

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 380**

51 Int. Cl.:

G01N 33/49 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09721619 .6**

96 Fecha de presentación: **20.03.2009**

97 Número de publicación de la solicitud: **2265946**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.2010**

54 Título: **Procedimiento y aparato para determinar el hematocrito de una muestra de sangre utilizando la pigmentación intrínseca de la hemoglobina contenida en los glóbulos rojos**

30 Prioridad:

21.03.2008 US 38557
21.03.2008 US 38574

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

10.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

10.12.2012

73 Titular/es:

ABBOTT POINT OF CARE, INC. (100.0%)
400 College Road East
Princeton, NJ 08540, US

72 Inventor/es:

LEVINE, ROBERT A.;
WARDLAW, STEPHEN C.;
UNFRICHT, DARRYN W. y
LALPURIA, NITEN V.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 392 380 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

Procedimiento y aparato para determinar el hematocrito de una muestra de sangre utilizando la pigmentación intrínseca de la hemoglobina contenida en los glóbulos rojos.

Antecedentes de la invención

5 1. Campo técnico

La presente invención se refiere aparatos y métodos para el análisis de muestras de sangre en general, y para la determinación del hematocrito de una muestra de sangre en particular.

2. Información de los antecedentes

10 Médicos, veterinarios y científicos han examinado fluidos biológicos de humanos y animales, especialmente sangre, para determinar sus cantidades de partículas constituyentes así como para identificar la presencia de partículas inusuales no vistas en sujetos saludables. Las partículas generalmente medidas, cuantificadas e identificadas incluyen células sanguíneas rojas (RBC), células sanguíneas blancas (WBC) y plaquetas. Los análisis de RBC pueden incluir determinaciones del número, tamaño volumen, forma, contenido y concentración de hemoglobina de RBC, y el hematocrito (también denominado el volumen relleno de células). Los análisis de RBC pueden implicar también la determinación de la presencia y/o concentración de ciertos componentes dentro de las células sanguíneas rojas tales como ADN, ARN, incluyendo la detección de la presencia y/o enumeración de hematoparásitos (por ejemplo parásitos de malaria) o bien en las RBC o tripanosomas que son extracelulares u organismos de leishmaniasis que están en las WBC así como otros hematoparásitos. Los análisis de WBC pueden incluir una determinación de la frecuencia de población de subtipos de WBC denominado generalmente un recuento de WBC diferencial, así como la notificación de cualquier tipo de célula inusual no encontrada en individuos saludables. Los análisis de plaquetas (o en cientos animales que incluyen pájaros, reptiles y peces, trombocitos que tienen una función similar a la de las plaquetas en los mamíferos pero que son aproximadamente diez veces más grandes y están nucleados) pueden incluir el número, tamaño, forma, textura de las plaquetas y determinaciones volumétricas, incluyendo la determinación de la presencia de aglomeraciones de plaquetas o trombocitos dentro de la muestra.

Las técnicas de examen de sangre conocidas, descritas con detalle en textos médicos tales como Wintrobe's Clinical Hematology 12^a Edición, generalmente dividen los métodos de examen en métodos de tipo manuales, de centrifugado y de impedancia. Los métodos manuales para la enumeración de células implican típicamente la creación de un volumen determinado con exactitud de una muestra de sangre o fluido que está cuantitativamente diluida y recontada visualmente en una cámara de recuento. Los métodos de examen manual incluyen examinar un frotis periférico en el que se determinan las cantidades relativas de los tipos de partículas mediante inspección visual. Los métodos de examen de centrifugado incluyen el centrifugado de la muestra, causando la separación de la muestra en capas de constituyentes según las densidades relativas de dichos constituyentes. Se puede teñir cada capa de componente para mejorar la visibilidad o detección. Los métodos de impedancia implican el examen de una cantidad exacta de sangre que se trata según las partículas que se van a medir, por ejemplo, lisando RBC para la enumeración de las células nucleadas y diluyendo volumétricamente la muestra en un fluido conductor. El procedimiento implica típicamente monitorizar una corriente o voltaje aplicado a la muestra que pasa a través de un paso estrecho para determinar el efecto que las partículas tienen sobre la corriente/voltaje a medida que las partículas pasan a través en una única fila. Otras técnicas implican analizar la intensidad y ángulo de dispersión de luz incidente para las partículas que pasan en una única fila a través de un haz de luz. Se pueden usar también métodos citométricos de flujo que implican teñir las partículas de interés en suspensión con fluoróforos, excitar las partículas teñidas con luz de longitudes de onda apropiadas, y analizar la emisión de las partículas/células individuales. El documento US-6235536-B describe el análisis de muestras de sangre entera anticoaguladas quiescentes.

45 Todos los métodos mencionados anteriormente, aparte del frotis periférico o la separación centrífuga, requieren dispensar un volumen exacto de muestra. Las imprecisiones en el volumen de muestra darán lugar a errores cuantitativos de la misma magnitud en el análisis asociado. Con excepción de los métodos de centrifugado, todos los métodos mencionados anteriormente requieren también que la muestras se mezcle con un o más reactivos o diluyentes líquidos, y también requieren la calibración del instrumento para obtener resultados exactos. En el caso de los frotis periféricos, se necesita un alto grado de capacitación para examinar apropiadamente el frotis. Varios de los métodos anteriormente mencionados generan grandes volúmenes de residuos contaminados que resultan caros de manejar. Además, los métodos descritos anteriormente no son adecuados para determinar el recuento de sangre completo (CBC) en pájaros, reptiles, peces y ciertos mamíferos en los que el tamaño de las células sanguíneas rojas es muy pequeño.

55 A pesar de la cantidad compleja de información hematológica que se obtiene del recuento completo de sangre, a menudo un ensayo es el más necesario: el hematocrito. Es el hematocrito lo que le dice al médico si el paciente tiene anemia debido a hemorragias o causas nutricionales tales como la deficiencia en hierro relativamente común en niños en crecimiento y mujeres en edad de reproducción, procesos asociados a trastornos tales como infecciones

crónicas, trastornos metabólicos tales uremia o enfermedades neoplásicas así como efectos farmacológicos. Un valor elevado de hematocrito indica la presencia de demasiadas células sanguíneas rojas debido a procesos de trastornos tales como deshidratación en las que la sangre está concentrada. Un valor elevado de hematocrito puede ser indicativo también de aumentos reales en la masa de células sanguíneas rojas que ocurre como consecuencia de procesos de trastornos tales como policitemia, o efectos farmacológicos tales como la administración de demasiados esteroides anabólicos o de hipoxia crónica debido a trastornos de los pulmones o ciertos tipos de trastornos cardíacos congénitos. La importancia y utilidad del hematocrito hacen que sea uno de los ensayos más frecuentemente solicitados realizados en sangre. Como consecuencia, las determinaciones de hematocrito fáciles, exactas, económicas y rápidamente disponibles resultan muy deseables y beneficiarán a los pacientes. Un instrumento que pueda usar una cámara de análisis desechable, uno que puede funcionar sin fluidos internos aparte del flujo capilar (es decir, uno que pueda funcionar independientemente de la gravedad y orientación), y uno que se pueda utilizar como dispositivo portátil serían de gran beneficio.

