 5, se añadió verde de metilo a la composición de agentes de contraste de partículas. El verde de metilo ayudó a teñir los eosinófilos mejor, pero el núcleo de las células ya no se tiñe con el púrpura deseado, si no de azul. La figura 11 representa imágenes de neutrófilos del ejemplo 5 con núcleos teñidos de azul, pero perdieron el detalle granular.

10 En el ejemplo 6, se usó eosina-Y en lugar de verde de metilo como tercer agente de contraste de partículas en la composición de agentes de contraste de partículas. La eosina-Y retuvo una tinción púrpura del núcleo y los gránulos se tiñen de manera constante con un brillo ligeramente naranja, tal como se muestra en la figura 12.

15 A través de la experimentación mencionada anteriormente y experimentación adicional, se ha determinado que las realizaciones dadas a conocer y realizaciones reivindicadas proporcionan resultados preferentes.

Cualquier encabezamiento usado en el presente documento es con fines organizativos sólo y no ha de interpretarse que limita la divulgación o las reivindicaciones de ningún modo.

20 La invención se define en las reivindicaciones. Son posibles diferentes disposiciones de los componentes representados en los dibujos o descritos anteriormente, así como componentes y etapas no mostrados o descritos. De manera similar, algunas características y subcombinaciones son útiles y pueden emplearse sin referencia a otras características y subcombinaciones. Se han descrito realizaciones de la invención con fines ilustrativos y no restrictivos, y les resultarán evidentes realizaciones alternativas a los lectores de esta patente. En determinados
25 casos, pueden realizarse o ejecutarse etapas u operaciones del método en diferente orden, o pueden añadirse, eliminarse o modificarse operaciones. Puede apreciarse que, en determinados aspectos de la invención, un único componente puede reemplazarse por múltiples componentes, y múltiples componentes pueden reemplazarse por un único componente, para proporcionar un elemento o estructura o para realizar una función o funciones dadas. Excepto cuando tal sustitución no sea operativa en la práctica de determinadas realizaciones de la invención, tal
30 sustitución se considera dentro del alcance de la invención. Por consiguiente, la presente invención no se limita a las realizaciones descritas anteriormente o representadas en los dibujos, y pueden hacerse diversas realizaciones y modificaciones sin apartarse del alcance de las reivindicaciones a continuación.

REIVINDICACIONES

1. Composición de agentes de contraste de partículas para teñir una muestra de líquido sanguíneo de la que están obteniéndose imágenes en un sistema de análisis de partículas automatizado que comprende:
- 5 al menos dos agentes de contraste de partículas seleccionados del grupo que consiste en cristal violeta, nuevo azul de metileno, verde de metilo, eosina Y y safranina O;
un agente de permeabilización que incluye saponina presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de entre aproximadamente 50 mg/l y aproximadamente 750 mg/l en condiciones de tinción; y
10 un agente de fijación seleccionado del grupo que consiste en glutaraldehído y formaldehído.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que:
- 15 el agente de permeabilización es saponina presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de entre aproximadamente 50 mg/l y aproximadamente 750 mg/l en condiciones de tinción; y
el agente de fijación es glutaraldehído presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones a o por debajo del 0,1% en condiciones de tinción.
- 20 3. Composición según la reivindicación 2, en la que:
- los al menos dos agentes de contraste de partículas incluyen cristal violeta, nuevo azul de metileno y eosina-Y;
25 la razón del cristal violeta con respecto al nuevo azul de metileno es de entre aproximadamente 1:90 y aproximadamente 1:110 en condiciones de tinción; y
la eosina-Y está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 3 μ M a aproximadamente 300 μ M en condiciones de tinción.
- 30 4. Composición según la reivindicación 3, en la que:
- el cristal violeta está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 6 μ M a aproximadamente 10 μ M en condiciones de tinción;
35 el nuevo azul de metileno está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 70 μ M a aproximadamente 2,4 mM en condiciones de tinción; y
la eosina-Y está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 50 μ M en condiciones de tinción.
- 40 5. Composición según la reivindicación 4, en la que:
- el cristal violeta está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 7,8 μ M en condiciones de tinción;
45 el nuevo azul de metileno está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 735 μ M en condiciones de tinción; y
la eosina-Y está presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 27 μ M en condiciones de tinción.
- 50 6. Composición según la reivindicación 4, que comprende adicionalmente:
componentes de tampón.
7. Método de tratamiento de partículas de una muestra de líquido sanguíneo de la que se obtendrán imágenes usando un sistema de análisis de partículas automatizado que comprende:
- 55 combinar la muestra de líquido sanguíneo con la composición de agentes de contraste de partículas según la reivindicación 1 para obtener una mezcla de muestra; e
incubar la mezcla de muestra a una temperatura de entre aproximadamente 37°C y aproximadamente 60°C durante menos de 90 segundos.
- 60 8. Método según la reivindicación 7, en el que:
- la composición de agentes de contraste de partículas incluye:
- 65 cristal violeta y nuevo azul de metileno en cantidades suficientes para dar como resultado una razón del cristal violeta con respecto al nuevo azul de metileno de entre aproximadamente

