

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 785**

51 Int. Cl.:

**G01N 15/14** (2006.01)

**G01N 15/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2012 PCT/US2012/035163**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2012 WO12151105**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2012 E 12779290 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 2705135**

54 Título: **Método de análisis de basófilos**

30 Prioridad:

**04.05.2011 US 201161482549 P**

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

**23.04.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WU, JIONG;  
BUHL, MICHAEL, R. y  
VACCA, GIACOMO**

74 Agente/Representante:

**INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E  
INVENCIONES, SLP**

ES 2 755 785 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 de análisis de basófilos

### 5 Antecedentes

La presente invención se refiere a métodos de hematología. Más específicamente, la presente invención se refiere a métodos para analizar muestras de sangre e identificar, clasificar y/o calcular los basófilos en una muestra de sangre.

10 Los basófilos son una subpoblación de glóbulos blancos (GB), que representa el 1 % o menos del recuento total de GB en una muestra de sangre normal. Los basófilos son la subpoblación menos común de GB. Clínicamente, los basófilos están principalmente implicados en ciertas reacciones inflamatorias y alérgicas. Los basófilos descargan los mediadores del sistema inmunitario, como la histamina, serotonina y heparina, para ayudar a que fluya la sangre y prevenir que esta se coagule.

15 Tradicionalmente, los basófilos se identifican y cuentan manualmente mediante la inspección del portaobjetos del microscopio que contienen frotis de muestras de sangre. No obstante, la precisión y exactitud de esta revisión manual del portaobjetos es cuestionable porque los basófilos están en concentraciones muy bajas con respecto a otras subpoblaciones de glóbulos blancos. Por otra parte, la necesidad de disponer de auxiliares médicos bien capacitados y el coste de sus honorarios correspondientes hacen que la revisión manual de los portaobjetos sea aún menos viable comercialmente.

20 Las técnicas alternativas para la detección de basófilos incluyen el uso de anticuerpos en un sistema de análisis de citometría de flujo. Se halló que hay numerosos anticuerpos, tal como, por ejemplo, CD203c, CD63 y FCsR1, que son sensibles y específicos a los antígenos de superficie de los basófilos. Sin embargo, el coste de los ensayos con anticuerpos de basófilos, la larga duración de la preparación de la muestra y del proceso de medición y la necesidad de disponer de un auxiliar médico certificado con experiencia en citometría de flujo hacen que los métodos de ensayo de citometría de flujo sean poco populares en la mayoría de los hospitales y laboratorios.

30 En cambio, los basófilos se presentan más comúnmente como estimaciones del "mejor cálculo" en analizadores automatizados de hematología diferencial de cinco partes. En la práctica, la elaboración de un ensayo de basófilos preciso y eficiente ha sido un desafío porque: (1) cada muestra de sangre se analiza en menos de un minuto, incluyendo la aspiración de la muestra, la interacción muestra-reactivo y la incubación, así como la medición de la muestra, que es un período de tiempo insuficiente para la identificación de basófilos; (2) la aparición de basófilos es inferior al 1 % en la mayoría de las muestras de sangre; (3) los basófilos y los linfocitos comparten características similares de dispersión óptica, aumentando así la probabilidad de confundirlos; y (4) los ensayos diseñados específicamente para basófilos aumentan en gran medida la complejidad y el coste del sistema.

40 El documento US 2007/0298408 A1 describe un método para realizar un análisis de basófilos con un analizador de hematología automatizado, el método comprende (a) diluir una muestra de sangre completa con un reactivo, en donde el reactivo incluye un agente de lisis de glóbulos rojos y un colorante fluorescente de unión al ácido nucleico permeable a la membrana celular; (b) incubar la muestra de sangre diluida de la etapa (a) durante un período de tiempo de incubación; (c) trasladar la muestra incubada de la etapa (b) a una cubeta de lectura del analizador de hematología; (d) excitar la muestra incubada de la etapa (c) con una fuente de excitación a medida que la muestra incubada atraviesa la cubeta de lectura, (e) captar una pluralidad de señales de dispersión de luz y una señal de emisión de fluorescencia de la muestra excitada; y (g) realizar un análisis de agrupamiento de basófilos.

### Breve resumen

50 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método de acuerdo con la reivindicación 1.

### Breve descripción de las figuras

55 Los dibujos adjuntos, que se incorporan en el presente documento, forman parte de la memoria descriptiva. Junto con esta descripción escrita, los dibujos también sirven para explicar los principios de uso de los métodos presentados y para permitir a un experto en la materia pertinente utilizarlos. En los dibujos, los números de referencia similares indican elementos idénticos o funcionalmente similares.

60 La figura 1 es un diagrama esquemático que ilustra un instrumento de hematología.  
La figura 2A es un citograma de dispersión lateral polarizada de 90° frente a la dispersión de ángulo intermedio de una primera muestra de sangre (MUESTRA 1).  
La figura 2B es un citograma de pérdida de luz axial frente a la dispersión de ángulo intermedio de la MUESTRA 1.  
65 La figura 3A es un citograma de dispersión lateral polarizada de 90° frente a dispersión de ángulo intermedio de una segunda muestra de sangre (MUESTRA 2).  
La figura 3B es un citograma de pérdida de luz axial frente a la dispersión de ángulo intermedio de la MUESTRA

2.

La figura 4 es un citograma de fluorescencia frente a la dispersión de ángulo intermedio de la MUESTRA 1, que muestra linfocitos y basófilos.

La figura 5 es un citograma de fluorescencia frente a la dispersión de ángulo intermedio de la MUESTRA 2, que muestra linfocitos y basófilos.

La figura 6A es un citograma de dispersión lateral polarizada de 90° frente a la dispersión de ángulo intermedio de la MUESTRA 1.

La figura 6B es un citograma de pérdida de luz axial frente a la dispersión de ángulo intermedio de la MUESTRA 1.

La figura 6C es un citograma de fluorescencia frente a la dispersión de ángulo intermedio de la MUESTRA 1.

La figura 7A es un citograma de dispersión lateral polarizada de 90° frente a la dispersión de ángulo intermedio de una MUESTRA 2.

La figura 7B es un citograma de pérdida de luz axial frente a la dispersión de ángulo intermedio de la MUESTRA 2.

La figura 7C es un citograma de fluorescencia frente a la dispersión de ángulo intermedio de la MUESTRA 2.

La figura 8 es un gráfico que muestra la correlación de los porcentajes de basófilos analizados por selección manual frente a los porcentajes de basófilos determinados por citometría de flujo.

La figura 9 es un gráfico que muestra la correlación de los porcentajes de basófilos analizados por agrupamiento frente a los porcentajes de basófilos determinados por citometría de flujo.

### Descripción detallada

En el presente documento se proporcionan métodos para analizar muestras de sangre y, más específicamente, para realizar un análisis de basófilos para identificar, clasificar y contar basófilos en una muestra de sangre. Los métodos generalmente incluyen: (a) teñir una muestra de sangre con un colorante fluorescente exclusivo permeable a la membrana celular; y después (b) usar las mediciones de la dispersión de luz y emisión de fluorescencia para distinguir los basófilos de otras subpoblaciones de glóbulos blancos (GB). Más específicamente, los métodos pueden emplear un analizador de hematología que tenga: una fuente de excitación, instalada para excitar las partículas dentro de la muestra de sangre; una pluralidad de detectores, instalados para medir la dispersión de la luz y la emisión de fluorescencia; y un procesador, configurado para (a) recibir las mediciones de dispersión de luz y emisión de fluorescencia y (b) realizar un análisis de agrupación de basófilos de la muestra de sangre, en función de las medidas recibidas. El análisis de agrupación de basófilos puede incluir una agrupación "vasta" de las mediciones recibidas, y después, una agrupación "selecta" de las mediciones recibidas. La agrupación selecta puede utilizar una métrica multidimensional de distancia de probabilidad como determinante para combinar agrupaciones similares.

Los métodos incluyen el cribado de eventos que contienen núcleos frente a eventos que no contienen núcleos por medio de tinción fluorescente y de una estrategia de activación de la fluorescencia. Por tanto, la interferencia de glóbulos rojos no lisados (GR), tales como los glóbulos rojos resistentes a la lisis (GBrst) y los fragmentos de GB, se eliminan sustancialmente antes del siguiente análisis. Dicho de otra forma, los sistemas y métodos descritos en este documento utilizan al menos un colorante fluorescente y un sistema de activación de fluorescencia para cribar los eventos que contienen núcleos, para identificar y calcular de manera precisa y fiable los GB (y las subpoblaciones de GB). Luego, se utiliza una combinación de información de dispersión de luz y de información de fluorescencia para separar aún más específicamente las subpoblaciones de GB y los basófilos. Así, los sistemas y métodos descritos garantizan un recuento y diferenciación precisos de los basófilos.

(1) Uso de una pluralidad de canales ópticos y al menos un canal de fluorescencia para el análisis.