Sumario de la invención

Según un primer y amplio aspecto de la presente invención, se proporciona un método para determinar el hematocrito de una muestra de sangre según la reivindicación 1. La muestra de sangre puede ser una muestra de sangre sustancialmente no diluida. La altura de dicha cámara es tal que al menos algunas de las RBC dentro de la muestra, o bien individualmente o en forma de agregado, están en contacto con ambas superficies interiores de los paneles o bien individualmente o en forma de agregado.

Según un segundo y amplio aspecto de la invención, se proporciona un aparato para determinar el hematocrito de una muestra de sangre sustancialmente diluida que se encuentra de forma quiescente dentro de una cámara de análisis, según la reivindicación 11. La altura de la cámara es tal que al menos algunas de las RBC dentro de la muestra individualmente o en forma de agregado, están en contacto con ambas superficies interiores o bien individualmente o en forma de agregado.

Una ventaja de la presente invención es que se puede usar para determinar un valor de hematocrito utilizando un volumen de muestra extremadamente pequeño que se puede obtener directamente del paciente mediante una perforación de un capilar, lo que lo hace más útil desde el punto de vista de una aplicación cuidadosa o de una muestra de sangre venosa, si se desea.

Otra ventaja de la presente invención es que se puede determinar un valor de hematocrito independientemente del conocimiento del factor de aumento del instrumento (tamaño de la imagen/unidad de imagen) y sin conocer la altura de la cámara. Por consiguiente, el método de la presente invención tiene una gran versatilidad con respecto al tipo de instrumento y cámara de análisis que se puede usar.

Otra ventaja de la presente invención es que puede funcionar para determinar el hematocrito de una muestra de sangre usando sólo la pigmentación intrínseca de la hemoglobina, y por lo tanto no es necesario añadir ningún colorante o tinte. El elevado coeficiente de extinción molar de la hemoglobina a diferentes longitudes de ondas permite realizar determinaciones de su concentración relativa o absoluta dentro de distancias de camino óptico muy pequeñas, tan pequeñas como uno pocos micrómetros.

Otra ventaja del presente método es que funciona sin fluidos externos e internos, y es independiente de la gravedad y orientación, por lo que resulta adaptable para su uso en un dispositivo portátil.

El presente método y las ventajas asociadas al mismo resultarán más fácilmente evidentes en vista de la descripción detallada proporcionada más adelante, incluyendo los dibujos que se acompañan.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1 a 4 son representaciones esquemáticas de las secciones transversales de las cámaras de análisis que se pueden usar en el presente método.

La Figura 5 es una vista en planta esquemática de una cinta que tiene una pluralidad de cámaras de análisis.

La Figura 6 es una vista en planta esquemática de un recipiente desechable que tiene una cámara de análisis.

La Figura 7 es una vista esquemática de una sección transversal de un recipiente desechable que tiene una cámara de análisis.

La Figura 8 es un esquema de un dispositivo de análisis que se puede usar con el presente método.

La Figura 9 es un diagrama de bloques que ilustra un método según la presente invención

Descripción detallada de las realizaciones de la invención

El método y aparato de la presente invención para determinar el hematocrito de una muestra de sangre permite la determinación de dicho hematocrito sin añadir colorantes, reactivos (aparte de anticoagulantes en algunas

realizaciones) o diluyentes a la muestra, o sin la necesidad de conocer con exactitud el volumen de la muestra o la altura o volumen de la cámara de análisis. En algunas realizaciones, el método y aparato de la presente invención incluye la adición de un agente que origina la agregación de las RBC. Agentes tales como polibreno, y anticuerpos de anti-glicoforina, o similares causan la agregación casi instantánea de las RBC dentro de la muestra. Al menos algunos de estos agregados de RBC estarán en contacto con las superficies interiores opuestas de la cámara. La densidad óptica de un agregado de RCB que se prolonga entre las superficies se puede usar del mismo modo que la densidad óptica de una única célula para calcular el hematocrito.

El presente método utiliza una cámara de análisis que es operable para contener de forma quiescente una muestra de sangre entera sustancialmente no diluida para su análisis. La cámara tiene típicamente un tamaño para contener aproximadamente 0,2 a 1,0 μ l de muestra, pero dicha cámara no está limitada para ninguna capacidad de volumen particular, y dicha capacidad puede variar para adecuarse a la aplicación del análisis. La frase "sustancialmente no diluida" según se usa en esta memoria describe una muestra de sangre que, o bien no está diluida en absoluto o no ha sido diluida con determinación, pero se le ha añadido algún reactivo para fines del análisis. En el caso de que la adición de los reactivos diluya la muestra, como mucho, dicha dilución no tiene un impacto importante desde el punto de vista clínico sobre el análisis realizado. Típicamente, los únicos reactivos que se usarán en la realización del presente método son anticoagulantes (por ejemplo, EDTA, heparina) y, en algunos casos, un agente formador de esferas isovolumétricas o un agente de formación de agregados y no se pretende que diluyan la muestra. En determinadas circunstancias (por ejemplo, análisis muy rápidos), puede no ser necesario añadir el agente anticoagulante, pero es preferible hacerlo en la mayoría de los casos para asegurarse de que la muestra está en una forma aceptable para el análisis. El término "quiescente" se usa para describir que la muestra está depositada dentro de la cámara para su análisis, y dicha muestra no se mueve resueltamente con respecto a la cámara durante el análisis; es decir, la muestra se encuentra de forma quiescente dentro de la cámara. En el caso de que se produzca movimiento dentro de la muestra de sangre, será principalmente el debido al movimiento Brownian de los constituyentes formados de la muestra de sangre, el cual no está inutilizando el uso del dispositivo de esta invención.