1:1 y aproximadamente 1:500 en condiciones de tinción; y glutaraldehído en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones a o por debajo del 0,1% en condiciones de tinción; y

- 5 la incubación de la mezcla de muestra incluye calentar la mezcla de muestra menos de 60 segundos.
9. Método según la reivindicación 8, en el que:
- 10 la composición de agentes de contraste de partículas incluye:
- 15 cristal violeta presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones a de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 10 μM en condiciones de tinción; nuevo azul de metileno presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 70 μM a aproximadamente 2,4 mM en condiciones de tinción; y eosina-Y presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 50 μM en condiciones de tinción;
- 20 la combinación de la muestra de líquido sanguíneo con la composición de agentes de contraste de partículas incluye combinar a una razón de la muestra de líquido sanguíneo con respecto a la composición de agentes de contraste de partículas de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:10.
- 25 10. Método según la reivindicación 8, en el que la incubación de la mezcla de muestra incluye calentar la mezcla de muestra hasta entre aproximadamente 46°C y aproximadamente 49°C durante entre 40 y 50 segundos.
- 30 11. Método según la reivindicación 10, en el que:
- la composición de agentes de contraste de partículas incluye:
- 35 cristal violeta presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones a aproximadamente 7,8 μM en condiciones de tinción; nuevo azul de metileno presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 735 μM en condiciones de tinción; eosina-Y presente en cantidades suficientes para dar como resultado concentraciones de aproximadamente 27 μM en condiciones de tinción; y componentes de tampón;
- 40 la combinación de la muestra de líquido sanguíneo con la composición de agentes de contraste de partículas incluye combinar a una razón de la muestra de líquido sanguíneo con respecto a la composición de agentes de contraste de partículas de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 1:4; y
- 45 la incubación de la mezcla de muestra incluye calentar la mezcla de muestra hasta aproximadamente 47°C durante aproximadamente 45 segundos.

