

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 411**

51 Int. Cl.:

G01N 33/49 (2006.01)
G01N 21/47 (2006.01)
G01N 15/14 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 15/00 (2006.01)
G01N 15/10 (2006.01)
G01N 15/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013 PCT/US2013/077197**
87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14143335**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013 E 13878100 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 2972315**

54 Título: **Sistema de análisis óptico del volumen corpuscular medio de glóbulos rojos**

30 Prioridad:

12.03.2013 US 201361778051 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.07.2020

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (100.0%)
Dept. 377, Bldg AP6A-1, 100 Abbott Park Road
Abbott Park, IL 60064, US**

72 Inventor/es:

**WU, JIONG y
LIN, JI**

74 Agente/Representante:

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

ES 2 770 411 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

Sistema de análisis óptico del volumen corpuscular medio de glóbulos rojos

5 **Referencias cruzadas**

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de patente de EE.UU. n.º 61/778.051 presentada el martes, 12 de marzo de 2013.

10 **Introducción**

Los reactivos diluyentes tienen amplias aplicaciones en los análisis de hematología y sirven, por ejemplo, como reactivos diluyentes en la preparación de muestras de sangre para el análisis de glóbulos rojos (GR), plaquetas (PLT) y/o reticulocitos (RETC). Las soluciones diluyentes también sirven como, por ejemplo, soluciones de revestimiento, soluciones de enjuague, soluciones de mantenimiento que evitan el secado o la precipitación de sal en la instrumentación, y similares. Como tales, los reactivos diluyentes para su uso con analizadores de hematología son, con mucho, uno de los reactivos consumibles más grandes en el campo de la hematología.

En las configuraciones actuales, debido a las tasas de consumo, las soluciones diluyentes generalmente se almacenan en envases grandes que son pesados y difíciles de manipular. En algunos casos, por ejemplo, se utilizan envases de 20 litros para almacenar reactivos diluyentes. Dichos envases son grandes y pesados, y presentan problemas ergonómicos para quienes trabajan con ellos. Además, estos envases pesados son caros de transportar y ocupan grandes cantidades de espacio de almacenamiento. Por consiguiente, existe una clara necesidad de reactivos diluyentes más concentrados que eliminen, o al menos reduzcan la magnitud de estos problemas.

La presente invención aborda estas y otras necesidades.

El documento US 2004/018629 A1 divulga un analizador para realizar un análisis óptico de eritrocitos en una muestra de sangre completa. Se añade un reactivo diluyente a la muestra. Los volúmenes de partículas contados como eritrocitos se calculan en función de la intensidad de luz dispersa hacia adelante y se totalizan. El volumen medio de glóbulos rojos se calcula dividiendo el valor total por el número de partículas.

Sumario

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un sistema de acuerdo con la reivindicación 1 para realizar un análisis óptico del volumen corpuscular medio (VCM) de glóbulos sanguíneos en una muestra de sangre completa. El sistema se puede utilizar para preservar la morfología e integridad de los glóbulos sanguíneos, así como proporcionar integridad de la muestra y claridad óptica para facilitar el análisis óptico de las muestras de sangre. Los reactivos incluyen un tampón orgánico sin fosfato y un tensioactivo de esfericidad. El pH y la osmolalidad de los reactivos se ajustan a los intervalos deseados. Además, los reactivos se pueden simplemente diluir con agua desionizada antes de su uso.

En algunas realizaciones, el tampón orgánico sin fosfato es MES, MOPS, HEPES o imidazol. En algunas realizaciones, la concentración del tampón orgánico sin fosfato en el reactivo es al menos aproximadamente un 0,5 %. En algunas realizaciones, la concentración del tampón orgánico sin fosfato en el reactivo varía de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 20 %. En algunas realizaciones, la concentración del tampón orgánico sin fosfato en el reactivo es al menos aproximadamente 50 mM. En algunas realizaciones, la concentración del tampón orgánico sin fosfato en el reactivo varía de aproximadamente 50 a aproximadamente 1.500 mM. En algunas realizaciones, el tensioactivo de esfericidad es maltosido. En algunas realizaciones, la concentración del tensioactivo de esfericidad es al menos aproximadamente un 0,0002 %. En algunas realizaciones, la concentración del tensioactivo de esfericidad varía de aproximadamente un 0,0002 % a aproximadamente un 2,0 %. En algunas realizaciones, la concentración del tensioactivo de esfericidad es al menos aproximadamente 5 mg/l. En algunas realizaciones, la concentración del tensioactivo de esfericidad varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 1.000 mg/l. En algunas realizaciones, el componente de ajuste de osmolalidad es cloruro de sodio, cloruro de potasio o una mezcla de los mismos. En algunas realizaciones, la concentración del componente de ajuste de osmolalidad es al menos aproximadamente un 0,25 %. En algunas realizaciones, la concentración del componente de ajuste de osmolalidad varía de aproximadamente un 0,25 % a aproximadamente un 25 %. En algunas realizaciones, el reactivo comprende además un agente antimicrobiano. En algunas realizaciones, la concentración del agente antimicrobiano es al menos aproximadamente un 0,2 %. En algunas realizaciones, la concentración del agente antimicrobiano varía de aproximadamente un 0,02 % a aproximadamente un 0,1 %. En algunas realizaciones, el pH del reactivo varía de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0 unidades de pH. En algunas realizaciones, la osmolalidad de una solución de concentración IX del reactivo varía de aproximadamente 250 a aproximadamente 350 mOsm. En algunas realizaciones, la pluralidad de detectores incluye uno o más tubos fotomultiplicadores y/o fotodiodos de avalancha (FDA). En algunas realizaciones, la fuente de excitación es un láser.

En algunas realizaciones, los sistemas en cuestión incluyen además un subsistema para diluir el reactivo. En algunas

realizaciones, el subsistema está configurado para mezclar el reactivo diluido con la muestra de sangre. En algunas realizaciones, el subsistema está configurado para incubar la muestra de sangre con el reactivo durante un período de tiempo que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 segundos. En algunas realizaciones, el subsistema está configurado para incubar la muestra de sangre con el reactivo diluido a una temperatura que varía de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 50 °C. En algunas realizaciones, el subsistema está configurado para incubar la muestra de sangre con el reactivo diluido a temperatura ambiente.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para realizar un análisis óptico del volumen corpuscular medio (VCM) con un analizador de hematología automatizado, incluyendo el método: (a) diluir una muestra de sangre completa con una solución de trabajo de concentración IX de un reactivo de análisis hematológico, en donde el reactivo de análisis hematológico comprende: un tampón orgánico sin fosfato; un tensioactivo de esfericidad; y un componente de ajuste de osmolalidad, en donde el reactivo de hematología tiene suficiente claridad óptica para facilitar el análisis óptico de la muestra; (b) administrar la muestra incubada de la etapa (a) a una cubeta de lectura del analizador de hematología; (c) excitar la muestra incubada de la etapa (b) con una fuente de excitación a medida que la muestra atraviesa la cubeta de lectura; (d) recoger una pluralidad de señales de dispersión de luz de la muestra excitada; y (e) analizar las señales recogidas en la etapa (d) para determinar el VCM de la muestra. En algunas realizaciones, los métodos en cuestión implican realizar un análisis completo de la muestra de sangre, tal como, por ejemplo, un análisis del VCM, sin el uso de equipos de medición de impedancia eléctrica.