Haciendo referencia ahora a la Figura 1, la cámara de análisis 10 está definida por un primer panel 12 que tiene una superficie interior 14, y un segundo panel 16 que tiene una superficie interior 18. Ambos paneles 12 y 16 son lo suficientemente transparentes para permitir la transmisión de luz de determinadas longitudes de onda a su través en una cantidad suficiente para realizar el análisis de densidad óptica descrito más adelante. Al menos una parte de los paneles 12, 16 son paralelos entre sí, y en esa parte las superficies interiores 14, 18 están separadas una de otra por una altura 20 tal que al menos algunas RCB individuales 22 dentro de una muestra están en contacto cada una individualmente con ambas superficies interiores 14, 18, y/o uno o más agregados 23 de RBC dentro de la muestra están cada uno en contacto con ambas superficies interiores 14, 18 de los paneles de la cámara 12, 16 y una o más zonas vacías de RBC 24 (por ejemplo, carencias) dentro de la muestra quiescente se extienden entre las superficies interiores, como se discutirá con más detalle a continuación. El presente método puede utilizar una variedad de diferentes tipos de cámaras de análisis que tienen las características anteriormente mencionadas, y, por lo tanto, no está limitado a ningún tipo particular de cámara de análisis. Una cámara de análisis que tiene paneles paralelos 12, 16 simplifica el análisis y es, por lo tanto, preferida, pero no se requiere para la presente invención; por ejemplo, se podría usar una cámara que tenga un panel dispuesto a un ángulo no paralelo conocido con respecto al otro panel.

Haciendo referencia ahora a las Figuras 2-5, se muestra un ejemplo de una cámara aceptable 10 que incluye un primer panel 12, un segundo panel 16, y al menos tres separadores 26 dispuestos entre los paneles 12, 16. Los separadores 26 pueden tener cualquier estructura que se pueda disponer entre los paneles 12, 16 que actúe para separar dichos paneles 12, 16 uno de otro. La dimensión 28 de un separador 26 que se extiende entre los paneles 12, 16 se denomina en esta memoria la altura 28 del separador 26. Las alturas 28 de los separadores 26 no son típicamente exactamente iguales entre sí (por ejemplo, tolerancias de fabricación), pero están dentro de la tolerancia comercialmente aceptable para medios de espaciamiento en aparatos de análisis similares. Las cuentas esféricas son un ejemplo de un separador 26 aceptable y se encuentran comercialmente disponibles de, por ejemplo, Bangs Laboratories of Fishers, Indiana, EE.UU.

En la realización de la cámara mostrada en la Figura 3, los separadores 26 consisten en un material que tiene una flexibilidad mayor que uno o ambos del primer panel 12 y el segundo panel 16. Como se puede ver en la Figura 3, los separadores más grandes 26 están comprimidos hasta tal punto que la mayoría de los separadores 26 están tocando las superficies interiores de los paneles 12, 16, haciendo de este modo que la altura de la cámara sea sólo ligeramente inferior a los diámetros medios de los separadores 26. En la realización de la cámara mostrada en la Figura 4, los separadores 26 consisten en un material que tiene menos flexibilidad que uno o ambos de paneles primero 12 y segundo 16. En la Figura 4, el primer panel 12 está formado de un material más flexible que los separadores esféricos 26 y que el segundo panel 16, y cubrirá los separadores 26 en una disposición similar a una carpa. En esta realización, aunque existan pequeñas regiones locales de la cámara 10 que se pueden desviar de la altura 20 deseada de la cámara, la altura media 20 de la cámara 10 estará muy próxima a la del diámetro medio de los separadores 26. El análisis indica que se puede controlar la altura media 20 de la cámara hasta un uno por ciento (1%) o mejor en alturas de cámaras inferiores a cuatro micrómetros usando esta realización. Sujetos a las características de flexibilidad descritas anteriormente (así como a otros factores tales como la densidad de distribución de los separadores), los separadores 26 y los paneles 12, 16 pueden estar hechos de una variedad de materiales siempre y cuando dichos paneles 12, 16 sean suficientemente transparentes. Son ejemplo de paneles 12,

16 aceptables las películas de plástico transparentes que consisten en materiales acrílicos o poliestireno, y son separadores 26 aceptables las cuentas esféricas hechas de poliestireno, policarbonato, silicona y materiales similares. Un ejemplo específico de un separador aceptable son esferas hechas de poliestireno que se encuentran comercialmente disponibles, por ejemplo, en Thermo Scientific of Fremont, California, EE.UU., número de catálogo 4204 A, con un diámetro de cuatro micrómetros (4 μm). Con referencia a la Figura 5, el panel 12 que se va a colocar verticalmente encima del otro incluye una pluralidad de puertos 30 dispuestos a intervalos regulares (por ejemplo que actúan como ventilaciones de aire), y los paneles 12, 16 están unidos juntos en unos puntos. En algunas realizaciones, el material de unión 32 forma una pared de cámara externa operable para contener lateralmente la muestra 34 dentro de la cámara de análisis 10. Este ejemplo de una cámara de análisis aceptable se describe con más detalle en la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N° 2007/0243117, y N° 2007/0087442.

Otro ejemplo de una cámara 10 aceptable está colocada en un recipiente desechable 36 como el mostrado en las Figuras 6 y 7. La cámara 10 se forma entre un primer panel 12 y un segundo panel 26. Ambos paneles primero 12 y segundo 16 son transparentes para permitir el paso de luz a través de la cámara 10. Al menos una parte del primer panel 12 y del segundo panel 16 están colocadas paralelamente, y dentro de esa parte las superficies interiores 14, 18 están separadas una de otra por una altura 20. Esta realización de la cámara 10 se describe con más detalle en la Patente de EE.UU. N° 6.723.290. Las cámaras de análisis mostradas en las Figuras 2 a 7 representan cámaras que son aceptables para su uso en el presente método. Sin embargo, el presente método no está limitado a estas realizaciones particulares.

Una altura de cámara adecuada es una en la que al menos algunas de las RBC dentro de la muestra están en contacto individualmente con ambas superficies interiores de los paneles de la cámara, y/o uno o más agregados de RBC están en contacto con ambas superficies interiores de los paneles de la cámara, y una o más zonas vacías de RCB (por ejemplo, carencias) dentro de la muestra quiescente se extienden entre las superficies interiores. Debido a que el tamaño de las RBC dentro de una muestra de sangre es una función del tipo de muestra de sangre que se va a analizar (por ejemplo, humana, de mono, de caballo, de cabra, de pez, de pájaro, etc.), la altura aceptable de la cámara variará dependiendo del individuo que va a ser sometido al ensayo. Una altura de cámara de aproximadamente dos a seis micrómetros (2-6 μm) resulta aceptable para RCB individuales para la mayoría de las especies animales basada en los tamaños típicos de RBC y en el hecho de que dichas RBC se pueden ser deformadas en algún grado (por ejemplo, las esferas parcialmente comprimidas discutidas anteriormente). Se puede realizar un análisis de hematocrito de una especie animal que tiene RBC sustancialmente mayores o menores que las RBC humanas, en una cámara que tiene respectivamente una altura de cámara mayor o menor, respectivamente. Además, un análisis de hematocrito que utiliza agregados de RBC puede tener una altura de cámara que esté impuesta por la altura de los agregados de RBC.