En una realización, El análisis de la muestra de sangre se realiza mediante tecnología de separación por dispersión polarizada con múltiples ángulos (MAPSS), con una mejora de la información de fluorescencia. Al menos un fotodiodo, o al menos un tubo fotomultiplicador, o ambos, al menos un fotodiodo y al menos un tubo fotomultiplicador, son necesarios para detectar la luz dispersada por cada célula sanguínea que pasa a través de una cubeta de lectura. Se utilizan dos o más fotodiodos para medir las señales de pérdida de luz axial (PLA), que miden aproximadamente 0° de dispersión, y señales de dispersión de ángulo intermedio (DAI), que miden la dispersión de ángulo bajo (por ejemplo, la dispersión de aproximadamente 3° a aproximadamente 15°). Se utilizan dos o más tubos fotomultiplicadores para detectar señales de dispersión lateral polarizada (DLP) de 90° y señales de dispersión lateral despolarizada (DLD) de 90°. Se necesitan tubos fotomultiplicadores adicionales para medir la fluorescencia (FL1) dentro del o los rangos de longitud de onda apropiados, dependiendo de la elección de longitud de onda de la fuente de luz. Cada evento capturado en el sistema presenta de esta manera una pluralidad de dimensiones de información, como PLA, DAI (uno o más canales), DLP, DLD y fluorescencia (uno o más canales). La información de estos canales de detección se utiliza para un análisis posterior de las células sanguíneas.

La figura 1 es un diagrama esquemático que ilustra las ópticas de iluminación y de detección de un aparato adecuado para el análisis de hematología (incluida la citometría de flujo). A continuación, en cuanto a la figura 1, un aparato 10 comprende una fuente de luz 12, un espejo delantero 14 y un espejo trasero 16 para la flexión del haz, un módulo expansor del haz 18, que contiene una primera lente cilíndrica 20 y una segunda lente cilíndrica 22, una lente de enfoque 24, un ajustador de haz fino 26, una cubeta de lectura 28, una lente de dispersión delantera 30, un detector

de ojo de buey 32, un primer tubo fotomultiplicador 34, un segundo tubo fotomultiplicador 36 y un tercer tubo fotomultiplicador 38. El detector de ojo de buey 32 tiene un detector interno 32a para una dispersión de luz de 0° y un detector externo 32b para una dispersión de luz de 7°.

- 5 En la descripción de a continuación, La fuente de luz es preferiblemente un láser. En realizaciones alternativas, se selecciona un láser que emite luz a una longitud de onda de entre aproximadamente 350 nm a aproximadamente 700 nm; por ejemplo, en una realización, se usa un láser que emite luz a aproximadamente 488 nm. La fuente de luz 12 puede ser un láser Coherent Cube refrigerado por aire y polarizado verticalmente, disponible comercialmente en Coherent, Inc., Santa Clara, California. Se pueden usar láseres con longitudes de onda que oscilan de 350 nm a 10 700 nm. Las condiciones de funcionamiento del láser son sustancialmente similares a las de los láseres utilizados actualmente con los analizadores de hematología automatizados "CELL-DYN". Sin embargo, también se pueden usar otras fuentes de luz; tal como, por ejemplo, lámparas (por ejemplo, de mercurio, xenón).

- 15 En la patente estadounidense n.º 5.631.165 se pueden encontrar los detalles adicionales relacionados con la cubeta de lectura, las lentes, la lente de enfoque, el mecanismo de ajuste de haz fino y la lente de enfoque para láser; en particular, de la columna 41, línea 32 a la columna 43, línea 11. El sistema de vía óptica delantera que se muestra en la figura 1 incluye una lente esférica planoconvexa 30 y un detector de fotodiodos de dos elementos 32 ubicado en el plano focal posterior de la lente. En esta configuración, cada punto dentro del detector de fotodiodos de dos elementos 20 32 se asigna a un ángulo específico de captación de luz de las células que se mueven a través de la cubeta de lectura 28. El detector 32 puede ser un detector de ojo de buey capaz de detectar la pérdida de luz axial (PLA) y la dispersión delantera de ángulo intermedio (DAI). La patente estadounidense n.º 5.631.165 describe varias alternativas a este detector en la columna 43, líneas 12-52.

- 25 El primer tubo fotomultiplicador 34 (TFM1) mide la dispersión lateral despolarizada (DLD). El segundo tubo fotomultiplicador 36 (TFM2) mide la dispersión lateral polarizada (DLP) y el tercer tubo fotomultiplicador 38 (TFM3) mide la emisión de fluorescencia de aproximadamente 360 nm a aproximadamente 750 nm, dependiendo del colorante fluorescente seleccionado y de la fuente de luz empleada. En una realización, el TFM3 mide la emisión de fluorescencia de aproximadamente 440 nm a aproximadamente 680 nm, o más específicamente, de aproximadamente 30 500 nm a aproximadamente 550 nm. El tubo fotomultiplicador capta las señales fluorescentes en un amplio rango de longitudes de onda para aumentar la intensidad de la señal. Las emisiones de dispersión lateral y fluorescentes se dirigen hacia estos tubos fotomultiplicadores gracias a los divisores de haz dicróico 40 y 42, que transmiten y reflejan eficazmente a las longitudes de onda requeridas para permitir una detección eficiente. La patente estadounidense n.º 5.631.165 describe varios detalles adicionales relacionados con los tubos fotomultiplicadores de la columna 43, línea 53 a la columna 44, línea 4.

- 35 La sensibilidad se mejora en los tubos fotomultiplicadores 34, 36 y 38 cuando se mide la fluorescencia mediante el uso de un sistema de captación de inmersión. El sistema de captación de inmersión es aquel que acopla ópticamente la primera lente 30 a la cubeta de lectura 28 por medio de una capa de coincidencia del índice de refracción, permitiendo la captación de luz en un gran ángulo. La patente estadounidense n.º 5.631.165 describe varios detalles 40 adicionales de este sistema óptico en la columna 44, líneas 5-31.

- 45 El condensador 44 es un sistema de lente óptica con suficiente corrección de la aberración para la obtención de imágenes de difracción limitada utilizadas en microscopía de alta resolución. La patente estadounidense n.º 5.631.165 describe varios detalles adicionales de este sistema óptico en la columna 44, líneas 32-60.

- 50 Las funciones de otros componentes que se muestran en la figura 1, es decir, de una ranura 46, de una lente de campo 48 y de una segunda ranura 50, se describen en la patente estadounidense n.º 5.631.165, de la columna 44, línea 63 a la columna 45, línea 26. En esta patente estadounidense n.º 5.631.165 se describen filtros ópticos 52 o 56 y un polarizador 52 o 56, que se insertan en las vías de luz de los tubos fotomultiplicadores para cambiar la longitud de onda o la polarización o tanto la longitud de onda como la polarización de la luz detectada (de la columna 44, línea 63 a la columna 45, línea 26). Los filtros ópticos que son adecuados para su uso en este documento incluyen filtros de paso de banda y filtros de paso largo.

- 55 Los tubos fotomultiplicadores 34, 36 y 38 detectan la dispersión lateral (luz dispersada en un cono cuyo eje es aproximadamente perpendicular al haz del láser incidente) o la fluorescencia (luz emitida por las células a una longitud de onda diferente de la del haz de láser incidente).

(2) Uso de colorante(s) fluorescente(s).

- 60 Los GB contienen una concentración relativamente alta de ADN en sus núcleos. Cuando está diseñado adecuadamente, se puede usar un colorante fluorescente para diferenciar entre diferentes subpoblaciones de GB. Por ejemplo, los linfocitos y los basófilos tienen diferentes marcas de fluorescencia, a pesar de tener marcas de dispersión de luz similares. Además, Los GR maduros no contienen ADN. Por lo tanto, se puede seleccionar un colorante fluorescente para diferenciar entre poblaciones de células sanguíneas. El propósito del colorante es penetrar 65 fácilmente en las células vivas, unirse al ADN con alta afinidad y emitir una fuerte fluorescencia con el cambio de Stokes adecuado cuando se excita el colorante con una fuente de luz apropiada. La absorción máxima del colorante

en la banda visible puede coincidir sustancialmente con la longitud de onda de la fuente de luz (dentro de los 50 nm de la longitud de onda de la fuente de luz, más preferentemente, dentro de los 25 nm de la longitud de onda de la fuente de luz), para excitar adecuadamente el colorante y conseguir resultados óptimos.

5 El colorante fluorescente seleccionado es preferiblemente: 1) capaz de unirse a ácidos nucleicos, 2) capaz de penetrar en las membranas celulares de los GB y GRN, 3) capaz de excitarse a una longitud de onda seleccionada cuando se somete a una fuente de luz, 4) capaz de emitir fluorescencia tras la excitación realizada por la fuente de luz, y 5) es bioestable y soluble en un líquido. El colorante se puede seleccionar del grupo que consiste en: naranja de acridina, SYBR 11, colorante de la serie Verde SYBR, yoduro de hexidio, SYTO 11, SYTO 12, SYTO 13, SYTO 14, SYTO 16,  
10 SYTO 21, SYTO RNA Select, SYTO 24, SYTO 25 y sus equivalentes. El colorante se usa para "activar" los GB y GRN, "descartar" los GR no lisados y los fragmentos de GR basados en un activador de fluorescencia configurado en el analizador de hematología, y diferenciar entre las subpoblaciones de GB. El colorante suele estar presente a una concentración de aproximadamente 0,1 ng/ml a aproximadamente 0,1 mg/ml. Si bien hay varios colorantes disponibles, el colorante seleccionado generalmente se combina con la fuente de excitación del analizador de hematología, de modo que se usa un único colorante exclusivo para teñir y excitar la emisión de fluorescencia en los  
15 GRN y todas las subpoblaciones de GB que se pretenden identificar, calcular y/o analizar. Por tanto, se puede usar un solo colorante (es decir, exclusivo) para identificar, calcular y analizar al mismo tiempo los basófilos de entre todas las demás subpoblaciones de GB.