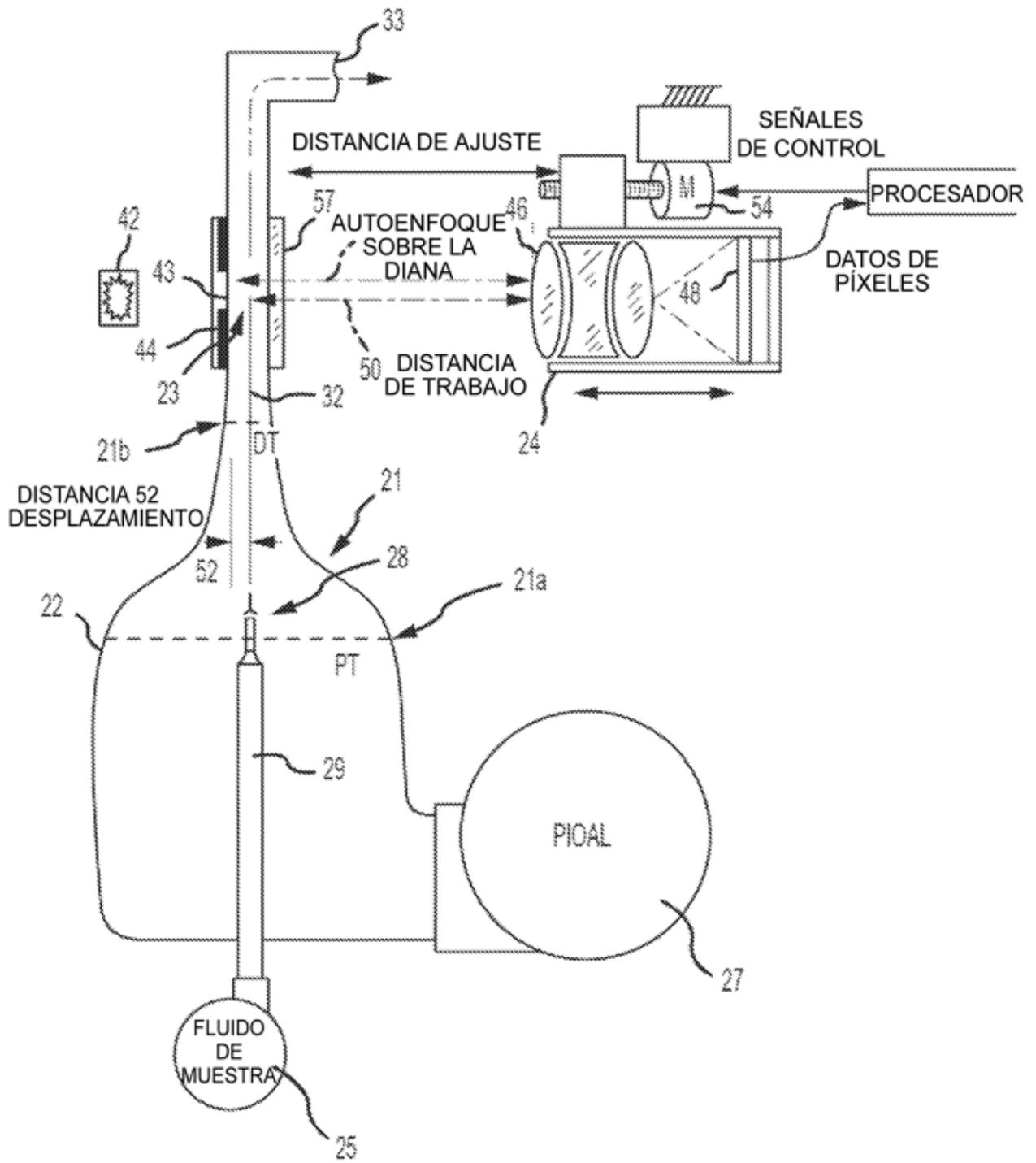


FIG.1

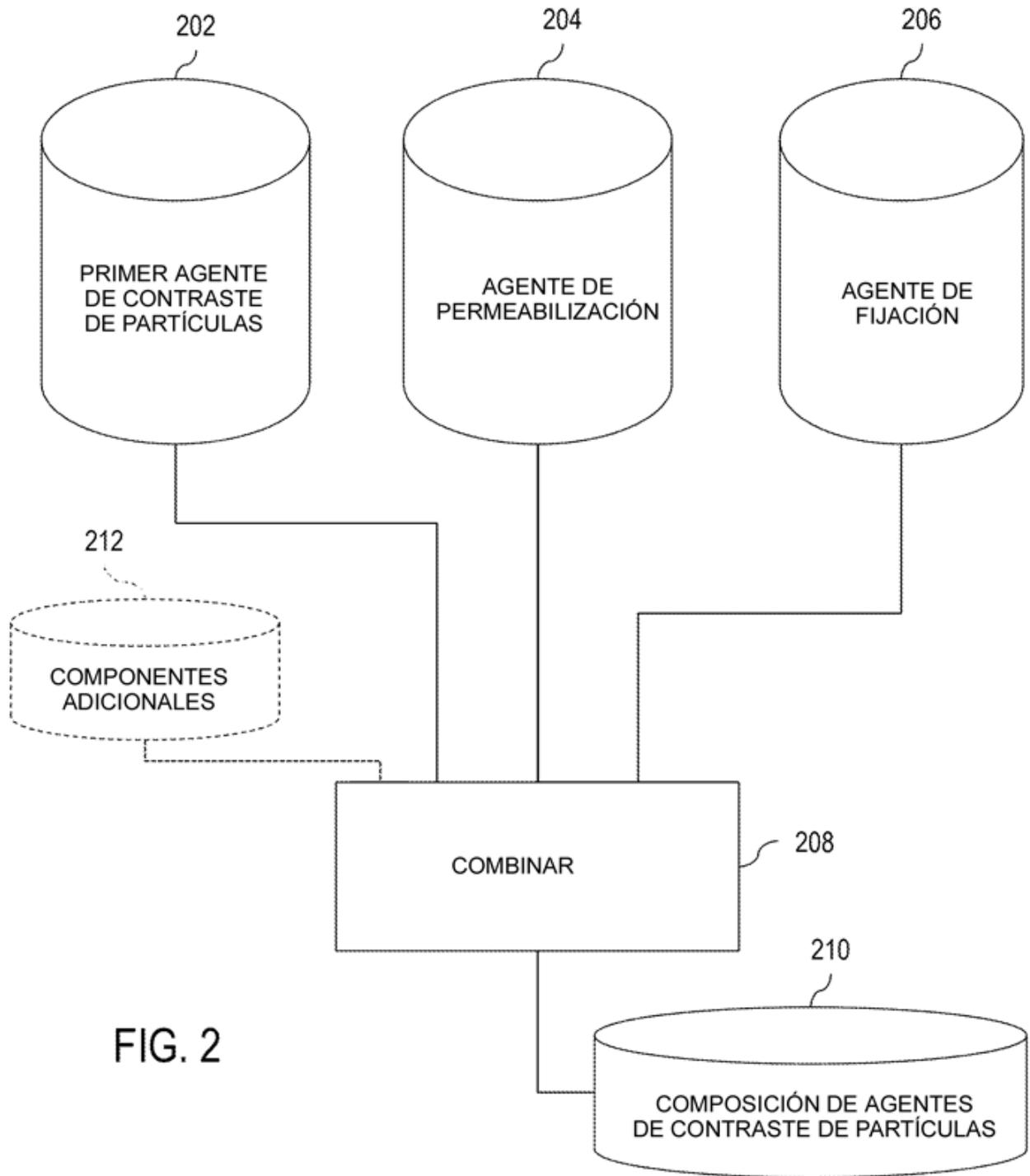