En algunas aplicaciones, se mezcla un agente de formación de esferas isovolumétricas (por ejemplo un detergente anfótero o un reactivo que actúe de forma similar) con al menos una parte de la muestra para hacer que al menos algunas de las RBC adquieran una geometría sustancialmente esférica. Un ejemplo específico de un agente de formación de esferas es el detergente Zwittergent® 3-16, que es un detergente anfótero producido por Calbiochem, una entidad de EMD Chemicals, Inc. De New Jersey, EE.UU. La cantidad de agente de formación de esferas añadida a la muestra es una cantidad adecuada para formar esferas en al menos un número de RBC requerido para realizar el análisis de hematocrito de la presente invención. La cantidad específica dependerá del agente particular y de las circunstancias del ensayo, la cuales pueden ser determinadas por una persona experta en la técnica sin experimentación excesiva. Las RBC en su estado natural tiene a menudo forma de disco bicóncavo 38 (véase la Figura 1) en lugar de la forma esférica 40. Como consecuencia, en ausencia del efecto del agente de formación de esferas isovolumétricas, algún porcentaje de las RBC con forma de disco no estarán en contacto con ambos paneles de la cámara. El aumento del número de RBC que tienen una geometría sustancialmente esférica aumentará el número de RBC en contacto con ambos paneles incluyendo algunas células 42 que están contenidas por los paneles de la cámara, pero que de otro modo serían esféricas.

El análisis de la muestra dispuesta de forma quiescente dentro de la cámara se realiza usando un dispositivo de análisis que es operable para captar imágenes de al menos una parte de la muestra y realizar un análisis de la imagen. La imagen se produce de manera que permita determinar la densidad óptica de la muestra con un criterio por unidad. La expresión "criterio por unidad" o "unidad de imagen" significa una unidad incremental de la cual se puede diseccionar la imagen de la muestra. Un píxel, que se define generalmente como el elemento más pequeño de una imagen que puede ser tratado individualmente dentro de un sistema de captación de imágenes particular, es un ejemplo de una unidad de imagen, y una unidad de imagen puede incluir también un pequeño número de píxeles en una unidad colectiva. El método de la presente invención, sin embargo, no está limitado para usarse con ningún dispositivo de análisis particular.

Con referencia ahora a la Figura 8, un ejemplo de un dispositivo de análisis 44 que se puede adaptar para su uso con el método de la presente invención incluye un iluminador de muestra 46, un disector de imágenes 48, y un analizador programable 50. El iluminador de muestras 46 incluye una fuente de luz que produce selectivamente luz de un amplio intervalo de longitudes de onda suficiente para ser útil para el análisis de hematocrito (por ejemplo, aproximadamente 400-670 nm; la luz de aproximadamente 413 nm y aproximadamente 540 nm es particularmente efectiva para determinar la densidad óptica (OD) de las RBC dentro de una muestra de sangre humana) y típicamente incluye la óptica para manipular la luz. El iluminador de muestras 46 utiliza transmitancias para producir

una imagen. Las propiedades de transmisión de luz de la muestra se puede medir, por ejemplo, colocando una fuente de luz en un lado de la muestra que está dentro de la cámara 10, dirigiendo la luz a través de la muestra dispuesta de forma quiescente entre los paneles de la cámara, y después capturado la luz usando un disector de imágenes. Un ejemplo de un disector de imágenes aceptable 48 es un sensor de imágenes del tipo dispositivo de acoplamiento de carga (CCD) que transforma una imagen de la luz que pasa a través de la muestra en un formato de datos electrónico. Los sensores de imágenes del tipo semiconductor de óxido de metal complementario ("CMOS") son otro ejemplo de un sensor que se puede usar, y la presente invención no está limitada a ninguno de estos ejemplos. El analizador programable 50 incluye una unidad de tratamiento central (CPU) y está conectada al iluminador de muestras 46 y al disector de imágenes 48. La CPU está adaptada (por ejemplo, programada) para realizar selectivamente las funciones necesarias para llevar a cabo el método de la presente invención. Se debe destacar que se puede implementar la funcionalidad del analizador programable 50 usando un hardware, software, firmware, o una de sus combinaciones. Una persona experta en la técnica sería capaz de programar las unidades de tratamiento para realizar la funcionalidad descrita en esta memoria sin una experimentación excesiva. La Patente de EE.UU. N° 6.866.823 titulada "Apparatus for Analyzing Biologic Fluids" y expedida el 15 de Agosto de 2005, describe dicho dispositivo de análisis 44.

El dispositivo de análisis se adapta para determinar un valor de OD asociado a la señal de luz detectada con un criterio por unidad para una parte de la muestra de la que se han captado imágenes. La señal de luz detectada (es decir, los valores de OD) puede ser usada por un algoritmo de determinación de bordes para identificar las posiciones y fronteras de las RBC. Las RBC que están en contacto con ambas superficies interiores de la cámara tienen un perfil de OD similar al de una esfera parcialmente comprimida. Los bordes laterales de las células que no están en contacto con las superficies tendrán una OD que (en términos relativos) se puede considerar que se aproxima a cero. El valor de la OD determinado: 1) aumenta al desplazarse en una dirección hacia el centro de la RBC (por ejemplo, a medida que aumenta el camino transmisión de luz a través del célula); 2) alcanza un valor máximo y permanece sustancialmente constante cuando la RBC está en contacto con las superficies superior e inferior (es decir, cuando el camino de la luz transmitida a través de la RBC es constante); y 3) disminuye al desplazarse en una dirección que se aleja del centro de la RBC (por ejemplo, a medida que el camino de transmisión de la luz a través de la célula disminuye). Esta caracterización del perfil de OD de una RBC es particularmente uniforme para las RBC que tienen forma esférica.