En algunas realizaciones, el tampón orgánico sin fosfato es MES, MOPS, HEPES o imidazol. En algunas realizaciones, la concentración del tampón orgánico sin fosfato en el reactivo varía de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 20 %. En algunas realizaciones, la concentración del tampón orgánico sin fosfato en el reactivo varía de aproximadamente 50 a aproximadamente 1.500 mM. En algunas realizaciones, el tensioactivo de esfericidad es maltosido. En algunas realizaciones, la concentración del tensioactivo de esfericidad varía de aproximadamente un 0,0002 % a aproximadamente un 2,0 %. En algunas realizaciones, la concentración del tensioactivo de esfericidad varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 1.000 mg/l. En algunas realizaciones, el componente de ajuste de osmolalidad es cloruro de sodio, cloruro de potasio o una mezcla de los mismos. En algunas realizaciones, la concentración del componente de ajuste de osmolalidad varía de aproximadamente un 0,25 % a aproximadamente un 25 %. En algunas realizaciones, el reactivo comprende además un agente antimicrobiano. En algunas realizaciones, la concentración del agente antimicrobiano varía de aproximadamente un 0,02 % a aproximadamente un 0,1 %. En algunas realizaciones, el pH del reactivo varía de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0 unidades de pH. En algunas realizaciones, la osmolalidad de una solución de concentración IX del reactivo varía de aproximadamente 250 a aproximadamente 350 mOsm.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona reactivos de hematología que incluyen: un tampón orgánico sin fosfato; un tensioactivo de esfericidad; y un componente de ajuste de osmolalidad, en donde el reactivo de hematología tiene suficiente claridad óptica para facilitar el análisis óptico de una muestra de sangre.

En algunas realizaciones, el tampón orgánico sin fosfato es MES, MOPS, HEPES o imidazol. En algunas realizaciones, la concentración del tampón orgánico sin fosfato en el reactivo es al menos aproximadamente un 0,5 %. En algunas realizaciones, la concentración del tampón orgánico sin fosfato en el reactivo varía de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 20 %. En algunas realizaciones, la concentración del tampón orgánico sin fosfato en el reactivo es al menos aproximadamente 50 mM. En algunas realizaciones, la concentración del tampón orgánico sin fosfato en el reactivo varía de aproximadamente 50 a aproximadamente 1.500 mM. En algunas realizaciones, el tensioactivo de esfericidad es maltosido. En algunas realizaciones, la concentración del tensioactivo de esfericidad es al menos aproximadamente un 0,0002 %. En algunas realizaciones, la concentración del tensioactivo de esfericidad varía de aproximadamente un 0,0002 % a aproximadamente un 2,0 %. En algunas realizaciones, la concentración del tensioactivo de esfericidad es al menos aproximadamente 5 mg/l. En algunas realizaciones, la concentración del tensioactivo de esfericidad varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 1.000 mg/l. En algunas realizaciones, el componente de ajuste de osmolalidad es cloruro de sodio, cloruro de potasio o una mezcla de los mismos. En algunas realizaciones, la concentración del componente de ajuste de osmolalidad es al menos aproximadamente un 0,25 %. En algunas realizaciones, la concentración del componente de ajuste de osmolalidad varía de aproximadamente un 0,25 % a aproximadamente un 25 %. En algunas realizaciones, el reactivo comprende además un agente antimicrobiano. En algunas realizaciones, la concentración del agente antimicrobiano es al menos aproximadamente un 0,02 %. En algunas realizaciones, la concentración del agente antimicrobiano varía de aproximadamente un 0,02 % a aproximadamente un 0,1 %. En algunas realizaciones, el pH del reactivo varía de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0 unidades de pH. En algunas realizaciones, la osmolalidad de una solución de concentración IX del reactivo varía de aproximadamente 250 a aproximadamente 350 mOsm.

60 Breve descripción de las figuras

Las figuras adjuntas, que se incorporan en el presente documento, forman parte de la memoria descriptiva. Junto con esta descripción escrita, las figuras sirven además para explicar los principios y permitir a una persona experta en la técnica relevante, fabricar y usar los reactivos, sistemas y métodos presentados en el presente documento. En las Figuras, los números de referencia similares indican elementos idénticos o funcionalmente similares.

La Figura 1 muestra un gráfico que correlaciona las mediciones de volumen corpuscular medio (VCM) tomadas usando una solución de trabajo IX de un reactivo de hematología descrito en el presente documento con las mediciones del VCM tomadas usando un reactivo estándar del CD Sapphire.

La Figura 2 muestra un gráfico que correlaciona las mediciones del VCM tomadas usando una solución de trabajo IX de un reactivo de hematología descrito en el presente documento con las mediciones del VCM tomadas usando un reactivo estándar del CD Ruby.

La Figura 3 es un gráfico que muestra el impacto de los cambios en la osmolalidad de un reactivo de hematología en las mediciones ópticas del VCM.

La Figura 4 es un gráfico que muestra el impacto de los cambios en el pH de un reactivo de hematología en las mediciones ópticas del VCM.

La Figura 5 es un gráfico que muestra el impacto de los cambios en la concentración de maltosido de un reactivo de hematología en las mediciones ópticas del VCM.

Descripción detallada

La presente invención proporciona un sistema para realizar un análisis óptico del volumen corpuscular medio (VCM) de glóbulos rojos en una muestra de sangre completa que se puede usar para preservar la morfología y uniformidad de los glóbulos sanguíneos, así como proporcionar integridad de la muestra y claridad óptica para facilitar el análisis óptico de muestras de sangre. Los reactivos en cuestión incluyen un tampón orgánico sin fosfato y un tensioactivo de esfericidad. El pH y la osmolalidad de los reactivos se ajustan a los intervalos deseados. Además, los reactivos se pueden reconstituir simplemente con agua desionizada antes de su uso.

Los glóbulos rojos (GR) son el tipo más común de glóbulos sanguíneos y, generalmente, tienen la forma de un disco bicóncavo que se aplana y comprime en el centro. La cuantificación de los GR en una muestra de sangre generalmente se logra utilizando un detector de impedancia que mide los cambios en la resistencia eléctrica de la muestra a medida que la muestra pasa a través de una pequeña abertura. A medida que cada GR individual pasa a través de la abertura, se detecta un cambio correspondiente en la impedancia, y la información se utiliza para contar el número de GR en la muestra. Dado que las mediciones de impedancia no implican datos ópticos recopilados de las células, la forma de los GR no es crítica para este análisis.

Los sistemas y métodos de análisis hematológicos generalmente se basan en mediciones de impedancia óptica y eléctrica para analizar una muestra de sangre y proporcionar un análisis diferencial de las células que contiene. Por ejemplo, muchos analizadores de hematología realizan mediciones de impedancia eléctrica en una muestra para determinar la cantidad de GR y PLT que están presentes en la muestra, y también realizan análisis ópticos para, por ejemplo, cuantificar glóbulos blancos (GB) y/u otros componentes en la sangre, y para proporcionar un análisis óptico adicional de GR y PLT. Por consiguiente, la mayoría de los analizadores de hematología deben incluir componentes de recolección de datos ópticos, así como componentes de medición de impedancia eléctrica para proporcionar un análisis completo de una muestra de sangre.