FIG. 2

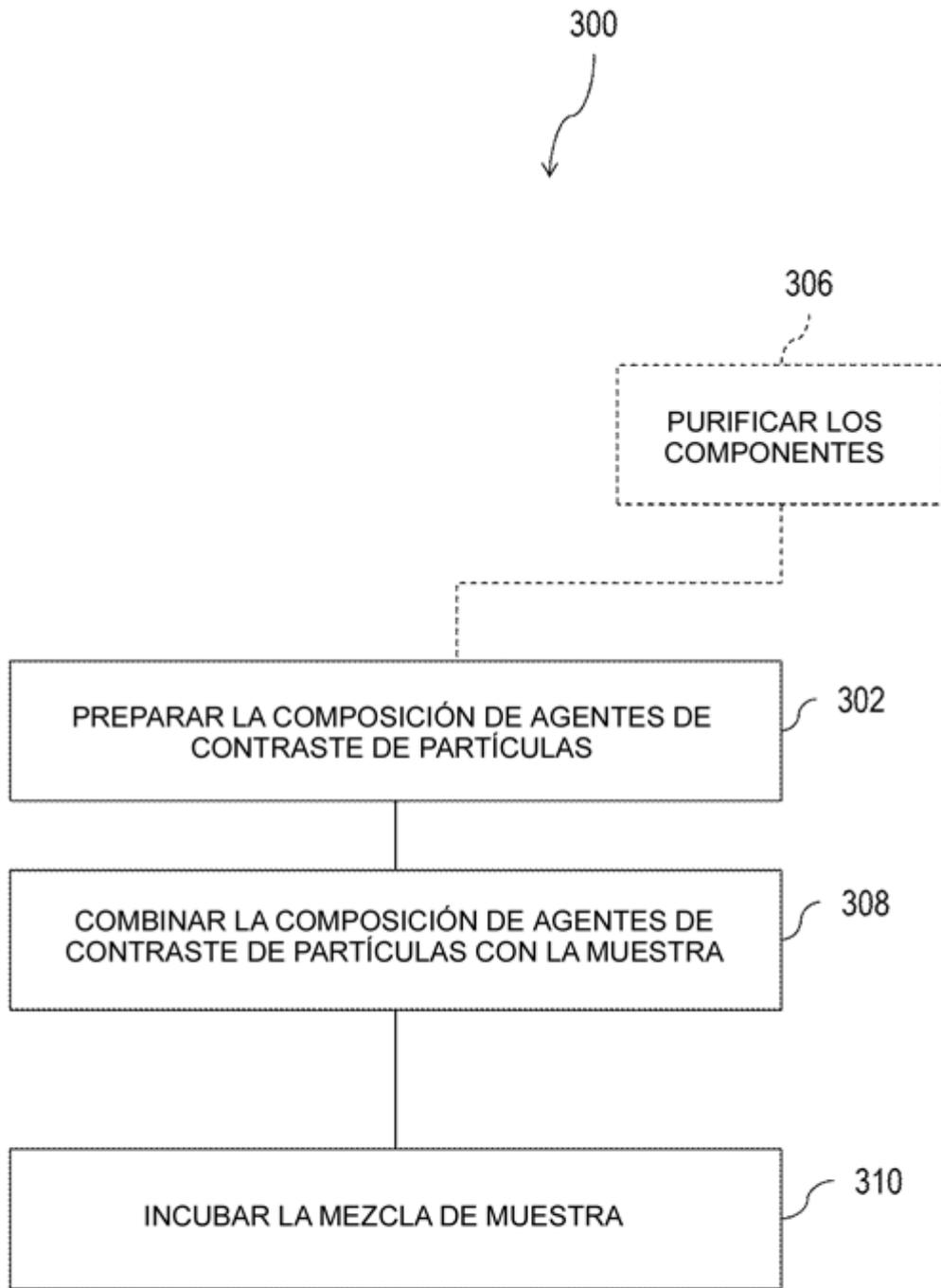


FIG. 3