El dispositivo de análisis está adaptado además para determinar un valor medio de OD máxima para un grupo de RBC y/o agregados de RBC 23 en contacto con ambas superficies interiores. La determinación de qué constituye un tamaño aceptable de grupo de RBC y/o agregados de RBC en contacto con las superficies interiores se puede hacer con un criterio por análisis de muestra, o se puede hacer periódicamente para un número "n" de análisis de muestras del mismo tipo; por ejemplo, muestras de sangre humana. Por ejemplo, se puede evaluar comparativamente un grupo de RBC identificado como que está en contacto con ambas superficies interiores, para determinar el valor medio de OD máxima y la desviación estadística de la OD dentro del grupo. Resulta deseable determinar el valor medio de OD máxima debido a que la OD de la hemoglobina dentro de las células puede variar de una célula a otra incluso dentro de una muestra particular. Si la desviación estándar es mayor que un umbral predeterminado, se puede seleccionar un nuevo grupo de RBC en contacto con ambos paneles, o el grupo existente se puede ampliar, hasta que el análisis anteriormente mencionado establezca un grupo de RBC que tenga un valor medio de OD máxima con una desviación estándar aceptable. Un valor medio de OD máxima de las RBC dentro de un grupo que es aproximadamente más o menos el uno por ciento (1%) del valor medio de OD máxima de todas las RBC que están en contacto con ambas superficies dentro de la muestra, estaría, por ejemplo, dentro de los valores de desviación estándar aceptables. Sin embargo, lo que constituye un valor de desviación estándar aceptable puede variar dependiendo de la aplicación en el manejo y del análisis estadístico específico que se está usando (por ejemplo, error estándar, etc.). Los datos estadísticos actuales con respecto a la OD de las RBC están disponibles y se pueden usar en la determinación de valores estadísticos de OD aceptables. La determinación de si las RBC dentro de un grupo particular tienen un valor medio de OD máxima que está dentro de una desviación estándar clínicamente aceptable se puede adaptar también ya que, como se indicó anteriormente, es bien conocido que la población de RBC dentro de un individuo tiene típicamente pequeñas variaciones en la concentración de hemoglobina y se puede usar una desviación estándar continua de los resultados para determinar cómo se deben examinar muchas células antes de obtener un valor medio de precisión aceptable; por ejemplo, para muestras procedentes de un individuo que tiene parámetros normales en la sangre, un tamaño de grupo aceptable puede ser tan pocas como 100 RBC, mientras que las muestras procedentes de un individuo que tiene parámetros anormales en la sangre puede requerir el análisis de 1000 o más RBC. El número específico de RBC y/o agregados de RBC en contacto con ambas superficies interiores que se usa para establecer un valor medio aceptable de OD máxima no está limitado a ningún número o porcentaje particular de las RBC dentro de una muestra, y puede incluir todas (por ejemplo miles) de las RBC en contacto con ambas superficies.

Con un método para determinar el hematocrito de una muestra biológica según la presente invención, las etapas de dicho método se muestran en el diagrama de bloques de la Figura 9, se coloca una muestra de sangre entera sustancialmente no diluida en una cámara, como se describió anteriormente. Se mezcla con la muestra un agente anticoagulante, y en algunos casos un agente de formación de esferas isovolumétricas y/o un agente agregante, o bien antes de introducirla en la cámara o al introducirla en la cámara. Los reactivos añadidos en forma seca o semi-seca, por ejemplo, por medio de revestimiento de superficies, son particularmente fáciles de usar. Sin embargo, la

5 presente invención no se limita a reactivos en forma seca, y se pueden usar, por ejemplo, reactivos líquidos que no diluyan de modo significativo la muestra. La muestra está en forma quiescente dentro de la cámara. En determinadas circunstancias (por ejemplo, análisis muy rápidos), puede no ser necesario añadir el agente anticoagulante, pero es preferible hacerlo en la mayoría de los casos para asegurarse de que la muestra esté en una forma aceptable para el análisis.

10 Se obtienen imágenes de al menos una parte de la muestra que está en forma quiescente dentro de la cámara usando el dispositivo de análisis transmitiendo luz a través de la muestra y detectando la luz transmitida. La parte de muestra de la que se obtiene la imagen incluye un número de RBC y/o agregados de RBC que están en contacto con las superficies interior de cada panel de la cámara, y al menos una zona de muestra vacía de cualquier RBC (zona de vacío de RBC), que se extiende entre las superficies interiores de los paneles de la cámara. Aunque no es un requisito que se capten imágenes de toda la muestra que está dentro de la cámara, es preferible hacerlo ya que proporciona típicamente un análisis más completo de dicha muestra (y de todos sus constituyentes), y un aumento adicional de precisión, ya que la distribución de RBC y carencias dentro de una cámara no es típicamente homogénea para una muestra de sangre entera sustancialmente no diluida.

15 Se determina un grupo de RBC individuales o agregados de RBC en contacto con las superficies interiores mediante el analizador usando la imagen de la parte de la muestra, y se determina un valor medio de OD máxima que tiene una desviación estándar aceptable a partir de ese grupo. Como se indicó anteriormente, el tamaño del grupo puede variar dependiendo del análisis, y puede incluir iteraciones para determinar el valor medio de OD máxima anteriormente mencionado que tiene una desviación estándar aceptable. Se asigna un valor límite superior arbitrario de cien por ciento (100%) para determinar el valor medio de OD máxima de las RBC individuales y/o los agregados de RBC en contacto con las superficies interiores.

20 De forma similar, el dispositivo de análisis se adapta para identificar dónde se encuentran dentro de la cámara una o más zonas vacías de RBC (por ejemplo, carencias) que se extienden entre ambas superficies interiores. Se determina el valor de OD de la zona o zonas vacías de RBC, o si más de una zona vacía de RBC está presente y se analiza, se puede determinar el valor medio de las OD de las zonas vacías de RBC. Se asigna un valor límite inferior arbitrario de cero por ciento (0%) al valor de CD de la zona o zonas vacías de RBC.

25 El hematocrito de la muestra se determina asignando un valor relativo del valor de OD de cada unidad de la parte de muestra de la que se obtienen imágenes en función de los valores límites superior e inferior (es decir, en función de las regiones en las que las RBC se prolongan completamente a través de la altura de la cámara y de las regiones en las que no hay RBC). Se determina un valor medio de los valores relativos de los porcentajes para cada unidad. El valor medio relativo es un porcentaje del volumen de RBC de la muestra entre 100% (es decir, todas las RBC) y 0% (ninguna RBC). El porcentaje es, por definición, igual al hematocrito de la muestra, es decir, el volumen relleno de células sanguíneas rojas de la muestra.

30 Una ventaja del método de la presente invención es que no es necesario tener todas las RBC dentro de la muestra en contacto con cada panel de la cámara. El método se puede realizar con sólo alguna de las RBC y/o agregados de RBC en contacto con ambas superficies interiores de la cámara. Las RBC más pequeñas y los fragmentos de RBC no se usan para calibrar el análisis, pero se miden para determinar su contribución al hematocrito. Además, con el método de la presente invención, se puede determinar el hematocrito de la muestra sin conocer el área o volumen total de dicha muestra dentro de la cámara. Por lo tanto, no es necesario usar una cámara que tenga una altura definida con precisión, lo que hace que la fabricación de las cámaras sea más económica.