20 En una realización, se proporciona un colorante fluorescente en un reactivo, con combinaciones de 1) al menos un tensioactivo, 2) al menos un tampón, 3) al menos una sal, y/o 4) al menos un agente antimicrobiano, en cantidades suficientes para llevar a cabo la tinción y activar hasta  $1.000 \times 10^3$  células por microlitro. Dicho al menos un tensioactivo, como "TRITON" X-100 o saponina, se usa para destruir las membranas de los GR y reducir el tamaño de los fragmentos de GR. Dicho al menos un tensioactivo suele estar presente a una concentración de  
25 aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 5 %. Dicho al menos un agente antimicrobiano, como los de las familias "TRI ADI NE" o "PROCLIN", se utiliza para evitar la contaminación del reactivo por microbios. La concentración de dicho al menos un agente antimicrobiano es suficiente para conservar el reactivo durante la vida útil requerida. Dicho al menos un tampón, como la solución salina tamponada con fosfato (PBS) o el ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazina-metanosulfónico (HEPES), se usa para ajustar el pH de la mezcla de reacción para controlar la lisis de los  
30 GR y conservar los GB. Dicho al menos un tampón suele estar presente a una concentración de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 3 %. El pH varía normalmente de aproximadamente 3 a aproximadamente 12. Dicha al menos una sal, como NaCl o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se usa para ajustar la osmolalidad y aumentar el efecto de la lisis y/u optimizar la conservación de los GB. Dicha al menos una sal puede estar presente a una concentración de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 3 %. En ciertos casos, dicho al menos un tampón puede servir como dicha al menos una  
35 sal, o dicha al menos una sal puede servir como dicho al menos un tampón.

En general, la menor osmolalidad o hipotonicidad se usa para acelerar la lisis de los GR. La osmolalidad normalmente oscila de aproximadamente 20 a aproximadamente 250 mOsm. Se puede hacer que la lisis de los GR se produzca a una temperatura superior a la temperatura ambiente (por ejemplo, entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente  
40 50 °C, como a aproximadamente 40 °C) durante un periodo de tiempo relativamente corto (por ejemplo, menos de aproximadamente 25 segundos, menos de aproximadamente 17 segundos o incluso menos de aproximadamente 9 segundos), después de mezclar la muestra de sangre y el reactivo en una proporción de aproximadamente una parte en volumen de muestra a aproximadamente 35 partes en volumen de reactivo.

45 Los datos de dispersión y fluorescencia para el análisis generalmente se recopilan con una pluralidad de canales ópticos y al menos un canal de fluorescencia, como se ha descrito anteriormente.

(3) Uso de un activador de fluorescencia.

50 Las células sanguíneas emiten diferentes magnitudes de señales de fluorescencia tras la excitación del colorante fluorescente por una fuente de luz. Las diferencias en la magnitud de las señales de fluorescencia surgen de la cantidad de ácidos nucleicos, concretamente del ADN, dentro de las células. Cuanto mayor es la cantidad de ADN, mayor es la probabilidad de encontrar señales de fluorescencia más altas. Además, la eficacia de penetración de las membranas celulares, el tamaño del colorante, la cinética de unión entre el colorante y el ADN, la afinidad entre el  
55 colorante y el ADN y otros factores afectan a las señales de fluorescencia. Los GR maduros emiten señales de fluorescencia mínimas porque no hay ADN dentro de estos. Los GR o fragmentos de GR no lisados no emiten fluorescencia, aunque pueden emitir una autofluorescencia muy débil. Los basófilos también han demostrado tener diferentes propiedades de emisión de fluorescencia que los linfocitos.

60 Por tanto, los sistemas y métodos presentados en el presente documento utilizan un activador de fluorescencia para captar y analizar los GB y subpoblaciones de GB. Antes de diferenciar los basófilos/linfocitos, se coloca un activador de fluorescencia entre las señales de los GR y las señales de los GB (y de los GRN, cuando estén presentes). La información óptica y de fluorescencia recopilada se puede usar para distinguir (o diferenciar) las subpoblaciones de GB. Por ejemplo, los citogramas bidimensionales se pueden utilizar para identificar y distinguir partículas.  
65

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "información de fluorescencia" significa datos recopilados de

un canal de fluorescencia de un analizador de hematología. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "canal de fluorescencia" significa un dispositivo de detección, como un tubo fotomultiplicador, instalado en una banda de longitud de onda apropiada para medir la cantidad de fluorescencia emitida por una muestra.

## 5 Ejemplos

La figura 2A es un citograma de dispersión lateral polarizada a 90° (DLP) frente a la dispersión de ángulo intermedio (DAI) de una primera muestra de sangre (MUESTRA 1) que contiene aproximadamente 1,6 % de basófilos. La figura 2B es un citograma de pérdida de luz axial (PLA) frente a la DAI de la MUESTRA 1. Los basófilos 100 se separaron del resto de las subpoblaciones de GB mediante selección manual. La figura 3A es un citograma de DLP frente a la DAI de una segunda muestra de sangre (MUESTRA 2) que contiene aproximadamente 0,2 % de basófilos. La figura 3B es un citograma de PLA frente a la DAI de la MUESTRA 2. Los basófilos 100 se separaron del resto de las subpoblaciones de GB mediante selección manual. Las figuras 2A, 2B, 3A y 3B ilustran que los basófilos pueden separarse por medio de una dispersión lateral de ángulo pequeño (es decir, DAI, 3°-15°) y por dispersión delantera (es decir, PLA, 0°-2°).

La figura 4 es un citograma de fluorescencia (FL1) frente a la DAI de la MUESTRA 1. En el citograma solo se muestran los linfocitos 200, los basófilos 100 y los restos de monocitos 300. La figura 5 es un citograma de FL1 frente a la DAI de la MUESTRA 2. En el citograma solo se muestran los linfocitos 200, los basófilos 100 y los restos de monocitos 300. Las figuras 4 y 5 ilustran que la tinción con colorante fluorescente permite una mayor separación de los basófilos de las subpoblaciones de GB (por ejemplo, linfocitos) en una o más dimensiones de fluorescencia. Dicha separación es el resultado de las posibles variaciones en la potencia de las membranas, el contenido de ADN y en la eficacia de tinción entre diferentes subpoblaciones de GB. Por ejemplo, el tratamiento de los GB con un reactivo de GB que contiene naranja de acridina (3 mg/ml), a una temperatura de 40 °C durante 25 segundos, da como resultado señales FL1 generalmente más altas de los linfocitos y señales FL1 más bajas de los basófilos. Por lo tanto, la identificación y cálculo de los basófilos se puede facilitar aún más con dicho reactivo de GB. Dicho de otra forma, los basófilos se pueden separar de los linfocitos por medio de señales de emisión de fluorescencia cuando el reactivo de GB hace que los basófilos emitan fluorescencia a diferentes magnitudes de las emitidas por los linfocitos (u otras subpoblaciones de GB).

En las figuras 6A-6C y 7A-7C se muestran resultados adicionales. Por ejemplo, Las figuras 6A, 6B, 6C muestran la separación de basófilos usando múltiples dimensiones (es decir, más de dos dimensiones (por ejemplo, cinco dimensiones)) de la MUESTRA 1. Más específicamente, la figura 6A es un citograma de DLP frente a la DAI de la MUESTRA 1. La figura 6B es un citograma de PLA frente a la DAI de la MUESTRA 1. La figura 6C es un citograma de FL1 frente a la DAI de la MUESTRA 1. Los basófilos 100 se separaron del resto de los GB mediante un análisis de agrupamiento. Las figuras 7A, 7B y 7C muestran la separación de los basófilos usando múltiples dimensiones (es decir, más de dos dimensiones (por ejemplo, cinco dimensiones)) de la MUESTRA 2. Más específicamente, la figura 7A es un citograma de DLP frente a la DAI de la MUESTRA 2. La figura 7B es un citograma de PLA frente a la DAI de la MUESTRA 2. La figura 7C es un citograma de FL1 frente a la DAI de la MUESTRA 2. Los basófilos 100 se separaron del resto de los GB por medio de un análisis de agrupamiento.

También se realizó un estudio exhaustivo de los basófilos para evaluar los sistemas y métodos descritos en este documento. Se midieron un total de 56 muestras de sangre, con un porcentaje de basófilos que oscilaba de 0 a aproximadamente 5 %, en un analizador prototipo operado según el método descrito en el presente documento. Las muestras se analizaron mediante selección manual y un algoritmo de análisis de agrupamiento para obtener la concentración de basófilos, es decir, el porcentaje de basófilos (alternativamente denominado en el presente documento "% BA"). Durante la operación, el algoritmo de análisis de agrupamiento aplica un agrupamiento "vasto" inicial, lo que da como resultado una gran cantidad de grupos. El algoritmo luego aplica una segunda etapa de agrupamiento "selecto", utilizando una métrica multidimensional de distancia de probabilidad como determinante para combinar grupos similares. Como resultado de ello, en esta segunda etapa, el número de células en un grupo no se usa como determinante, por lo que se conservan los grupos que tienen bajas concentraciones de células, como los basófilos. Todas las dimensiones ópticas y de fluorescencia, que incluyen la PLA, DAI, DLP, DLD y FL1, se utilizan para determinar el grupo de basófilos.