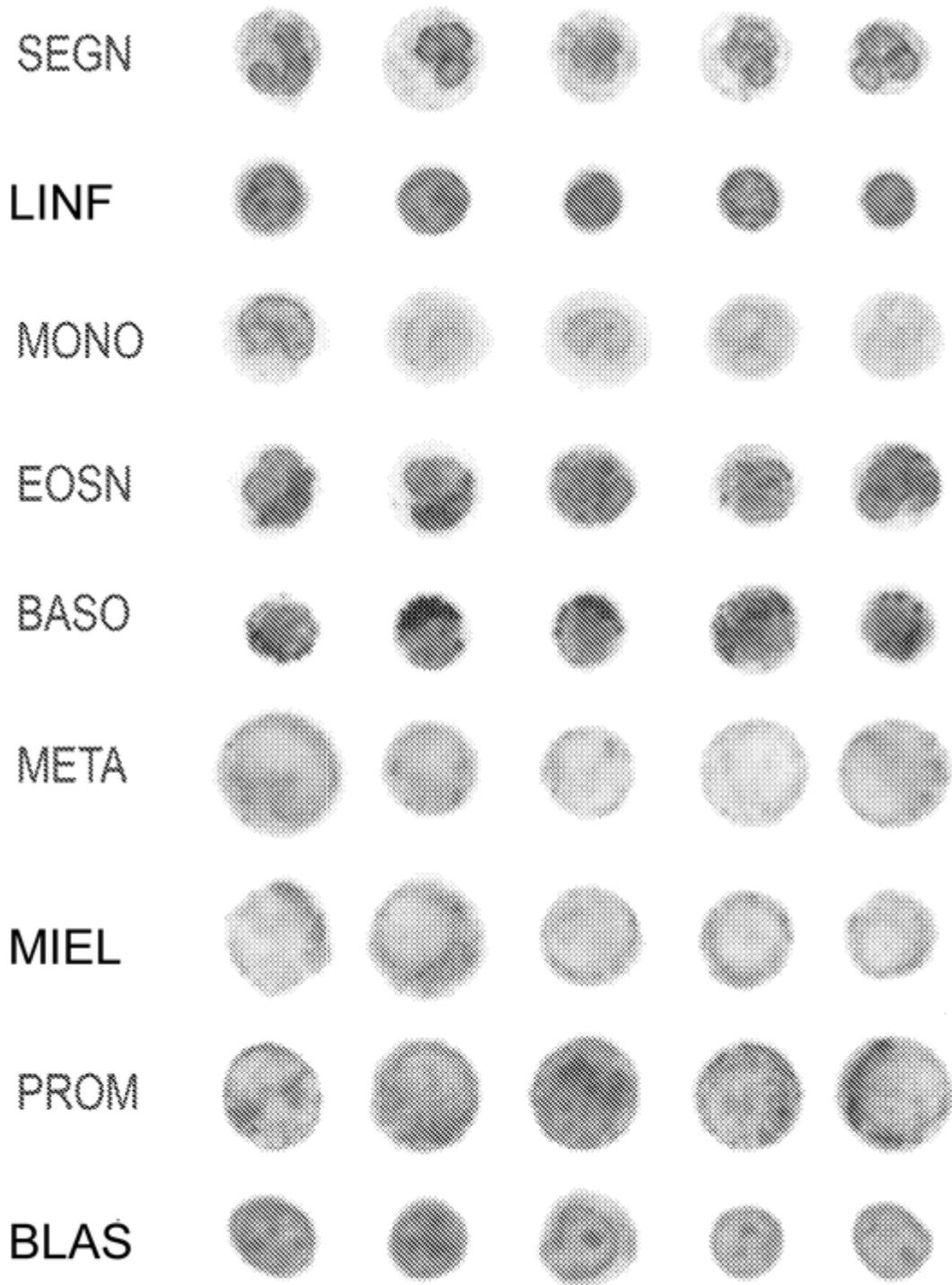


FIG. 4

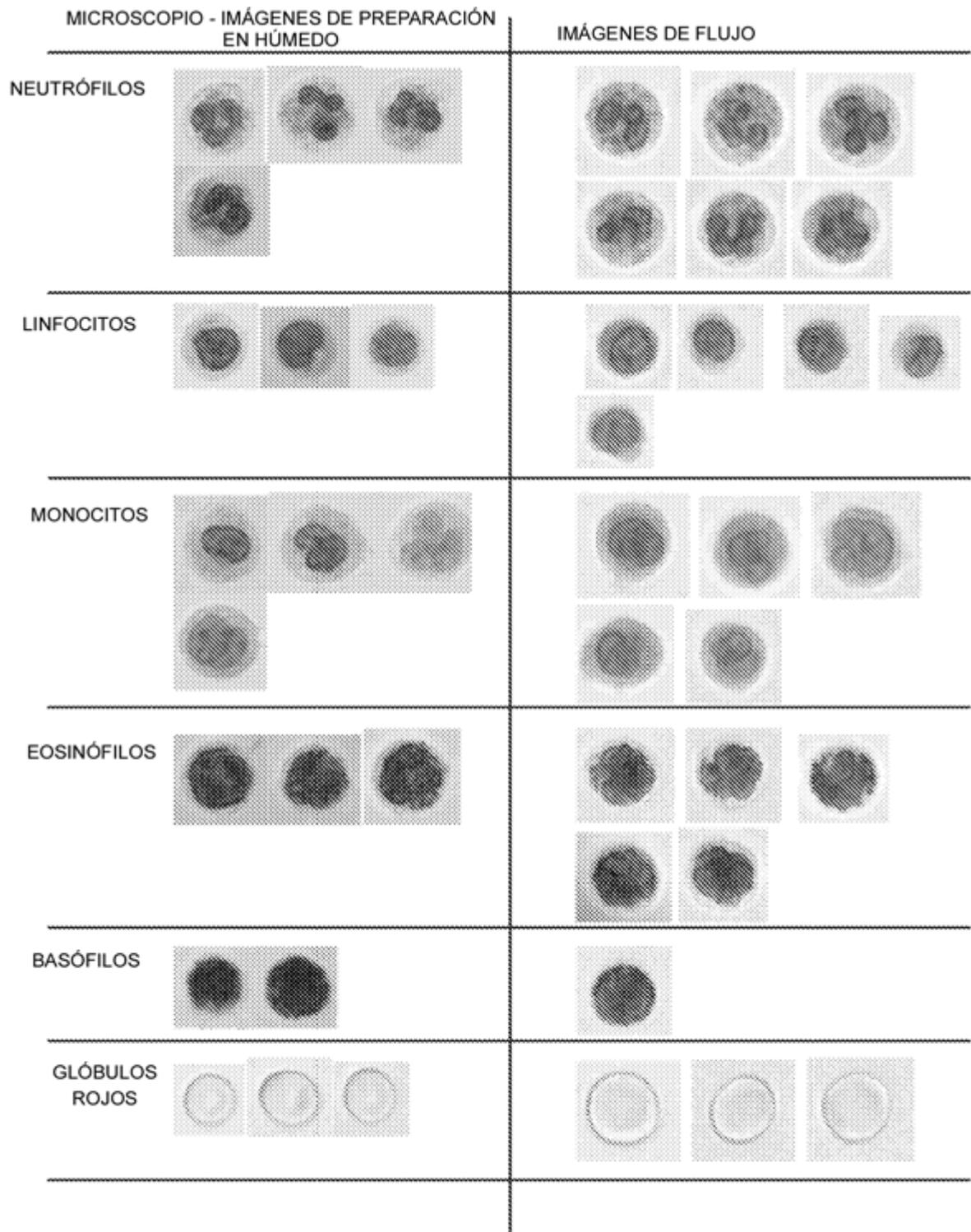