35 Aunque esta invención se ha mostrado y descrito con respecto a sus realizaciones detalladas, los expertos en la técnica entenderán que se pueden hacer diversos cambios en la forma y detalle sin salirse del alcance de la invención. Por ejemplo, la invención se describió anteriormente desde el punto de vista de la determinación del hematocrito para una muestra de sangre sustancialmente no diluida. Realmente, una de las ventajas de la presente invención es su capacidad para analizar sangre sin necesidad de usar diluyentes. Es decir, en realizaciones alternativas, la presente invención se puede usar en sangre que se ha diluido por varias razones siempre y cuando se conozca o se pueda determinar el factor de dilución de la muestra.

REIVINDICACIONES

1.- Un método para determinar el hematocrito de una muestra de sangre que comprende las etapas de:

- 5 depositar la muestra en una cámara de análisis (10) adaptada para contener en forma quiescente la muestra para su análisis, estando la cámara (10) definida por una superficie interior (14) de un primer panel (12), y una superficie interior (18) de un segundo panel (16), en la que ambos paneles (12, 16) son transparentes, y la cámara (10) tiene una altura que se extiende entre las superficies interiores (14, 18) de los paneles (12, 16), siendo dicha altura tal que al menos algunas células sanguíneas rojas dentro de la muestra están en contacto con ambas superficies interiores (14, 18) de los paneles (12, 16), y una o más zonas vacías de células rojas dentro de la muestra quiescente se extienden entre la superficies interiores (14,18),
- 10 captar imágenes de al menos una parte de la muestra quiescente, la cual contiene las células sanguíneas rojas y una o más zonas vacías de células sanguíneas rojas que están en contacto con las superficies interiores (14,18), para determinar un valor de densidad óptica de la parte de la muestra de la que se han captado las imágenes con un criterio por unidad de imagen,
- 15 seleccionar y calcular los valores medios de los valores de densidad óptica de las unidades de imagen ópticamente alineadas con las células sanguíneas rojas que están en contacto con las superficies interiores (14, 18) y, asignar un valor límite superior de 100% a valor medio de densidad óptica de esas unidades de imagen;
- seleccionar y calcular el valor medio de los valores de densidad óptica de las unidades de imagen ópticamente alineadas con una o más zonas vacías de las células sanguíneas rojas, y asignar una valor límite inferior de 0% a los valores de densidad óptica de esas unidades de imagen; y
- 20 determinar el hematocrito de la muestra asignando valores relativos al valor de densidad óptica de cada unidad de imagen de la parte de la muestra de la que se captan imágenes, en función de los valores límites superior e inferior, y calculando el valor medio de los valores relativos.
- 2.- El método de la reivindicación 1, en el que al menos algunas células sanguíneas rojas dentro de la muestra que están en contacto con ambas superficies interiores (14,18) incluyen células sanguíneas rojas que están en contacto de forma individual con las superficies interiores (14, 18) de los paneles (12, 16).
- 25 3.- El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de mezclar al menos una parte de la muestra con un agente agregante.
- 4.- El método de la reivindicación 3, en el que al menos algunas células sanguíneas rojas dentro de la muestra que están en contacto con ambas superficies interiores (14, 18) incluyen células sanguíneas rojas agregadas, cuyos agregados están en contacto con ambas superficies interiores (14, 18) de los paneles (12,16).
- 30 5.- El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de captar imágenes de al menos una parte de la muestra quiescente incluye transmitir la luz de una o más longitudes de onda predeterminadas a través de la muestra y capturar la luz transmitirá después de que ha pasado a través de dicha muestra, en el que los valores de densidad óptica están relacionados con la luz transmitida y que ha pasado a través de la muestra.
- 35 6.- El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de mezclar al menos una parte de la muestra con una agente de formación de esferas isovolumétricas.
- 7.- El método de la reivindicación 1, en el que se obtienen imágenes de toda la muestra.
- 8.- El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de seleccionar y calcular el valor medio de los valores de densidad óptica de los píxeles ópticamente alineados con las células sanguíneas rojas que están en contacto con ambas superficies interiores (14, 18), comprende además la etapa de determinar un valor medio de densidad óptica máxima de al menos una parte de las células sanguíneas rojas que están en contacto con las superficies interiores (14, 18), y determinar una desviación estándar de la densidad óptica entre al menos una parte de las células sanguíneas rojas, y usar el valor medio de densidad óptica máxima como el valor medio de densidad óptica de los píxeles que están ópticamente alineados con las células sanguíneas rojas que están en contacto con las superficies interiores (14, 18), cuando la desviación estándar es igual o inferior a un valor predeterminado.
- 40 9.- El método de la reivindicación 8, en el que la etapa de determinar el valor medio de densidad óptica máxima de al menos una parte de las células sanguíneas rojas que están en contacto con ambas superficies interiores (14, 18) se realiza de manera iterativa con diferentes grupos de células sanguíneas rojas que están en contacto con ambas superficies interiores (14, 18), hasta que la desviación estándar del valor medio de densidad óptica máxima sea igual o inferior al valor predeterminado.
- 45 10.- El método de la reivindicación 9, en el que las superficies interiores (14, 18) de los paneles (12, 16) son sustancialmente paralelas, y la altura está dentro del intervalo de aproximadamente dos micrómetros a seis micrómetros.