Los valores de referencia se obtuvieron midiendo el mismo conjunto de muestras con un citómetro de flujo Accuri®C6, con un panel doble de basófilos de anticuerpos (CD45 y FCsR1). Se midió la CD45 en el canal FL3 y se midió el FCsR1 en el canal FL4. Los resultados de este estudio se muestran en las figuras 8 y 9. Más específicamente, la figura 8 es un gráfico que muestra la correlación de los porcentajes de basófilos analizados mediante selección manual frente a los porcentajes de basófilos determinados por un citómetro de flujo de referencia. Se midieron un total de 56 muestras y se incluyeron en el gráfico de correlación. La figura 9 es un gráfico que muestra la correlación de los porcentajes de basófilos analizados por agrupamiento frente a los porcentajes de basófilos determinados por un citómetro de flujo de referencia. Se midieron un total de 56 muestras y se incluyeron en el gráfico de correlación. Las correlaciones fueron las siguientes:

$$Y=0,9375 X-0,0435; R^2=0,9151$$

(véase la figura 8: selección manual frente a la referencia)

$$Y=1,0721X+0,0348; R^2=0,9144$$

5 (véase la figura 9: agrupamiento aleatorio frente a la referencia)

10 Como se muestra, se consiguieron excelentes correlaciones entre el método descrito en el presente documento y el método de referencia (es decir, utilizando el citómetro de flujo Accuri®C6). La separación entre basófilos y linfocitos fue evaluada cuantitativamente usando también la distancia de Bhattacharyya. La distancia media de Bhattacharyya entre basófilos y linfocitos fue de  $4,2 \pm 2,0$  para las 56 muestras, lo que indicó un análisis fiable de los basófilos en general. Solo hubo siete muestras (12,5 %) que mostraban una separación menos óptima (distancia de Bhattacharyya  $<3,0$ , pero todos  $>2,5$ ).

15 La TABLA 1 compara los resultados de la referencia (es decir, utilizando el citómetro de flujo Accuri®C6), del análisis de selección manual, del análisis de agrupamiento y de la distancia de Bhattacharyya.

TABLA 1

	MUESTRA 1	MUESTRA 2
% BA (referencia)	1,60	0,19
% BA (selección manual)	1,68	0,25
% BA (análisis de agrupamientos)	1,62	0,22
BA-LY (distancia de Bhattacharyya)	4,26	5,27

20 La separación satisfactoria de los basófilos y los linfocitos se logró optimizando el reactivo de GB para generar diferentes señales de dispersión óptica de los basófilos y linfocitos, y utilizando un colorante fluorescente para teñir los GB y emitir diferentes niveles de señales de fluorescencia. El cálculo preciso de los basófilos se puede lograr mediante el método descrito en el presente documento. Además, el método descrito en el presente documento es rápido, simple y rentable. Los basófilos se pueden identificar y calcular en menos de un minuto, normalmente en menos de 30 segundos, con tan solo un reactivo de GB. La formulación del reactivo de GB permite observar a los basófilos como una población separada en una pluralidad de dimensiones ópticas y en al menos una dimensión de fluorescencia. Además, la identificación y el cálculo de basófilos se puede llevar a cabo simultáneamente con la identificación y cálculo de todas las subpoblaciones de GB en un solo ensayo.

#### 30 Realizaciones adicionales

35 En una realización, los métodos incluyen: (a) optimizar un reactivo de GB mediante la selección adecuada de tensioactivo(s), la(s) concentración(es) de tensioactivo(s), una selección apropiada de los agente(s) estabilizador(es) de GB, la(s) concentración(es) de agente(s) estabilizador(es) de GB, el pH final de la mezcla de reacción y la osmolalidad; (b) incluir un colorante para teñir los núcleos en el reactivo de GB para teñir los GB; y (c) analizar los basófilos que aparecen después de procesar archivos de datos sin procesar utilizando un algoritmo de agrupamiento automático. Los archivos de datos sin procesar pueden incluir eventos que tienen al menos cinco dimensiones de información; concretamente, PLA, DAI, DLP, DLD y FL1, junto con etiquetas de tiempo y otra información relevante. El componente de optimización permite diferenciar los basófilos de los linfocitos en al menos una de las dimensiones ópticas.

40 Un analizador de hematología, que no forma parte de la presente invención, puede emplearse para realizar un análisis de basófilos en una muestra de sangre que se ha teñido con un colorante fluorescente, en donde el colorante fluorescente es permeable a la membrana celular y se une al ácido nucleico. El analizador comprende una fuente de excitación instalada para excitar las partículas dentro de la muestra de sangre.

45 Una función de los métodos descritos en este documento incluye la separación de los basófilos y los neutrófilos y de los monocitos y los eosinófilos mediante tecnología de separación por dispersión polarizada con múltiples ángulos. Los basófilos y las otras tres subpoblaciones de glóbulos blancos muestran señales sustancialmente diferentes en el canal de pérdida de luz axial (PLA), que mide  $0^\circ$  de dispersión, el canal de dispersión de ángulo intermedio (DAI), que mide  $3^\circ$ - $15^\circ$  de dispersión, el canal de dispersión lateral polarizada a  $90^\circ$  (DLP) y el canal de dispersión lateral despolarizada a  $90^\circ$  (DLD). Otra función del método supone separar los basófilos de los linfocitos usando la información de dispersión óptica (como la información de la DAI, la información de la PLA y la información de la DLD) y la información de fluorescencia.

55 Un analizador de hematología, que no forma parte de la presente invención, puede emplearse para realizar un análisis de basófilos en una muestra de sangre que se ha teñido con un colorante fluorescente, en donde el colorante fluorescente es permeable a la membrana celular y se une al ácido nucleico. El analizador incluye una fuente de

excitación instalada para excitar las partículas dentro de la muestra de sangre. La fuente de excitación puede ser un láser. El analizador incluye además una pluralidad de detectores que incluyen: (1) un detector de pérdida de luz axial, instalado para medir la pérdida de luz axial de la muestra de sangre excitada, (2) un detector de dispersión de ángulo intermedio, instalado para medir la dispersión de ángulo intermedio de la muestra de sangre excitada, (3) un detector de dispersión lateral, instalado para medir la dispersión lateral a 90° de la muestra de sangre excitada y (4) un detector de fluorescencia, instalado para medir la fluorescencia emitida por la muestra de sangre excitada. El detector de pérdida de luz axial puede medir la pérdida de luz axial a 0° de dispersión. El detector de dispersión de ángulo intermedio puede medir la dispersión de ángulo de la luz de aproximadamente 3° a aproximadamente 15°. La pluralidad de detectores puede incluir uno o más tubos fotomultiplicadores. El analizador incluye además un procesador configurado para: (a) recibir las mediciones de (1) pérdida de luz axial, (2) dispersión de ángulo intermedio, (3) dispersión lateral a 90° y (4) fluorescencia de la pluralidad de detectores, y (b) realizar un análisis de agrupación de basófilos de la muestra de sangre, en función de las cuatro mediciones. El análisis de agrupación de basófilos puede incluir una agrupación vasta de las mediciones recibidas. El análisis de agrupación de basófilos puede incluir además una agrupación selecta de las mediciones recibidas, mediante el uso de una métrica multidimensional de distancia de probabilidad como determinante para combinar grupos similares.

El detector de dispersión lateral puede ser un detector de dispersión lateral polarizado instalado para medir la dispersión lateral polarizada a 90° de la muestra de sangre excitada. Por lo tanto, el procesador puede configurarse adicionalmente para distinguir los basófilos de dentro de la muestra de sangre de los linfocitos de dentro de la muestra de sangre en función de las mediciones de (1) pérdida de luz axial, (2) dispersión de ángulo intermedio, (3) dispersión lateral polarizada a 90° y (4) fluorescencia. El analizador también puede incluir un detector de dispersión lateral despolarizada instalado para medir la dispersión lateral despolarizada a 90° de la muestra de sangre excitada. El procesador puede configurarse además para distinguir los basófilos de dentro de la muestra de sangre de los neutrófilos, monocitos y eosinófilos de dentro de la muestra de sangre, en función de las mediciones de (1) pérdida de luz axial, (2) dispersión de ángulo intermedio y (3) dispersión lateral a 90°. El procesador puede configurarse adicionalmente para cribar previamente las mediciones recibidas y para dejar de tener en cuenta cualquier partícula que no cumpla con el umbral de fluorescencia.

El analizador de hematología puede comprender además un subsistema de incubación para diluir la muestra de sangre con un reactivo. El reactivo puede incluir el colorante fluorescente y un agente de lisis. El reactivo puede incluir: (a) al menos un tensioactivo, (b) al menos un tampón o al menos una sal, (c) al menos un agente antimicrobiano y (d) el colorante fluorescente. El subsistema de incubación puede configurarse para incubar la muestra de sangre con el reactivo durante un periodo de tiempo de menos de aproximadamente 30 segundos. El subsistema de incubación puede configurarse para incubar la muestra de sangre con el reactivo a una temperatura que oscila de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C. El subsistema de incubación puede configurarse para incubar la muestra de sangre con el reactivo a una temperatura de aproximadamente 40 °C.