Los reactivos, sistemas y métodos de análisis de hematología de acuerdo con la presente divulgación proporcionan un análisis óptico de muestras de sangre y obvian la necesidad de que los analizadores de hematología incluyan componentes de medición de impedancia eléctrica. Como tal, los reactivos, sistemas y métodos de análisis de hematología en cuestión se pueden usar para llevar a cabo un análisis completo de una muestra de sangre usando solo componentes ópticos de recolección de datos, por ejemplo, sin usar mediciones de impedancia eléctrica.

REACTIVOS DE ANÁLISIS DE HEMATOLOGÍA

Los reactivos de análisis de hematología proporcionados en el presente documento generalmente están diseñados para facilitar el análisis completo de una muestra de sangre sin el uso de componentes de impedancia eléctrica. Por ejemplo, los reactivos de análisis de hematología proporcionados en el presente documento proporcionan una serie de características que facilitan el análisis óptico de GR y, por lo tanto, evitan la necesidad de mediciones de impedancia eléctrica. Los reactivos de hematología en cuestión proporcionan la claridad óptica que es necesaria para el análisis óptico de muestras de sangre, y también proporcionan la dispersión de GR para que se puedan analizar utilizando técnicas ópticas. Los reactivos de hematología en cuestión también pueden estar altamente concentrados mientras mantienen sus características funcionales, lo que facilita una mejor capacidad de fabricación, almacenamiento y manipulación de los reactivos.

Tampón orgánico sin fosfato

Los reactivos de hematología en cuestión generalmente incluyen uno o más tampones orgánicos sin fosfato. El uso de estos tampones proporciona una solubilidad mejorada de otros componentes del reactivo, tales como, por ejemplo, cloruro de sodio como osmolito primario. Los componentes del tampón a base de fosfato, tal como la solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés), generalmente causan problemas de solubilidad a altas concentraciones. Los tampones orgánicos sin fosfato, por el contrario, son generalmente inertes a otros componentes reactivos, tales como las sales y, por lo tanto, permiten que se formulen reactivos más concentrados mientras se mantienen las propiedades funcionales, tal como, por ejemplo, la claridad óptica. Los tampones orgánicos sin fosfato

de acuerdo con algunas realizaciones de la invención generalmente tienen una capacidad de tamponamiento eficaz entre pH 6,0 y 8,0. Los ejemplos de tampones orgánicos sin fosfato adecuados incluyen, pero sin limitación, tampón de ácido 2-(N-morfolina) etanosulfónico (MES), tampón de ácido 3-(N-morfolina) propanosulfónico (MOPS), imidazol y tampón N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico) (HEPES).

5 En algunas realizaciones, la concentración del tampón orgánico sin fosfato en el reactivo de hematología varía de aproximadamente 50, a aproximadamente 75, a aproximadamente 100, a aproximadamente 125, a aproximadamente 150, a aproximadamente 175, a aproximadamente 200, a aproximadamente 225 o a aproximadamente 250, a aproximadamente 275, a aproximadamente 300, a aproximadamente 325, a aproximadamente 350, a
10 aproximadamente 375, a aproximadamente 400, a aproximadamente 425, a aproximadamente 450, a aproximadamente 475, a aproximadamente 500, a aproximadamente 525, a aproximadamente 550, a aproximadamente 575, a aproximadamente 600, a aproximadamente 625, a aproximadamente 650, a aproximadamente 675, a aproximadamente 700, a aproximadamente 725, a aproximadamente 750, a aproximadamente 775, a aproximadamente 800, a aproximadamente 825, a aproximadamente 850, a
15 aproximadamente 875, a aproximadamente 900, a aproximadamente 925, a aproximadamente 950, a aproximadamente 1000, a aproximadamente 1050, a aproximadamente 1100, a aproximadamente 1150, a aproximadamente 1200, a aproximadamente 1250, a aproximadamente 1300, a aproximadamente 1350, a aproximadamente 1400, a aproximadamente 1450, a aproximadamente 1500 mM o más.

20 En algunas realizaciones, la concentración del tampón orgánico sin fosfato en el reactivo de hematología varía de aproximadamente un 0,5 %, a aproximadamente un 1,0 %, a aproximadamente un 1,5 %, a aproximadamente un 2,0 %, a aproximadamente un 2,5 %, a aproximadamente un 3,0 %, a aproximadamente un 3,5 %, a aproximadamente un 4,0 %, a aproximadamente un 4,5 %, a aproximadamente un 5,0 %, a aproximadamente un 5,5 % o a aproximadamente un 6,0 %, a aproximadamente un 6,5 %, a aproximadamente un 7,0 %, a aproximadamente un 7,5 %, a aproximadamente un 8,0 %, a aproximadamente un 8,5 %, a aproximadamente un 9,0 %, a aproximadamente un 9,5 %, a aproximadamente un 10,0 %, a aproximadamente un 10,5 %, a aproximadamente un 11,0 %, a aproximadamente un 11,5 %, a aproximadamente un 12,0 %, a aproximadamente un 12,5 %, a aproximadamente un 13,0 %, a aproximadamente un 13,5 %, a aproximadamente un 14,0 %, a aproximadamente un 14,5 %, a aproximadamente un 15,0 %, a aproximadamente un 15,5 %, a aproximadamente un 16,0 %, a aproximadamente un 16,5 %, a aproximadamente un 17,0 %, a aproximadamente un 17,5 %, a aproximadamente un 18,0 %, a aproximadamente un 18,5 %, a aproximadamente un 19,0 %, a aproximadamente un 19,5 %, a aproximadamente un 20,0 % o más.

35 **Tensioactivo de esfericidad**

Los reactivos de hematología en cuestión generalmente incluyen uno o más tensioactivos de esfericidad que hacen a los GR esféricos en la muestra de sangre para facilitar su análisis óptico. El uso de dichos tensioactivos mantiene una morfología de células esféricas en muestras de sangre diluidas y facilita los análisis ópticos, por ejemplo, el análisis óptico del volumen corpuscular medio (VCM). Los ejemplos de tensioactivos de esfericidad adecuados incluyen, pero
40 sin limitación, N-dodecil-B-D-maltosido (maltosido).

En algunas realizaciones, la concentración del tensioactivo de esfericidad en el reactivo de hematología varía de aproximadamente un 0,0002 %, a aproximadamente un 0,0005 %, a aproximadamente un 0,001 %, a aproximadamente un 0,005 %, a aproximadamente un 0,01 %, a aproximadamente un 0,05 %, a aproximadamente un 0,1 %, a aproximadamente un 0,5 %, a aproximadamente un 1,0 %, a aproximadamente un 1,25 %, a aproximadamente un 1,5 %, a aproximadamente un 1,75 % o a aproximadamente un 2,0 % o más. En algunas realizaciones, la concentración del tensioactivo de esfericidad varía de aproximadamente 5, a aproximadamente 25, a aproximadamente 50, a aproximadamente 75, a aproximadamente 100, a aproximadamente 200, a aproximadamente 300, a aproximadamente 400, a aproximadamente 500, a aproximadamente 600, a aproximadamente 700, a
50 aproximadamente 800, a aproximadamente 900, a aproximadamente 1.000 mg/l o más.