- 5 11.- Un aparato para determinar el hematocrito de una muestra de sangre que está en forma quiescente dentro de una cámara de análisis (10), estando dicha cámara (10) definida por un par de paneles transparentes (12, 16) y que tiene un altura que se extiende entre las superficies interiores (14, 18) de los paneles (12, 16), siendo dicha altura tal que al menos algunas células sanguíneas rojas dentro de la muestra están en contacto con ambas superficies interiores (14, 18), y una o más zonas vacías de células sanguíneas rojas dentro de la muestra quiescente se extienden entre las superficies interiores (14, 18), comprendiendo el aparato;
- 10 una unidad de captación de imágenes que incluye un iluminador (46) y un disector de imágenes (48), y dicha unidad es operable para captar imágenes de al menos una parte de la muestra que está en forma quiescente dentro de la cámara (10) que contiene las células sanguíneas rojas y una o más zonas vacías de células sanguíneas rojas que están en contacto con la superficies interiores (14, 18), y producir señales de imágenes representativas de dicha parte de la muestra de la que se ha obtenido la imagen; y
- 15 un analizador programable (50) adaptado para determinar, usando las señales de imagen, los valores de densidad óptica de la parte de la muestra de la que se ha obtenido la imagen con un criterio por píxel, y seleccionar y calcular el valor medio de los valores de densidad óptica de los píxeles ópticamente alineados con las células sanguíneas rojas que están en contacto con las superficies interiores (14, 18), y asignar un valor límite superior de 100% al valor medio de densidad óptica de esos píxeles, y seleccionar los valores de densidad óptica de los píxeles ópticamente alineados con una o más zonas vacías de células sanguíneas rojas y asignar un valor límite inferior de 0% a los valores de densidad óptica de esos píxeles, y determinar el hematocrito de la muestra asignando valores relativos al valor de densidad óptica de cada píxel de la parte de la muestra de la que se han obtenido las imágenes, en función de los valores límites superior e inferior, y calcular el valor medio de los valores relativos.
- 20 12.- El aparato de la reivindicación 11, que comprende además:
- 25 Una cámara de análisis (10) adaptada a mantener en forma quiescente la muestra para el análisis, estando la cámara (10) definida por una superficie interior (14) de un primer panel (12), y por una superficie interior (18) de un segundo panel (16), en la que ambos paneles (12, 16) son transparentes, y la cámara (10) tiene una altura que se extiende entre las superficies interiores (14, 18) de los paneles (12, 16), siendo dicha altura tal que al menos algunas células sanguíneas rojas dentro de la muestra están en contacto con ambas superficies interiores (14, 18) de los paneles (12, 16) y una o más zonas vacías de células sanguíneas rojas dentro de la muestra quiescente se extienden entre las superficies interiores (14,18).
- 30 13.- El aparato de la reivindicación 12, en el que el analizador programable está adaptado para controlar la unidad de captación de imágenes para obtener imágenes de la cámara de análisis (10).
- 35 14.- El aparato de la reivindicación 12, en el que el analizador programable (50), adaptado para seleccionar y calcular el valor medio de los valores de densidad óptica de los píxeles, se adapta además para determinar un valor medio de densidad óptica máxima de al menos una parte de las células sanguíneas rojas que están en contacto con ambas superficies interiores (14, 18), y para determinar una desviación estándar de la densidad óptica dentro de al menos una parte de las células sanguíneas rojas, y para usar el valor medio de densidad óptica máxima como el valor medio de la densidad óptica de los píxeles que están ópticamente alineados con las células sanguíneas rojas que están en contacto con las superficies interiores (14, 18), cuando la desviación estándar es igual o inferior a un valor predeterminado.
- 40 15.- El aparato de la reivindicación 14, en el que el analizador programable (50) adaptado para determinar el valor medio de densidad óptica máxima de al menos una parte de las células sanguíneas rojas, es adaptado adicionalmente para realizar de manera iterativa dicha determinación con diferentes grupos de las células sanguíneas rojas que están en contacto con ambas superficies interiores (14, 18), hasta que la desviación estándar del valor medio de densidad óptica máxima sea igual o inferior a un valor predeterminado.
- 45 16.- El aparato de la reivindicación 12, en el que las superficies interiores (14, 18) de los paneles (12, 16) son sustancialmente paralelas, y la altura está dentro del intervalo de aproximadamente dos micrómetros a seis micrómetros.