Cualquiera de las etapas del método/análisis comentadas en el presente documento puede implementarse en un sistema informático que tenga uno o más procesadores, una infraestructura de comunicación de datos (por ejemplo, un bus de comunicaciones, barra cruzada o red), una interfaz de pantalla y/o una unidad de almacenamiento o memoria. La unidad de almacenamiento o memoria puede incluir un medio de almacenamiento legible por ordenador con instrucciones (por ejemplo, lógica de control o *software*) que, cuando se ejecuta, hace que el/los procesador(es) realice(n) una o más de las funciones descritas en este documento. Las expresiones "medio de almacenamiento legible por ordenador", "medio de programa informático" y "medio utilizable por ordenador" se utilizan generalmente para referirse a medios, tales como una unidad de almacenamiento extraíble, unidades de almacenamiento extraíbles, datos transmitidos a través de una interfaz de comunicaciones y/o un disco duro instalado en una unidad de disco duro. Dichos productos de programas informáticos proporcionan *software*, instrucciones y/o datos informáticos a un sistema informático, que también sirve para transformar el sistema informático de un ordenador con fines generales en un ordenador con fines especiales programado para realizar las funciones particulares descritas en el presente documento. Cuando corresponda, el procesador, los componentes asociados y los sistemas y subsistemas equivalentes sirven como ejemplos de "medios para" realizar las operaciones y funciones seleccionadas. Tales "medios para" realizar las operaciones y funciones seleccionadas también sirven para transformar un ordenador con fines generales en un ordenador con fines especiales programado para realizar dichas operaciones y funciones seleccionadas.

Los sistemas y métodos proporcionan así un método rápido, sencillo y rentable para detectar y analizar los basófilos en analizadores de hematología automatizados. El ensayo se puede realizar en un minuto, incluyendo no más de 30 segundos para la incubación de la muestra y no más de 10 segundos para la medición de la muestra. Se puede usar un reactivo de glóbulos blancos para lisar los glóbulos rojos y diferenciar los glóbulos blancos, incluyendo la subpoblación menos común de glóbulos blancos, en concreto, los basófilos.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para realizar un análisis de basófilos con un analizador de hematología automatizado, comprendiendo el método:
- 5 (a) diluir una muestra de sangre completa que contiene una pluralidad de basófilos y linfocitos con un reactivo, en donde el reactivo incluye un agente de lisis de glóbulos rojos (GR) y un colorante fluorescente de unión al ácido nucleico permeable a la membrana celular;
- 10 (b) incubar la muestra de sangre diluida de la etapa (a) durante un período de incubación de menos de aproximadamente 30 segundos, a una temperatura que oscila de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C;
- (c) trasladar la muestra incubada de la etapa (b) a una cubeta de lectura del analizador de hematología;
- (d) excitar la muestra incubada de la etapa (c) con una fuente de excitación a medida que la muestra incubada atraviesa la cubeta de lectura;
- 15 (e) captar una pluralidad de señales de dispersión de luz y una señal de emisión de fluorescencia de la muestra excitada;
- (f) antes de realizar un análisis de basófilos, cribar los eventos que contienen núcleos que comprenden glóbulos blancos (GB) y glóbulos rojos nucleados (GRN) para eliminar la interferencia de los GR y fragmentos de GR no lisados utilizando el colorante fluorescente y un activador de fluorescencia, en donde el activador de fluorescencia se coloca entre las señales de emisión de fluorescencia de los GR y las señales de emisión de fluorescencia de GB y GRN; y
- 20 (g) realizar un análisis de agrupamiento de basófilos en los eventos que contienen núcleos de la etapa (f) en función de todas las señales captadas en la etapa (e).
- 25 2. El método de la reivindicación 1, en donde el reactivo incluye (a) al menos un tensioactivo, (b) al menos un tampón o al menos una sal, (c) al menos un agente antimicrobiano y (d) al menos un colorante fluorescente.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la fuente de excitación tiene una longitud de onda que oscila de 350 nm a 700 nm.
- 30 4. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la fuente de excitación tiene una longitud de onda de 488 nm.
5. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la pluralidad de señales de dispersión de luz incluye (1) pérdida de luz axial, (2) dispersión de ángulo intermedio, (3) dispersión lateral polarizada a 90° y (4) dispersión lateral despolarizada a 90°.
- 35 6. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde realizar el análisis de agrupamiento de basófilos comprende distinguir los basófilos de dentro de la muestra de sangre de los neutrófilos, monocitos y eosinófilos de dentro de la muestra de sangre en función de las mediciones de (1) pérdida de luz axial, (2) dispersión de ángulo intermedio, (3) dispersión lateral a 90° y (4) fluorescencia.
- 40 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el período de tiempo de incubación es inferior a 25 segundos.
- 45 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el período de tiempo de incubación es inferior a 17 segundos.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el período de tiempo de incubación es inferior a 9 segundos.
- 50 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el reactivo contiene un único colorante fluorescente que se usa para identificar, calcular y analizar al mismo tiempo los GRN y una pluralidad de subpoblaciones de GB.
- 55 11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el reactivo está formulado para permitir que los basófilos se observen como una población separada en una pluralidad de dimensiones ópticas y en al menos una dimensión fluorescente.
- 60 12. El método según la reivindicación 1, en donde el colorante fluorescente de unión al ácido nucleico es naranja de acridina.

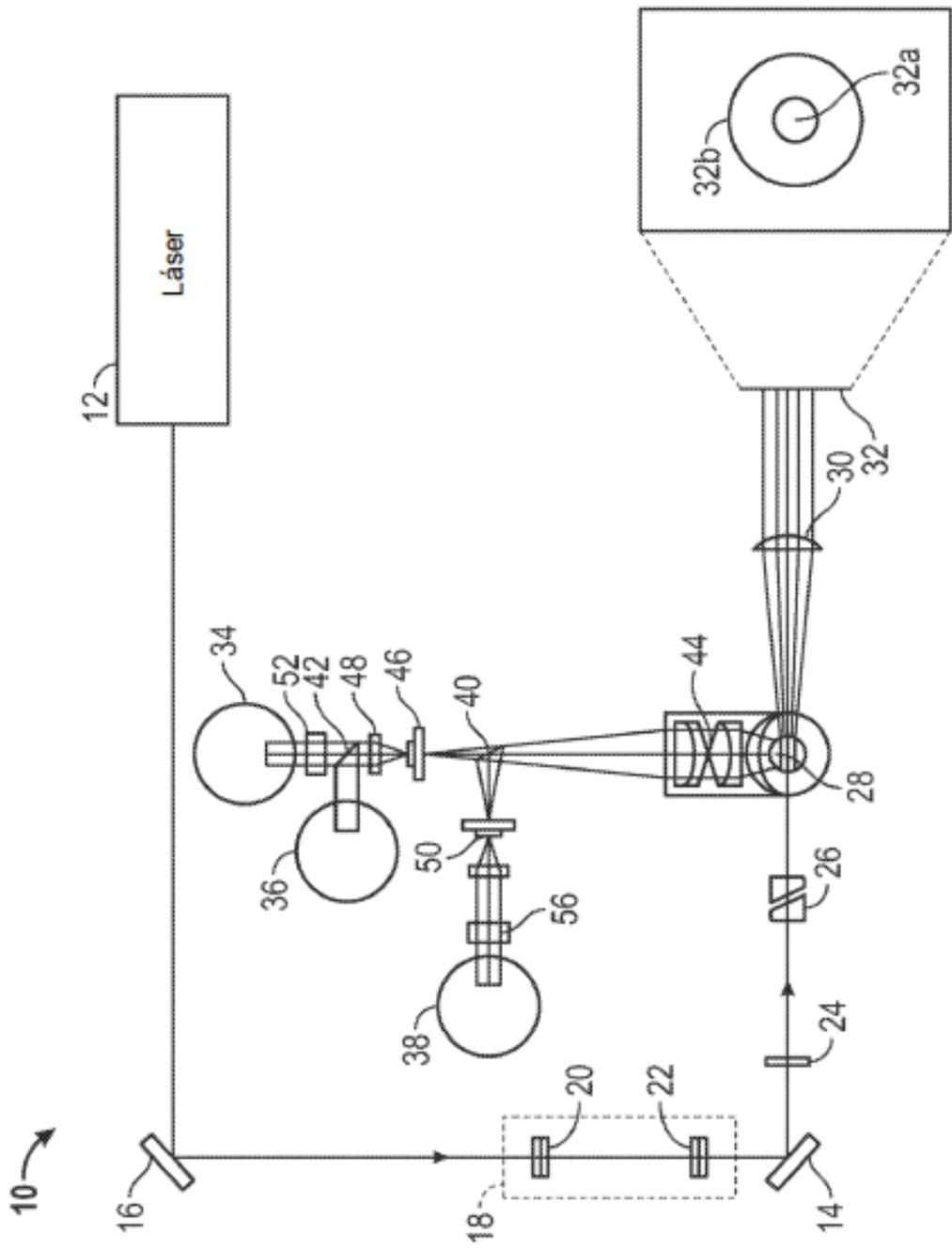
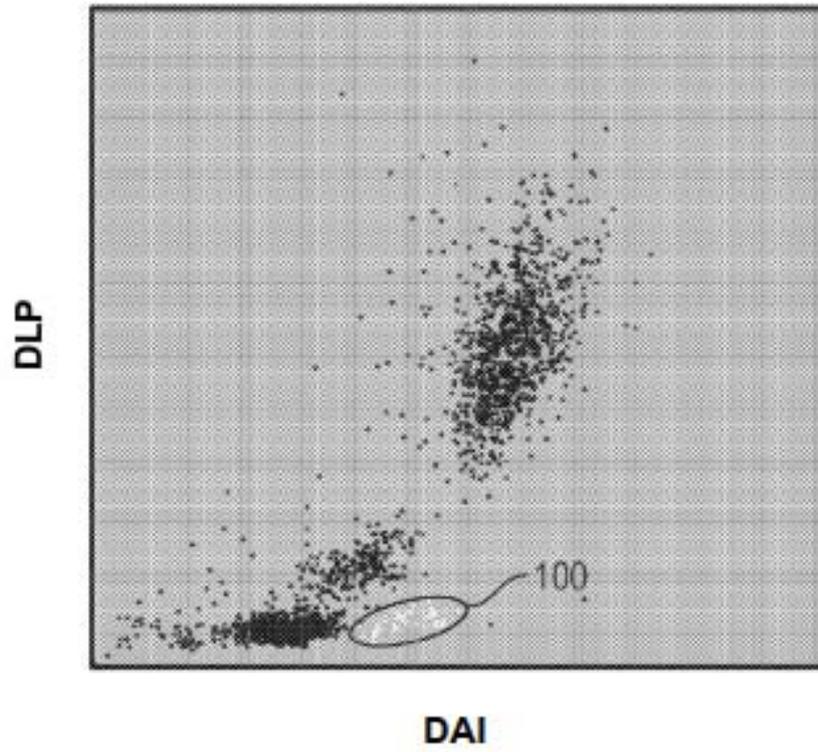
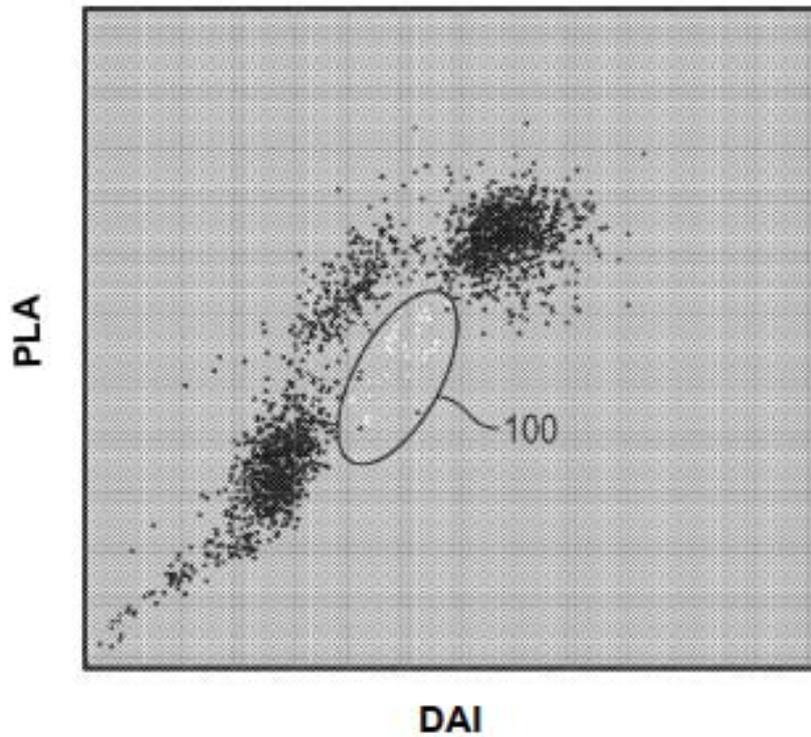