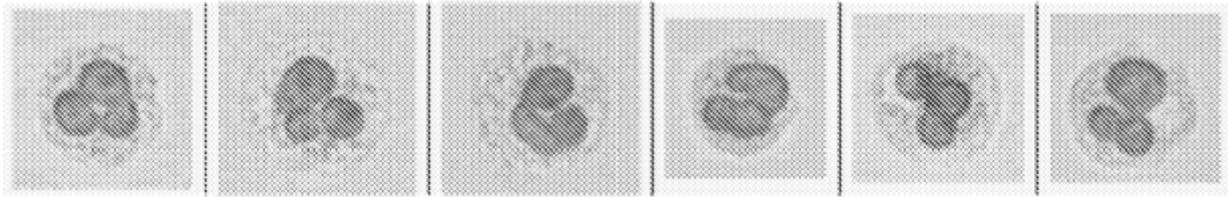
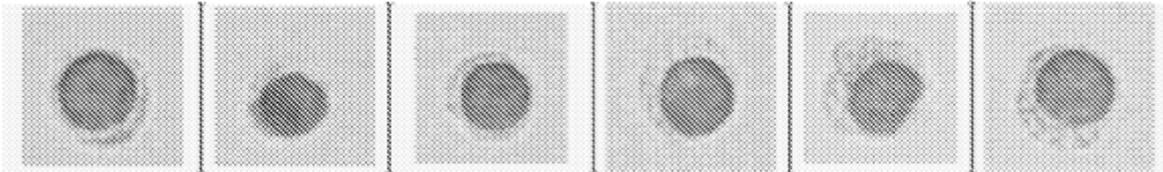