Componentes adicionales

Los reactivos de hematología de acuerdo con las realizaciones de la invención pueden contener componentes adicionales, tales como, por ejemplo, reactivos quelantes, sales u osmolitos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un reactivo de hematología puede contener un reactivo quelante para, por ejemplo, evitar la aglomeración y/o agregación de plaquetas. Un ejemplo de un reactivo quelante adecuado es el etilendiaminotetraacetato (EDTA) o la sal disódica de EDTA.

60 En algunas realizaciones, un reactivo quelante puede estar presente en un reactivo de hematología a una concentración que varía de aproximadamente un 0,1 %, a aproximadamente un 0,2 %, a aproximadamente un 0,3 %, a aproximadamente un 0,4 %, a aproximadamente un 0,5 % o más.

En algunas realizaciones, un reactivo de hematología puede contener un componente de ajuste de osmolalidad, tal como, por ejemplo, una sal. La inclusión de una o más sales en el reactivo de hematología sirve para ajustar la osmolalidad del reactivo para un rendimiento óptimo. Los ejemplos adecuados de sales incluyen, pero sin limitación,

cloruro de sodio y cloruro de potasio.

5 En algunas realizaciones, un componente de ajuste de osmolalidad (por ejemplo, una sal) puede estar presente en un reactivo de hematología a una concentración que varía de aproximadamente un 0,25 %, a aproximadamente un 0,5 %, a aproximadamente un 0,75 %, a aproximadamente un 1 %, a aproximadamente un 5 %, a aproximadamente un 10 %, a aproximadamente un 15 %, a aproximadamente un 20 % o a aproximadamente un 25 % o más.

10 Los reactivos de hematología de acuerdo con algunas realizaciones de la invención pueden tener un valor de pH que se ajusta para un rendimiento óptimo del reactivo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un reactivo de hematología puede tener un valor de pH que varía de aproximadamente 6,0, a aproximadamente 6,25, a aproximadamente 6,5, a aproximadamente 6,75, a aproximadamente 7,0, a aproximadamente 7,25, a aproximadamente 7,5, a aproximadamente 7,75, a aproximadamente 8,0 unidades de pH. En algunas realizaciones, el pH de un reactivo de hematología se puede ajustar usando reactivos estándar de ajuste de pH, por ejemplo, ácidos o bases concentrados.

15 Los reactivos de hematología de acuerdo con algunas realizaciones de la invención pueden tener una osmolalidad que se ajusta para un rendimiento óptimo del reactivo. Antes de su dilución a una concentración de trabajo, los reactivos de hematología, de acuerdo con algunas realizaciones, pueden tener una osmolalidad que es hipertónica. Después de la dilución del reactivo de hematología a una concentración de trabajo IX, en algunas realizaciones, el reactivo de hematología puede tener una osmolalidad que varía de aproximadamente 250, a aproximadamente 260, a aproximadamente 270, a aproximadamente 280, a aproximadamente 290, a aproximadamente 300, a aproximadamente 310, a aproximadamente 320, a aproximadamente 330, a aproximadamente 340, a aproximadamente 350 mOsm o más.

25 En algunas realizaciones, un reactivo de hematología puede incluir al menos un conservante y/o al menos un agente antimicrobiano para prevenir el crecimiento microbiano en el reactivo. Los ejemplos adecuados de agentes antimicrobianos incluyen, pero sin limitación, Triadine™ o equivalente del mismo. En algunas realizaciones, la concentración del reactivo antimicrobiano varía de aproximadamente un 0,02 %, a aproximadamente un 0,04 %, a aproximadamente un 0,06 %, a aproximadamente un 0,08 %, a aproximadamente un 0,1 % o más.

30 En algunas realizaciones, las concentraciones de los diversos componentes en el reactivo de hematología se equilibran y optimizan para facilitar la incorporación solo de cantidades mínimas de determinados componentes mientras se mantienen las propiedades funcionales del reactivo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la concentración de sales y tampones orgánicos sin fosfato incluidos en el reactivo facilitan el uso de cantidades más bajas del tensioactivo de esfericidad. Este equilibrio de los componentes ayuda a reducir el coste total del reactivo y mejorar la capacidad de fabricación del reactivo.

40 En algunas realizaciones, las concentraciones de los diversos componentes en el reactivo de hematología se equilibran para facilitar la manipulación del reactivo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las concentraciones de cada componente se controlan cuidadosamente para que el reactivo mantenga sus propiedades funcionales y mantenga la solubilidad de los componentes, incluso cuando el reactivo se somete a uno o más ciclos de congelación/descongelación.

Formulaciones de ejemplo:

45 Varios ejemplos de formulaciones de los reactivos de hematología en cuestión se proporcionan a continuación. Las formulaciones proporcionadas a continuación simplemente sirven como ejemplos, y de ninguna manera son limitantes. Cualquiera de una variedad de combinaciones de los componentes descritos en el presente documento puede utilizarse en reactivos de hematología de acuerdo con realizaciones de la invención.

50 **Formulación 1 de ejemplo:**

Componente	Concentración
Sal disódica de EDTA	0,30 %
Cloruro de potasio	0,45 %
Cloruro de sodio	15,70 %
Triadine 10	0,06 %
N-Dodecil-B-D, Maltosido	0,02 %
Imidazol	0,60 %

La formulación anterior se puede diluir en 15X para formar un reactivo de trabajo IX.

55

Formulación 2 de ejemplo:

Componente	Concentración
Sal disódica de EDTA	0,30 %
Cloruro de potasio	0,45 %
Cloruro de sodio	15,70 %
Triadine 10	0,06 %
N-Dodecil-B-D, Maltosido	0,02 %
MES	2,30 %

La formulación anterior se puede diluir en 15X para formar un reactivo de trabajo IX.

5

Formulación 3 de ejemplo:

Componente	Concentración
Sal disódica de EDTA	0,30 %
Cloruro de potasio	0,45 %
Cloruro de sodio	15,70 %
Triadine 10	0,06 %
N-Dodecil-B-D, Maltosido	0,02 %
HEPES	3,50 %

La formulación anterior se puede diluir en 15X para formar un reactivo de trabajo IX.

10

Formulación 4 de ejemplo:

Componente	Concentración
Sal disódica de EDTA	0,40 %
Cloruro de potasio	0,30 %
Cloruro de sodio	21,24 %
Triadine 10	0,06 %
N-Dodecil-B-D, Maltosido	0,02 %
Imidazol	0,80 %

La formulación anterior se puede diluir en 20X para formar un reactivo de trabajo IX.