FIG. 1



DAI  
FIG. 2A



DAI  
FIG. 2B

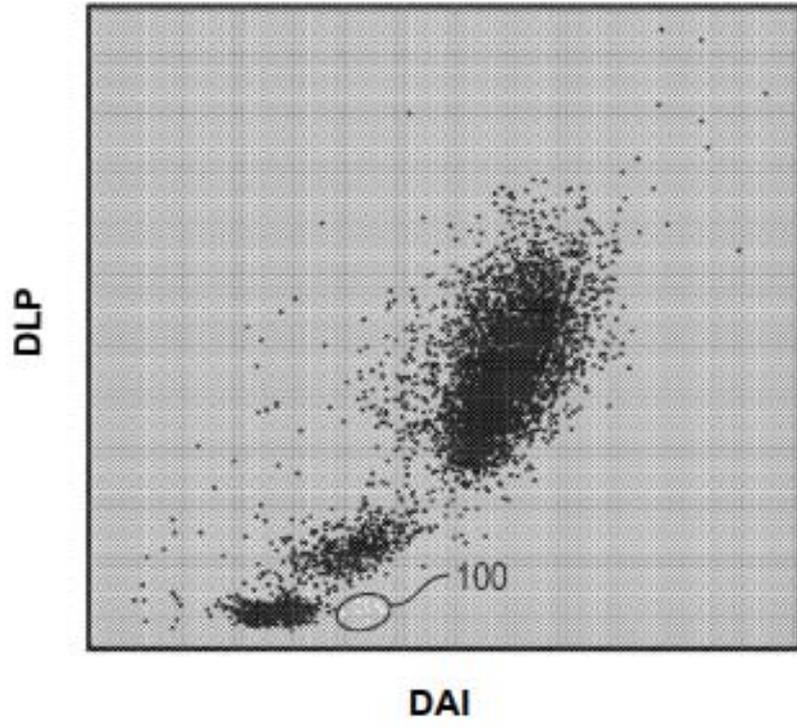


FIG. 3A

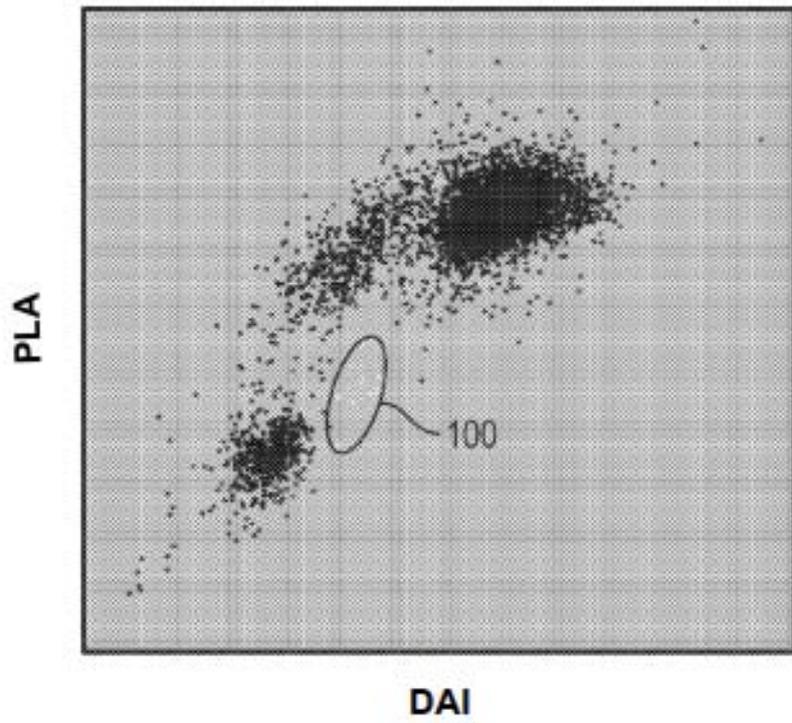


FIG. 3B

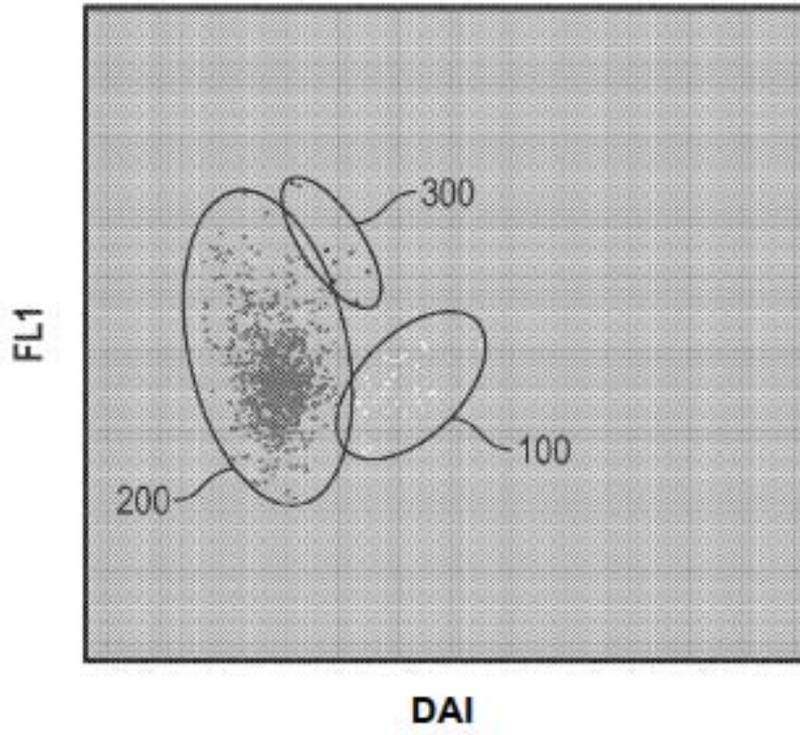


FIG. 4

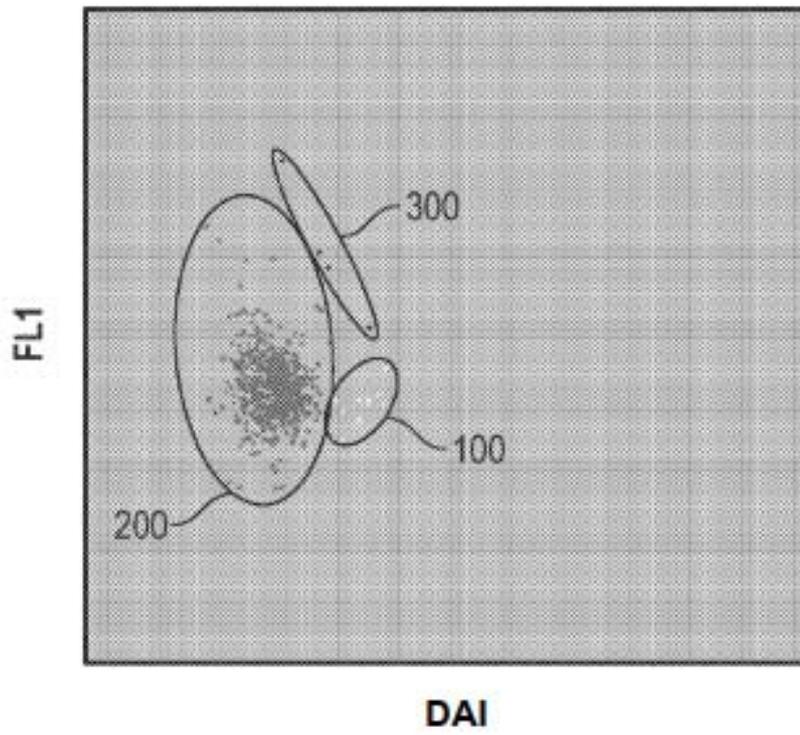