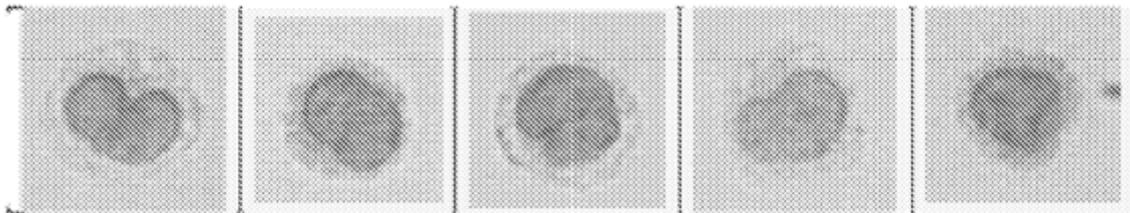
FIG. 5



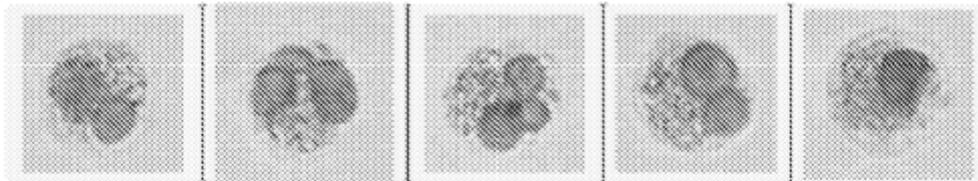
NEUTRÓFILOS



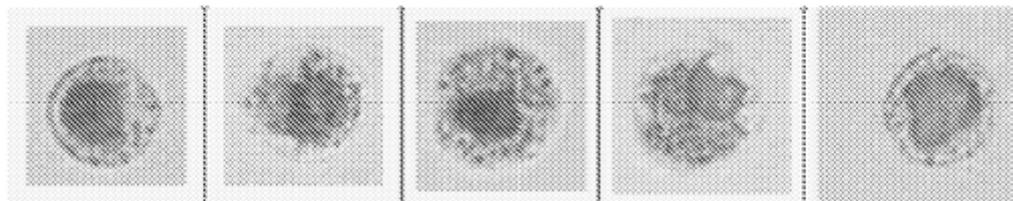
LINFOCITOS



MONOCITOS



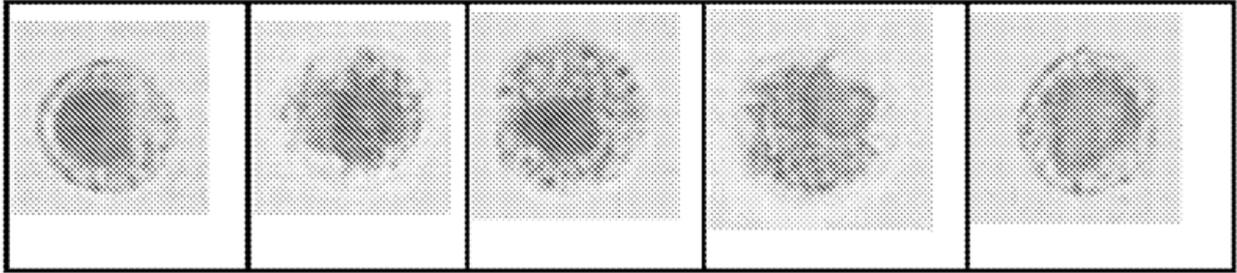
EOSINÓFILOS



BASÓFILOS

FIG. 6

BASÓFILOS (EJEMPLO 1)



BASÓFILOS (EJEMPLO 2)

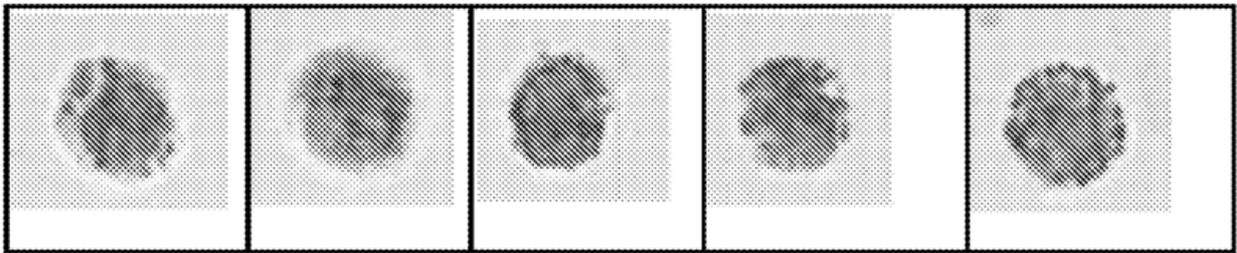


FIG. 7

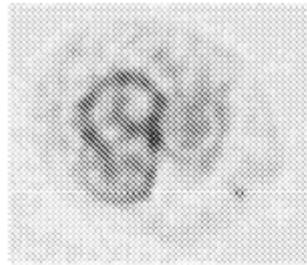
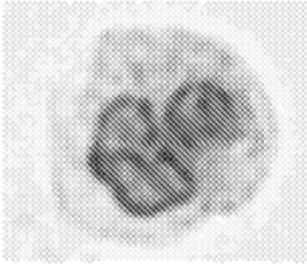
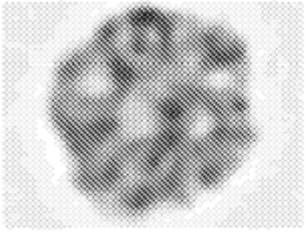