15

Formulación 5 (A-I) de ejemplo:

A continuación se proporciona una serie de formulaciones de reactivos (A-I), en donde la concentración de cloruro de sodio se varió como se indica:

20

Componente	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Sal disódica de EDTA	0,40 %	0,40 %	0,40 %	0,40 %	0,40 %	0,40 %	0,40 %	0,40 %	0,40 %
Cloruro de potasio	0,30 %	0,30 %	0,30 %	0,30 %	0,30 %	0,30 %	0,30 %	0,30 %	0,30 %
Cloruro de sodio	20,39 %	20,60 %	20,82 %	21,03 %	21,24 %	21,45 %	21,66 %	21,88 %	22,09 %
Triadine 10	0,06 %	0,06 %	0,06 %	0,06 %	0,06 %	0,06 %	0,06 %	0,06 %	0,06 %
N-Dodecil-B-D, Maltosido	0,02 %	0,02 %	0,02 %	0,02 %	0,02 %	0,02 %	0,02 %	0,02 %	0,02 %
Imidazol	0,80 %	0,80 %	0,80 %	0,80 %	0,80 %	0,80 %	0,80 %	0,80 %	0,80 %
Osmolalidad (mOsmo/kg) de reactivo de trabajo IX	313	317	319	322	322	325	329	331	335

Formulación 6 (A-G) de ejemplo:

A continuación se proporciona una serie de formulaciones de reactivos (A-G), en donde el valor de pH del reactivo varió como se indica. Se añadió HCl concentrado a cada formulación en una cantidad suficiente para ajustar el pH a los valores indicados a continuación.

5

Componente	A	B	C	D	E	F	G
Sal disódica de EDTA	0,40 %	0,40 %	0,40 %	0,40 %	0,40 %	0,40 %	0,40 %
Cloruro de potasio	0,30 %	0,30 %	0,30 %	0,30 %	0,30 %	0,30 %	0,30 %
Cloruro de sodio	21,24 %	21,24 %	21,24 %	21,24 %	21,24 %	21,24 %	21,24 %
Triadine 10	0,06 %	0,06 %	0,06 %	0,06 %	0,06 %	0,06 %	0,06 %
N-Dodecil-B-D, Maltosido	0,02 %	0,02 %	0,02 %	0,02 %	0,02 %	0,02 %	0,02 %
Imidazol	0,80 %	0,80 %	0,80 %	0,80 %	0,80 %	0,80 %	0,80 %
pH	6,95	7,20	7,35	7,45	7,55	7,70	7,95

Formulación 7 (A-G) de ejemplo:

10 A continuación se proporciona una serie de formulaciones de reactivos (A-G), en donde la concentración del maltosido en el reactivo varió como se indica:

Componente	A	B	C	D	E	F	G
Sal disódica de EDTA	0,40 %	0,40 %	0,40 %	0,40 %	0,40 %	0,40 %	0,40 %
Cloruro de potasio	0,30 %	0,30 %	0,30 %	0,30 %	0,30 %	0,30 %	0,30 %
Cloruro de sodio	21,24 %	21,24 %	21,24 %	21,24 %	21,24 %	21,24 %	21,24 %
Triadine 10	0,06 %	0,06 %	0,06 %	0,06 %	0,06 %	0,06 %	0,06 %
N-Dodecil-B-D, Maltosido	- 5 %	- 2,5 %	- 1 %	0,0 %	+ 1 %	+ 2,5 %	+ 5 %
Imidazol	0,80 %	0,80 %	0,80 %	0,80 %	0,80 %	0,80 %	0,80 %

SISTEMAS Y MÉTODOS

15

Los reactivos de hematología divulgados en el presente documento generalmente encuentran uso en el análisis óptico de muestras de sangre usando sistemas de análisis de hematología y métodos relacionados. En determinadas realizaciones, los reactivos de hematología en cuestión encuentran uso en sistemas y métodos de análisis de hematología que están diseñados para medir ópticamente los GR en una muestra de sangre. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los sistemas en cuestión pueden usarse para realizar un análisis de muestra de sangre completo sin el uso de mediciones de impedancia eléctrica, por ejemplo, usando solo mediciones ópticas.

20

En algunas realizaciones, los reactivos de hematología en cuestión se diluyen con un reactivo adecuado, por ejemplo, agua desionizada, antes de su uso en el análisis de una muestra de sangre. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un reactivo de hematología en cuestión puede diluirse en un factor de aproximadamente 2X, a aproximadamente 5X, a aproximadamente 10X, a aproximadamente 15X, a aproximadamente 20X o a aproximadamente 25X para formar una solución de trabajo del reactivo que tiene una concentración de IX.

25

En algunas realizaciones, un reactivo de hematología en cuestión puede diluirse a una concentración apropiada usando técnicas de mezcla simples, por ejemplo, en donde el reactivo se mezcla con agua desionizada en un envase de un tamaño adecuado y se mezcla mecánicamente, se agita, etc. En algunas realizaciones, la mezcla del reactivo de hematología con agua desionizada se puede lograr usando, por ejemplo, un dispositivo de mezcla electrónica.

30

En algunas realizaciones, se puede crear una solución de trabajo del reactivo antes de su uso en un analizador de hematología. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se forma una solución de trabajo que tiene una concentración de IX del reactivo de hematología como se describe anteriormente, y la solución de trabajo IX se introduce luego o se acopla de forma fluida a un analizador de hematología para usar en el análisis de una muestra de sangre. De acuerdo con la invención reivindicada, una forma concentrada de los reactivos de hematología en cuestión se acopla de forma fluida al analizador de hematología, y el analizador puede realizar una dilución del reactivo de hematología antes o simultáneamente con el análisis de una muestra de sangre.

35

40

En determinadas realizaciones, una solución de trabajo de concentración IX de un reactivo de hematología en cuestión se mezcla con una muestra de sangre, y la muestra de sangre se analiza en un analizador de hematología automatizado que genera una pluralidad de datos ópticos de la muestra dirigiendo una fuente de luz hacia la muestra a medida que pasa a través de una cubeta de lectura. En algunas realizaciones, el analizador de hematología puede incluir un procesador que contiene instrucciones que, cuando se ejecutan por el procesador, hacen que el analizador de hematología lleve a cabo una serie de etapas que implican mover una muestra a través de la cubeta de lectura del analizador, dirigir la luz hacia la cubeta de lectura, reunir una pluralidad de datos ópticos de la muestra y analizar los

45

datos ópticos para determinar, por ejemplo, una medición del VCM de la muestra basada en los datos ópticos.

Ejemplos, que no forman parte de la invención reivindicada, de métodos para analizar una muestra de sangre para determinar el VCM de la muestra utilizando técnicas ópticas implican: (a) poner en contacto una muestra de sangre con una solución de trabajo IX de un reactivo que comprende al menos un tampón orgánico sin fosfato, al menos un tensioactivo de esfericidad y uno o más componentes de ajuste de la osmolalidad e incubar la muestra de sangre con el reactivo durante un período de tiempo que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 segundos a una temperatura que varía de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 50 °C, tal como, por ejemplo, temperatura ambiente; (b) administrar la muestra de la etapa (a) a una cubeta de lectura del analizador de hematología; (c) excitar la muestra de la etapa (b) con una fuente de excitación a medida que la muestra atraviesa la cubeta de lectura; (d) recoger una pluralidad de señales de dispersión de luz de la muestra excitada; y (e) analizar las señales recogidas en la etapa (d) para determinar el VCM de la muestra.