FIG. 5

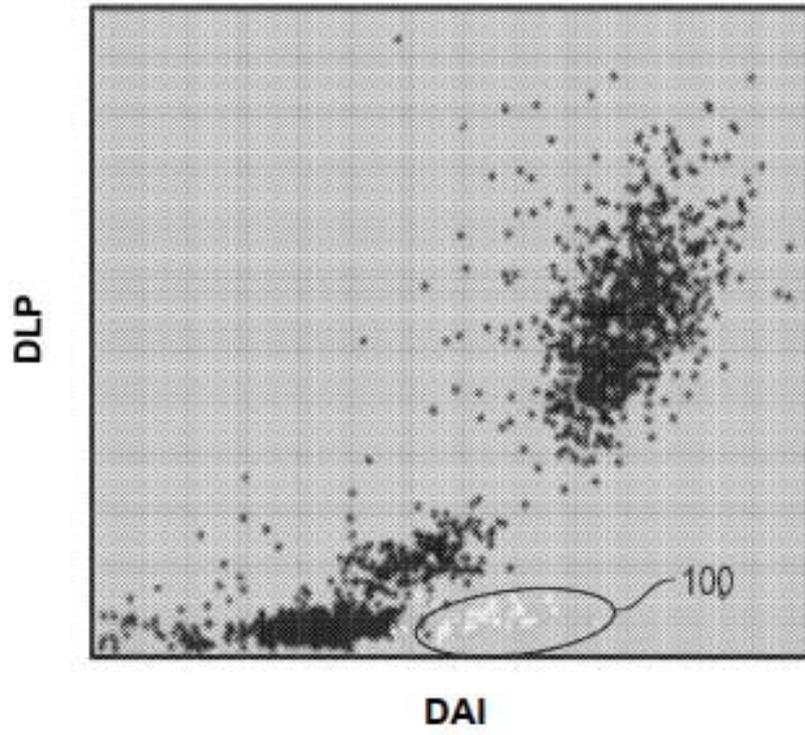


FIG. 6A

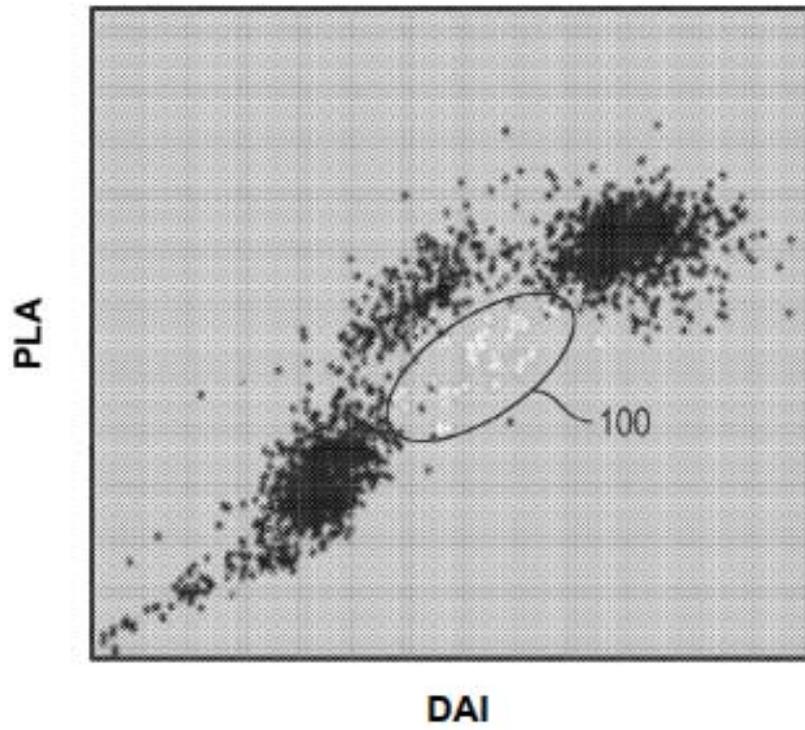


FIG. 6B

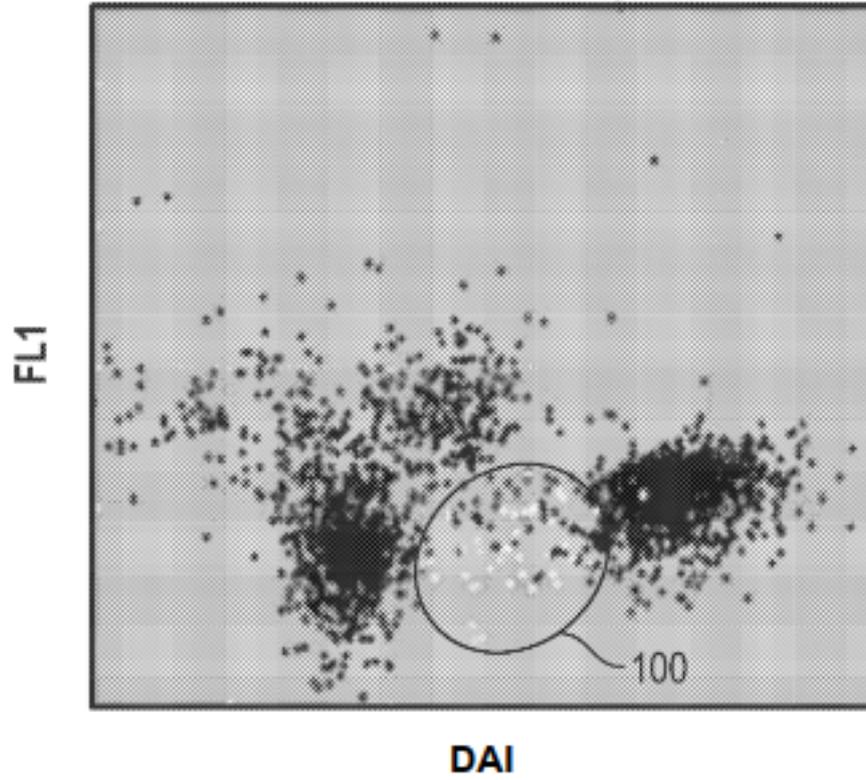


FIG. 6C

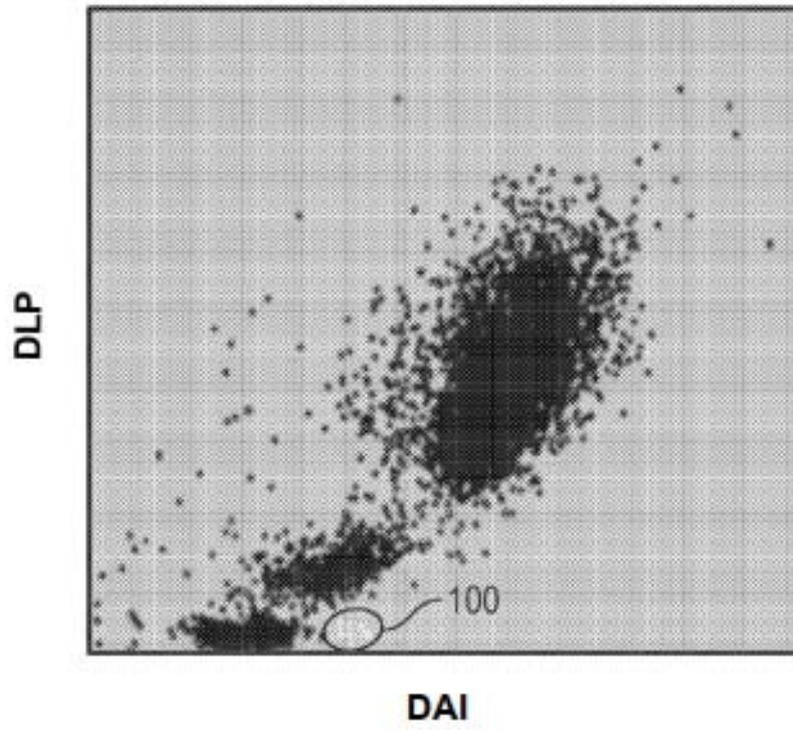