FIG. 8

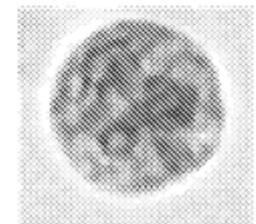
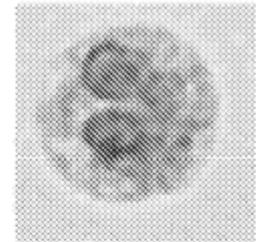
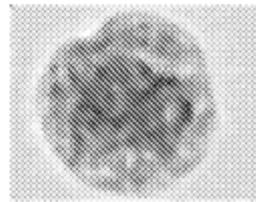
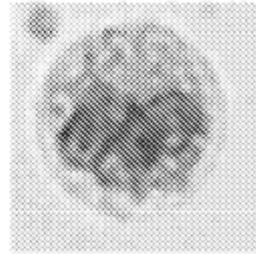
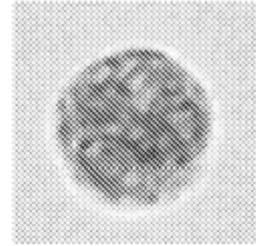


FIG. 9

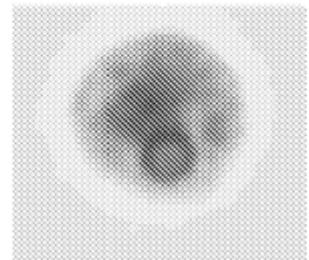
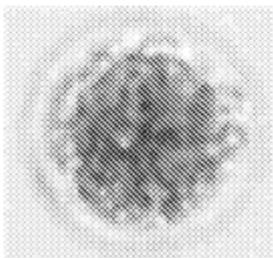
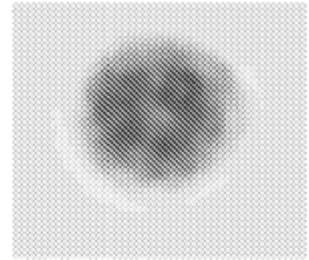
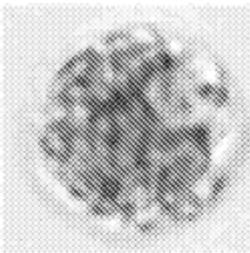
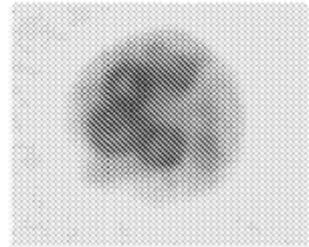
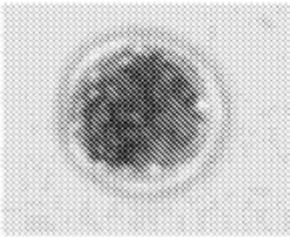
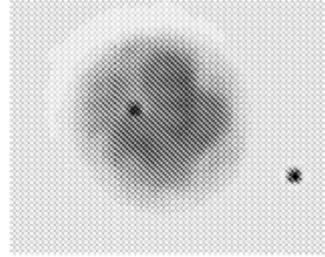
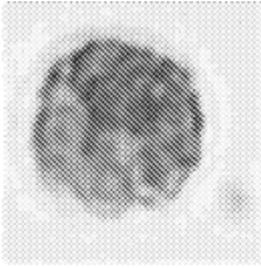


FIG. 10

FIG. 11

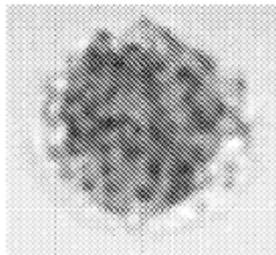
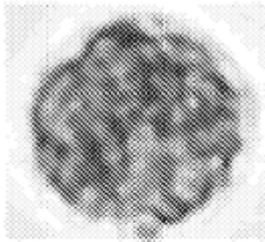
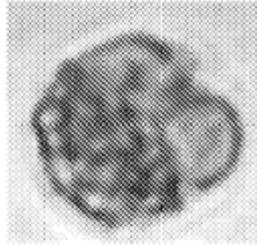
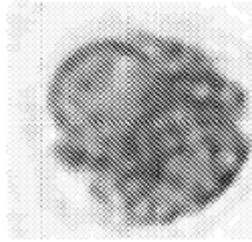
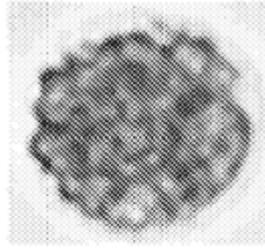


FIG. 12