Ejemplos que no forman parte de la invención reivindicada:

Ejemplo 1: Comparación de mediciones del VCM utilizando diferentes reactivos

Las mediciones del VCM se tomaron en una muestra de sangre normal usando un reactivo de hematología en cuestión que se diluyó de 15X o 20X para formar una solución de concentración IX. Las mediciones del VCM se compararon con las mediciones del VCM que se tomaron en la misma muestra de sangre normal usando un reactivo del CD Sapphire o CD Ruby. Los resultados se muestran en la Figura 1 y la Figura 2. Los resultados muestran que los reactivos de hematología en cuestión funcionan igualmente bien utilizando sistemas de impedancia o de detección óptica.

Ejemplo 2: Impacto de la variación de la osmolalidad en mediciones ópticas del VCM

Se formuló una serie de reactivos que tienen diferentes concentraciones de cloruro de sodio para ajustar la osmolalidad final del reactivo de trabajo cuando se usa en un analizador de hematología para medir el VCM. Las concentraciones de los componentes en los reactivos se muestran en las formulaciones 5A-I de ejemplo. Los reactivos se utilizaron luego para medir el VCM de una muestra de sangre normal en un analizador de hematología. Los resultados se muestran en la Figura 3, e indican que las formulaciones funcionan como se espera en el intervalo de osmolalidad probado.

Ejemplo 3: Impacto de la variación del pH en mediciones ópticas del VCM

Se formuló una serie de reactivos con diferentes valores de pH. Las concentraciones de los componentes en los reactivos se muestran en las formulaciones 6A-G de ejemplo. Los reactivos se utilizaron luego para medir el VCM de una muestra de sangre normal en un analizador de hematología. Los resultados se muestran en la Figura 4, e indican que las formulaciones funcionan como se espera en el intervalo de pH probado.

Ejemplo 4: Impacto de la variación de maltosido en mediciones ópticas del VCM

Se formuló una serie de reactivos con diferentes concentraciones de maltosido. Las concentraciones de los componentes en los reactivos se muestran en las formulaciones 7A-G de ejemplo. Los reactivos se utilizaron luego para medir el VCM de una muestra de sangre normal en un analizador de hematología. Los resultados se muestran en la Figura 5, e indican que las formulaciones funcionan como se espera en el intervalo de concentración de maltosido probado.

La descripción anterior de la invención se ha presentado con fines ilustrativos y descriptivos. No pretende ser exhaustiva o limitar la invención a la forma precisa divulgada. Otras modificaciones y variaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas pueden ser posibles a la luz de las enseñanzas anteriores. Las realizaciones se eligieron y describieron para explicar mejor los principios de la invención y su aplicación práctica y, de ese modo, permitir que otros expertos en la técnica utilicen mejor la invención en diversas realizaciones y diversas modificaciones que sean adecuadas para el uso particular contemplado. Se pretende que las reivindicaciones adjuntas se interpreten para incluir otras realizaciones alternativas de la invención.

La descripción detallada anterior se refiere a los dibujos adjuntos que ilustran una o más realizaciones ejemplares. Otras realizaciones son posibles. Se pueden hacer modificaciones a la realización descrita sin apartarse del alcance de la presente invención. Por lo tanto, la descripción detallada no pretende ser limitativa. Además, las secciones Sumario y Resumen pueden exponer una o más, pero no todas las realizaciones ejemplares de la presente invención según lo contemplado por el (los) inventor(es) y, por lo tanto, no pretenden limitar la presente invención y las reivindicaciones adjuntas de ninguna manera.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema para realizar un análisis óptico del volumen corpuscular medio (VCM) de glóbulos rojos en una muestra de sangre completa, comprendiendo el sistema:

5 (a) un analizador de hematología, comprendiendo el analizador de hematología:

una cubeta de lectura;
 una fuente de excitación colocada para excitar partículas dentro de la muestra de sangre a medida que pasa a
 10 través de la cubeta de lectura;
 una pluralidad de detectores que incluyen (1) un detector de pérdida de luz axial colocado para medir la pérdida de luz axial de la muestra de sangre excitada, (2) un detector de dispersión de ángulo intermedio colocado para medir dispersiones de ángulo intermedio de la muestra de sangre excitada, (3) un detector de dispersión lateral polarizada colocado para medir dispersiones laterales polarizadas de gran ángulo de la muestra de sangre excitada, (4) un detector de dispersión lateral despolarizado colocado para medir dispersiones laterales despolarizadas de gran ángulo de la muestra de sangre excitada; y un procesador configurado para:

(I) recibir las mediciones de (1) pérdida de luz axial, (2) dispersiones de ángulo intermedio, (3) dispersiones laterales polarizadas de gran ángulo, (4) dispersiones laterales despolarizadas de gran ángulo, y
 20 (II) realizar un análisis del VCM de glóbulos rojos de la muestra de sangre, basado en una pluralidad de datos ópticos recibidos de los detectores y sin el uso de componentes de impedancia eléctrica; y

(b) un reactivo de hematología acoplado de forma fluida al analizador de hematología para el análisis óptico del VCM de glóbulos rojos, comprendiendo el reactivo de hematología:

25 un tampón orgánico sin fosfato;
 un tensioactivo de esfericidad; y
 un componente de ajuste de osmolalidad,

30 en donde el reactivo de hematología tiene suficiente claridad óptica para facilitar el análisis óptico del VCM de la muestra.

2. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tampón orgánico sin fosfato es ácido 2-(N-morfolina) etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolina) propanosulfónico (MOPS), N-(2-hidroxi)etil piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico) (HEPES) o imidazol.

3. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración del tampón orgánico sin fosfato en el reactivo es al menos un 0,5 %.

4. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración del tampón orgánico sin fosfato en el reactivo es al menos 50 mM.

5. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tensioactivo de esfericidad es maltosido.

6. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración del tensioactivo de esfericidad es al menos un 0,0002 %.

7. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración del tensioactivo de esfericidad varía de un 0,0002 % a un 2,0 %.

8. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración del tensioactivo de esfericidad es al menos 5 mg/l.

9. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración del tensioactivo de esfericidad varía de 5 a 1.000 mg/l.

10. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el componente de ajuste de osmolalidad es cloruro de sodio, cloruro de potasio o una mezcla de los mismos.

11. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración del componente de ajuste de osmolalidad es al menos un 0,25 %.

12. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración del componente de ajuste de osmolalidad varía de un 0,25 % a un 25 %.

ES 2 770 411 T3

13. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el pH del reactivo varía de 6,0 a 8,0 unidades de pH.
- 5 14. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la osmolalidad de una solución de concentración IX del reactivo varía de 250 a 350 mOsm.
15. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la pluralidad de detectores incluye uno o más tubos fotomultiplicadores y/o fotodiodos de avalancha (FDA).
- 10 16. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la fuente de excitación es un láser.
- 15 17. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un subsistema para diluir el reactivo.
18. El sistema de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el subsistema está configurado para mezclar el reactivo diluido con la muestra de sangre.
- 20 19. El sistema de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el subsistema está configurado para incubar la muestra de sangre con el reactivo durante un período de tiempo que varía de 1 a 30 segundos.
20. El sistema de acuerdo con la reivindicación 18 o 19, en donde el subsistema está configurado para incubar la muestra de sangre con el reactivo diluido a una temperatura que varía de 15 °C a 50 °C.
- 25 21. El sistema de acuerdo con la reivindicación 18, 19 o 20, en donde el subsistema está configurado para incubar la muestra de sangre con el reactivo diluido a temperatura ambiente.