FIG. 7A

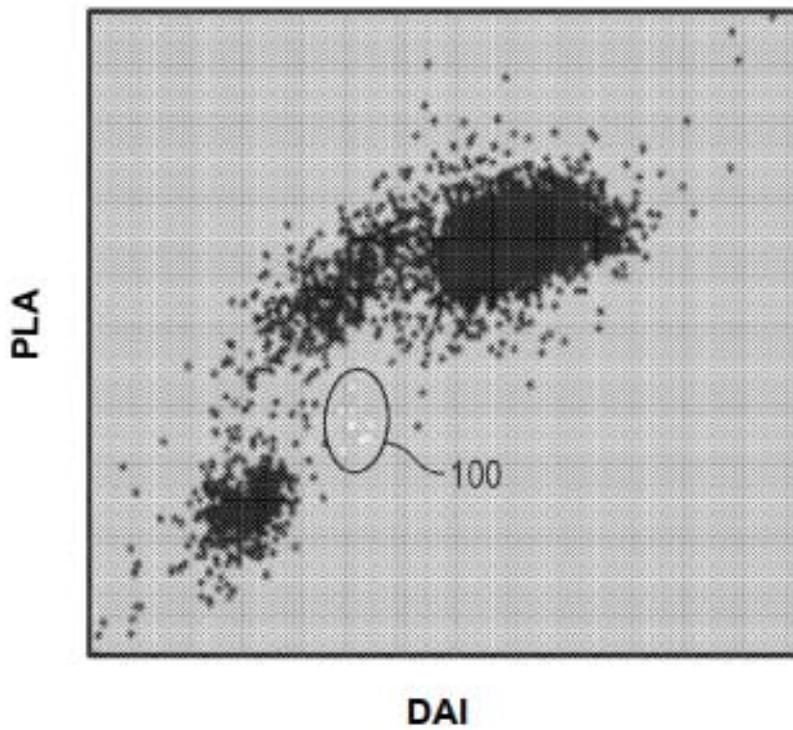


FIG. 7B

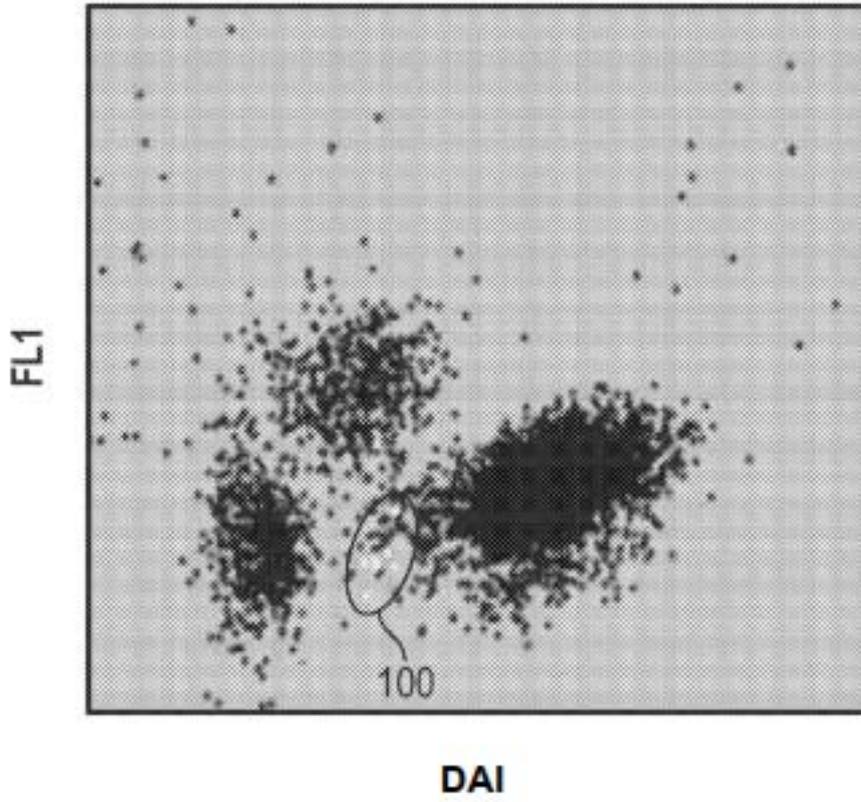


FIG. 7C

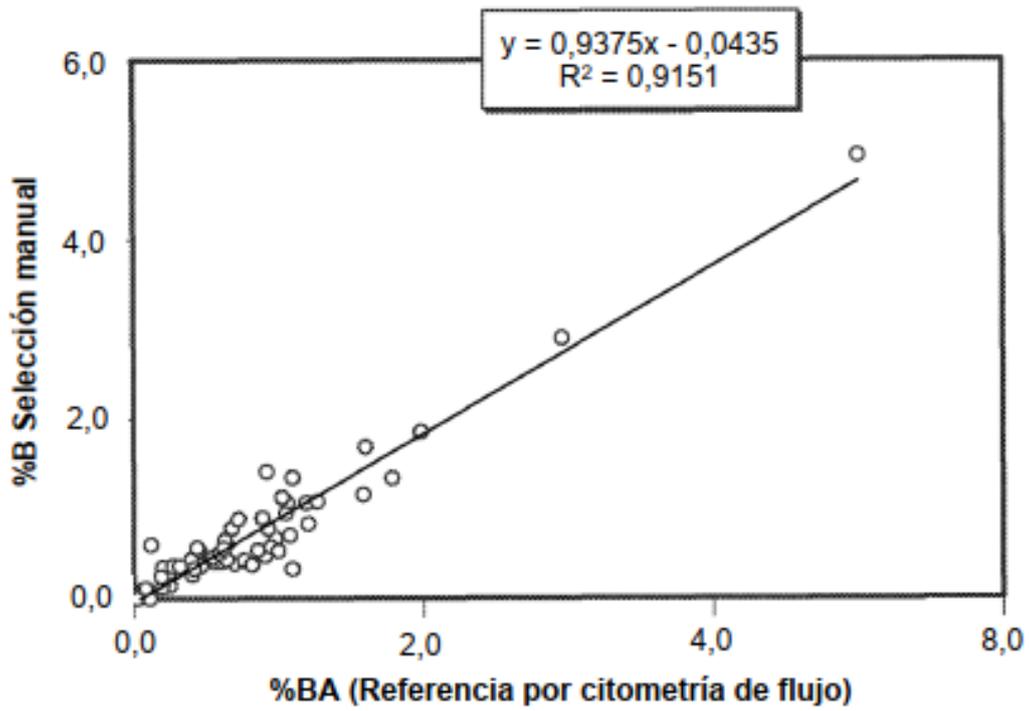


FIG. 8

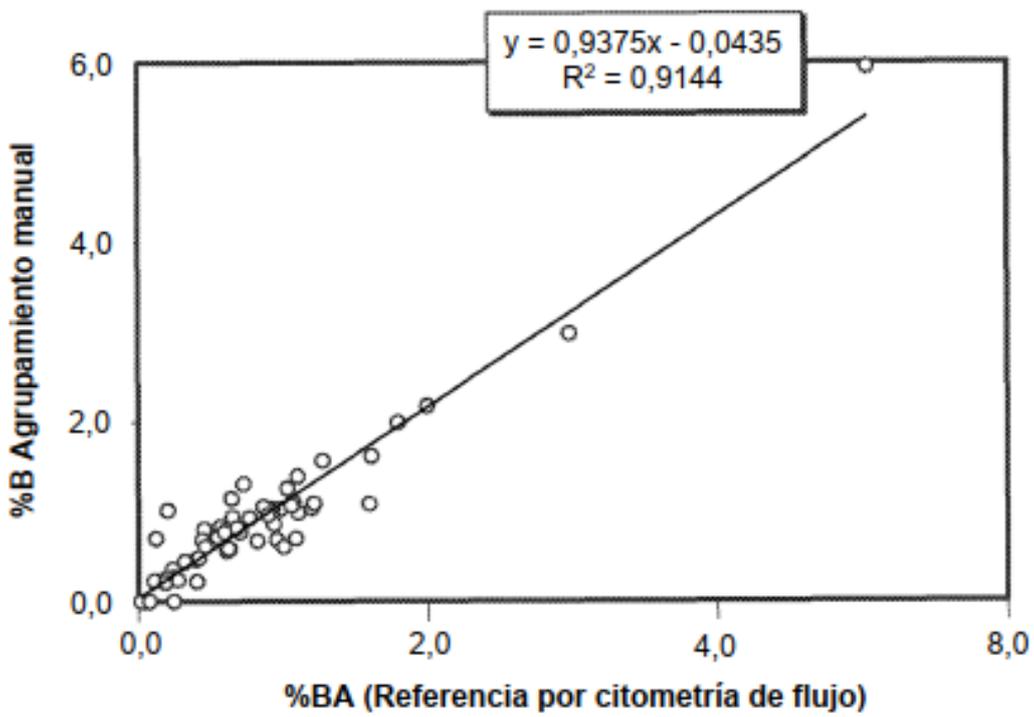


FIG. 9