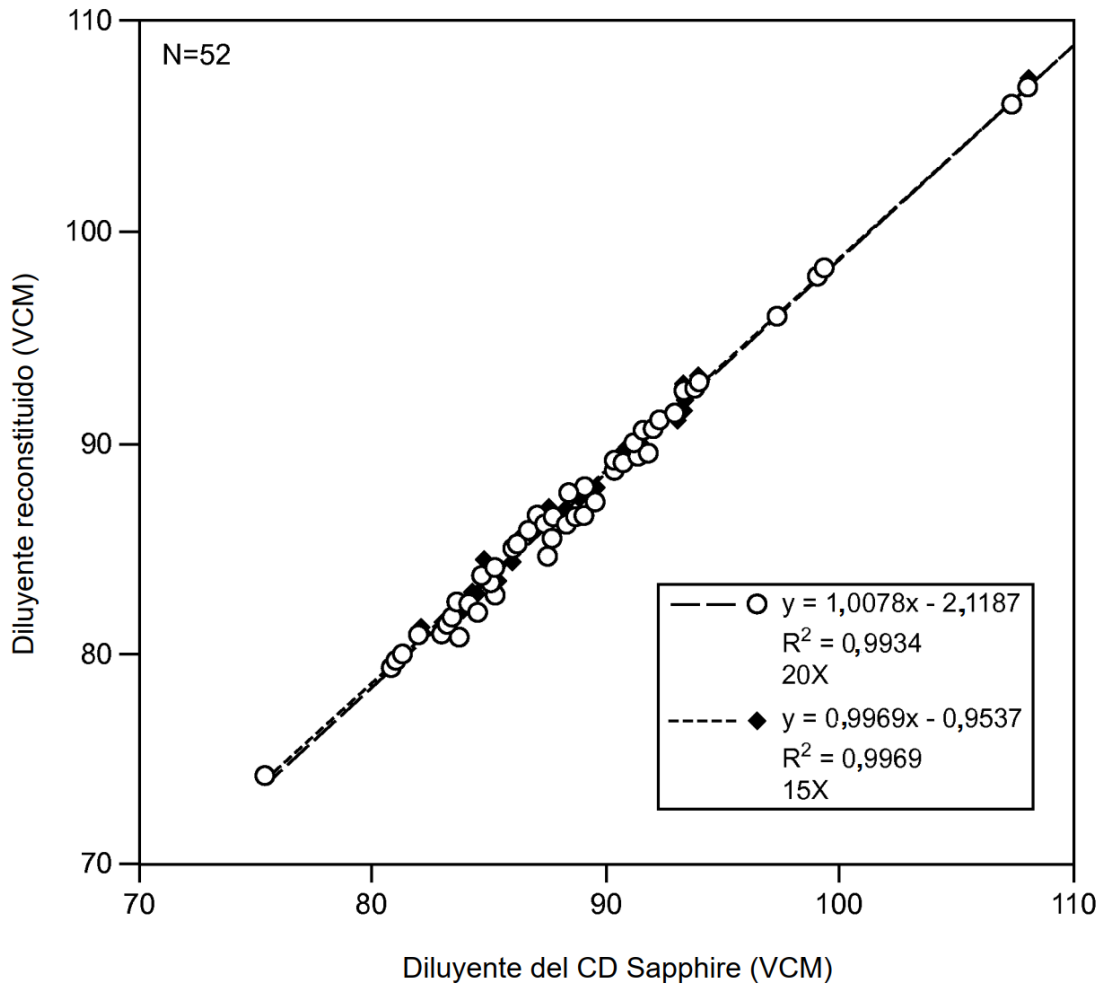


FIG. 1

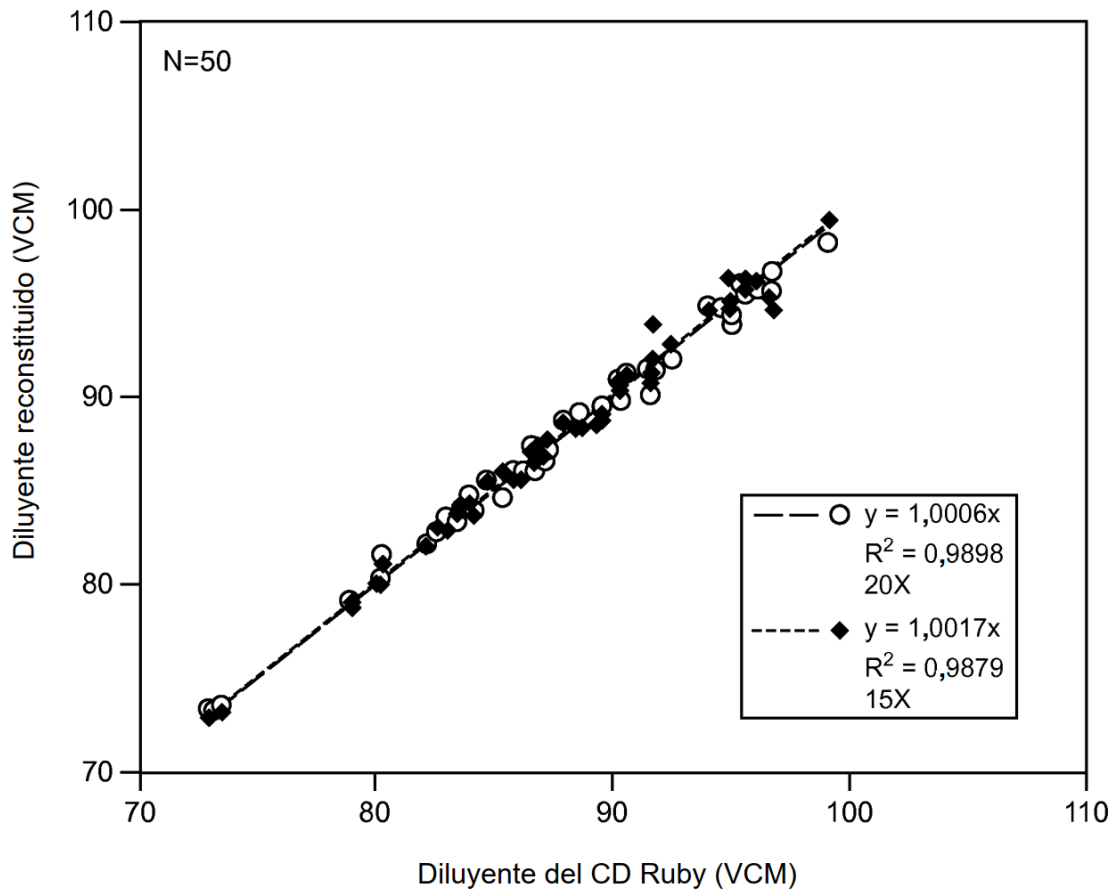


FIG. 2

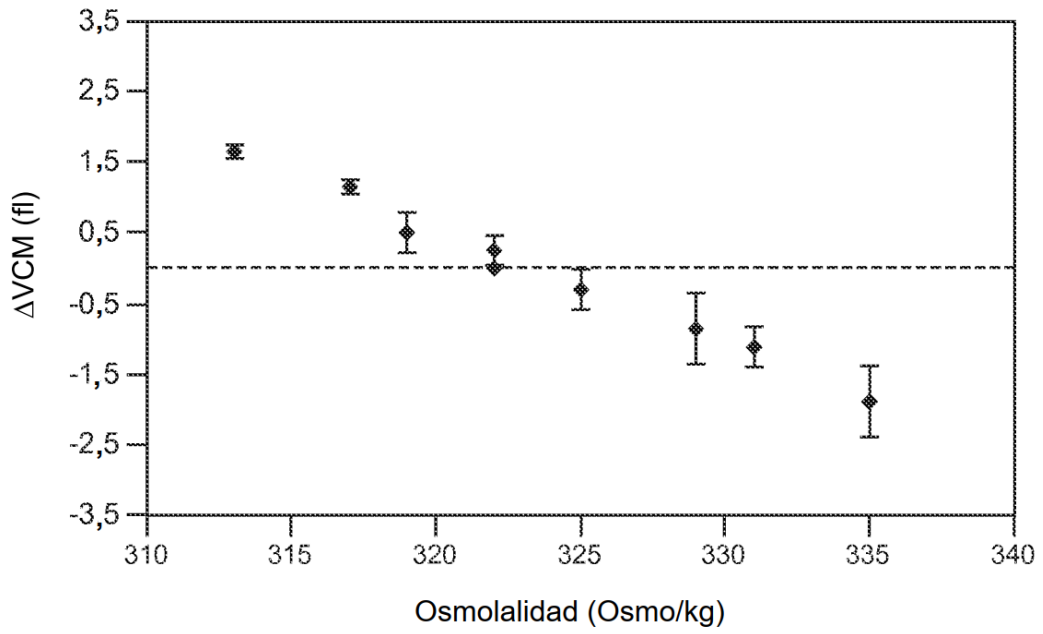


FIG. 3

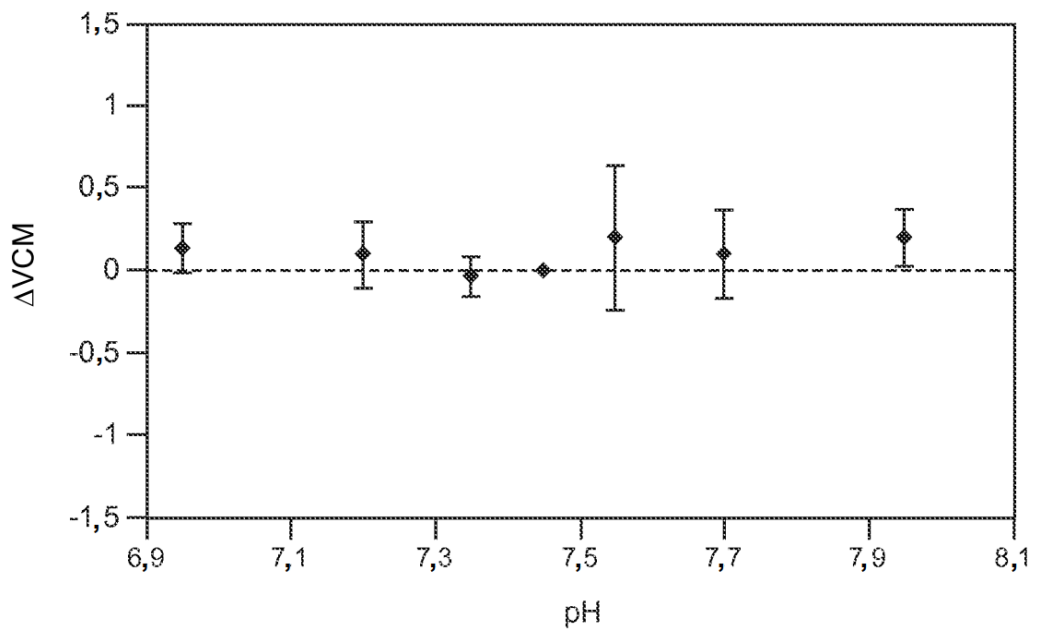


FIG. 4

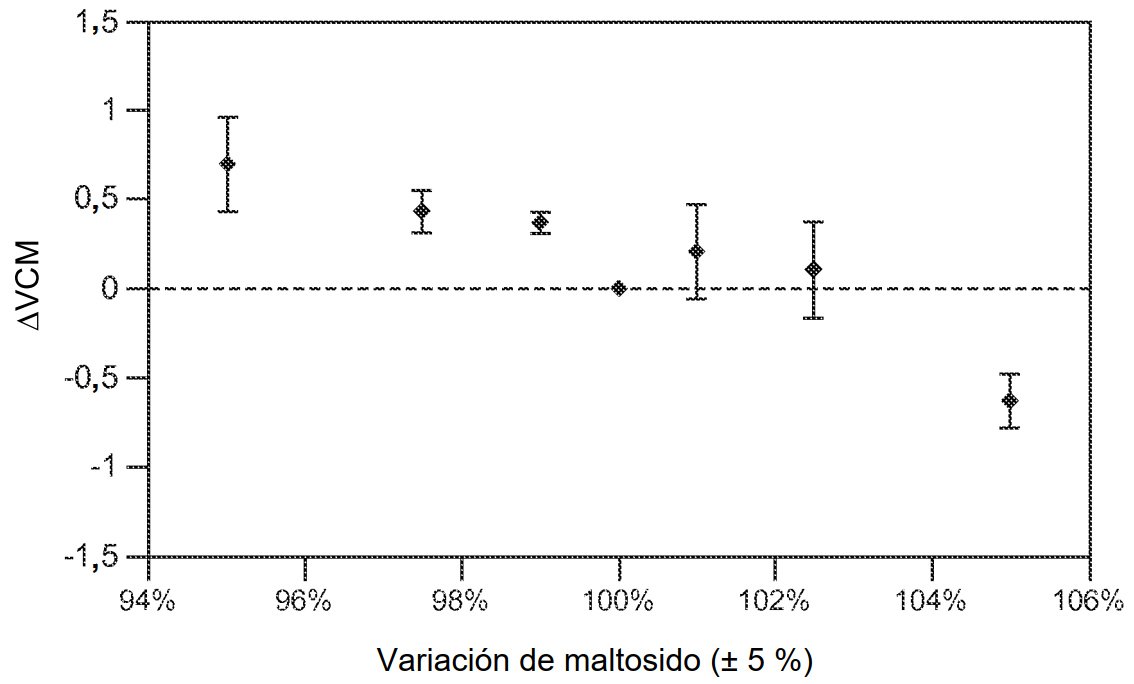


FIG. 5