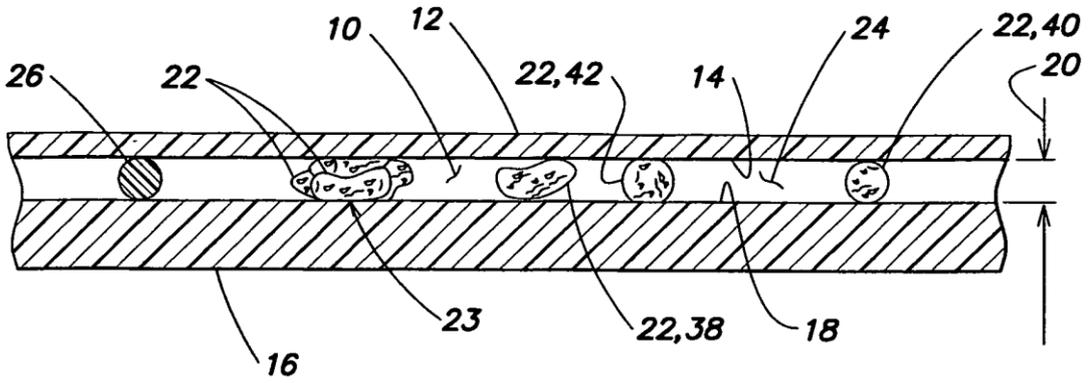


FIG. 1

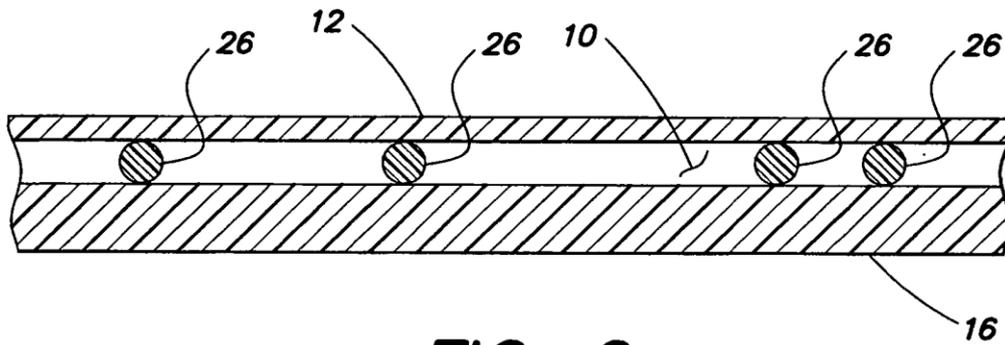


FIG. 2

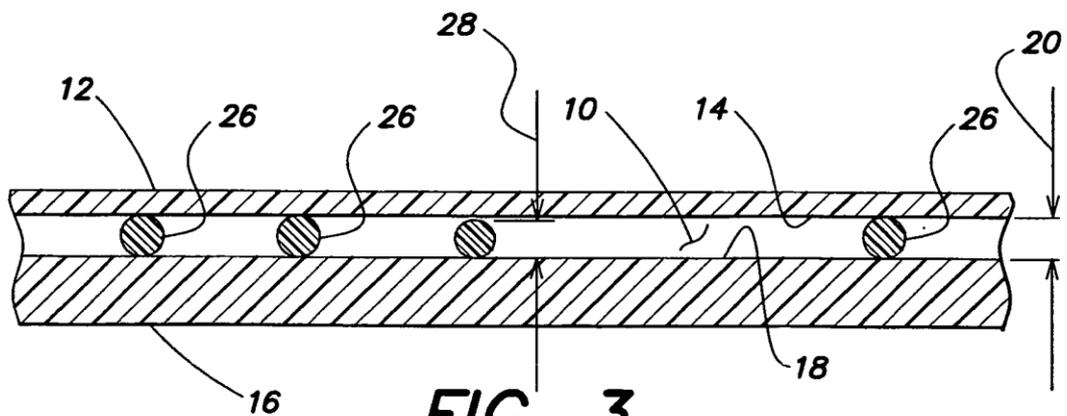


FIG. 3

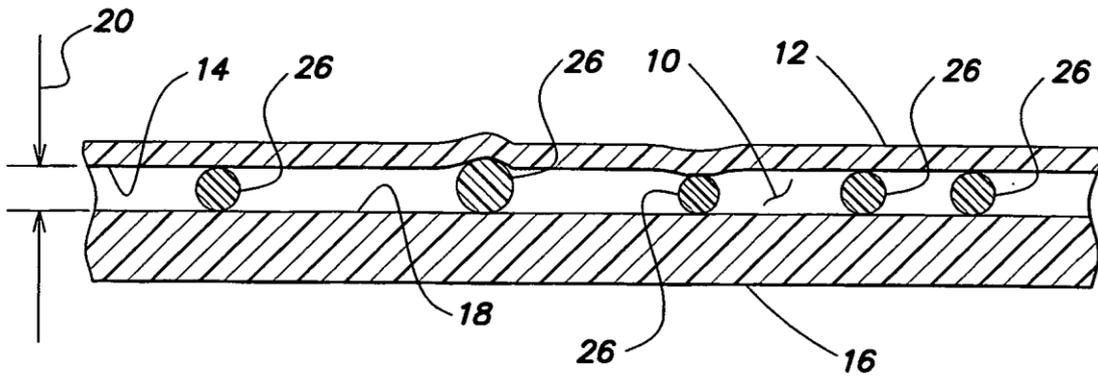


FIG. 4

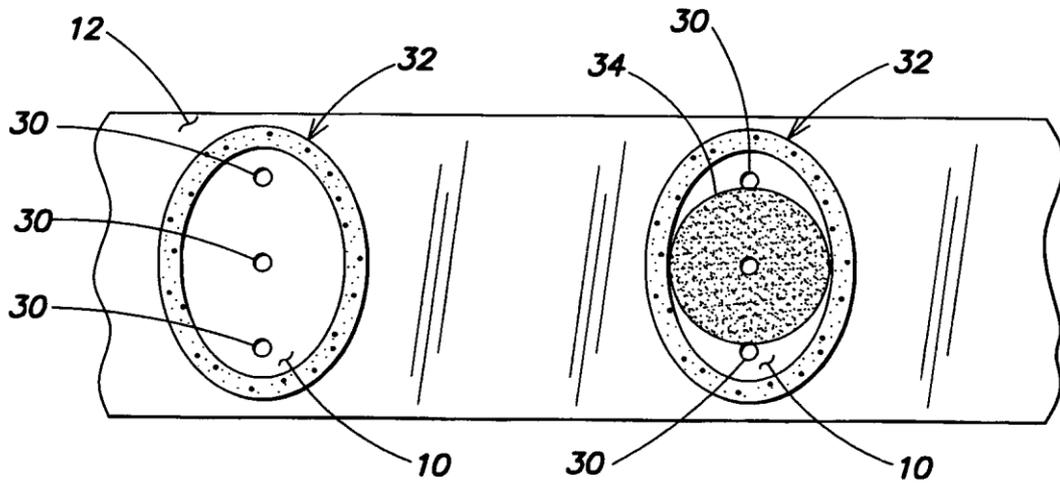


FIG. 5

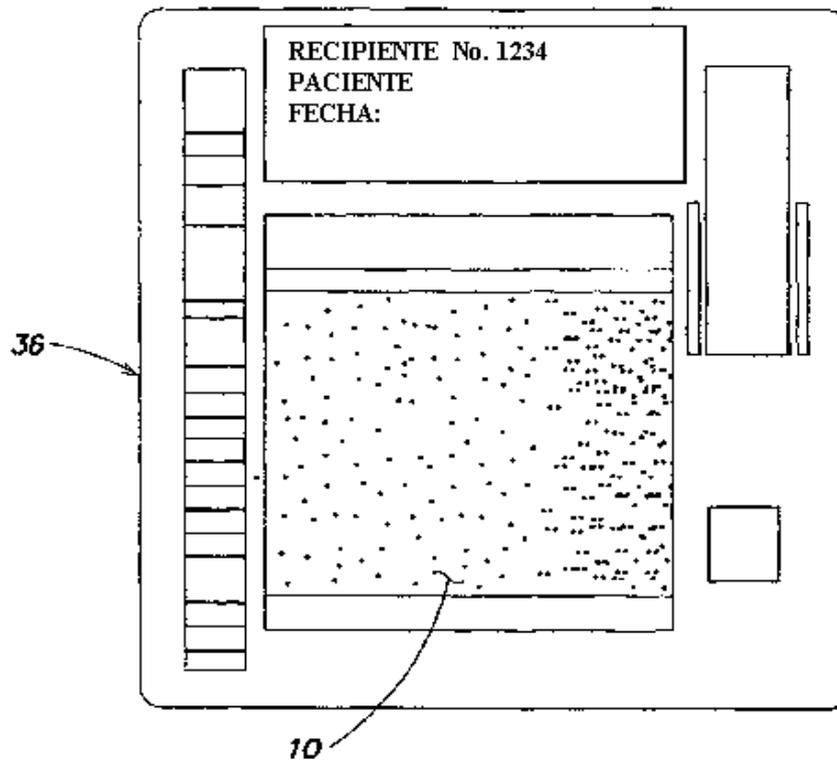


FIG. 6

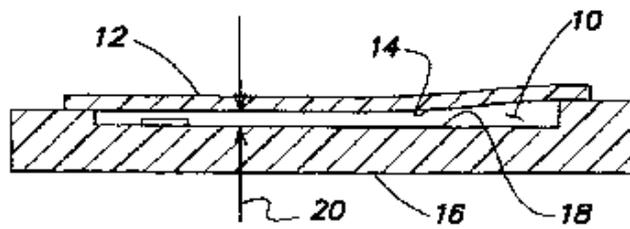


FIG. 7

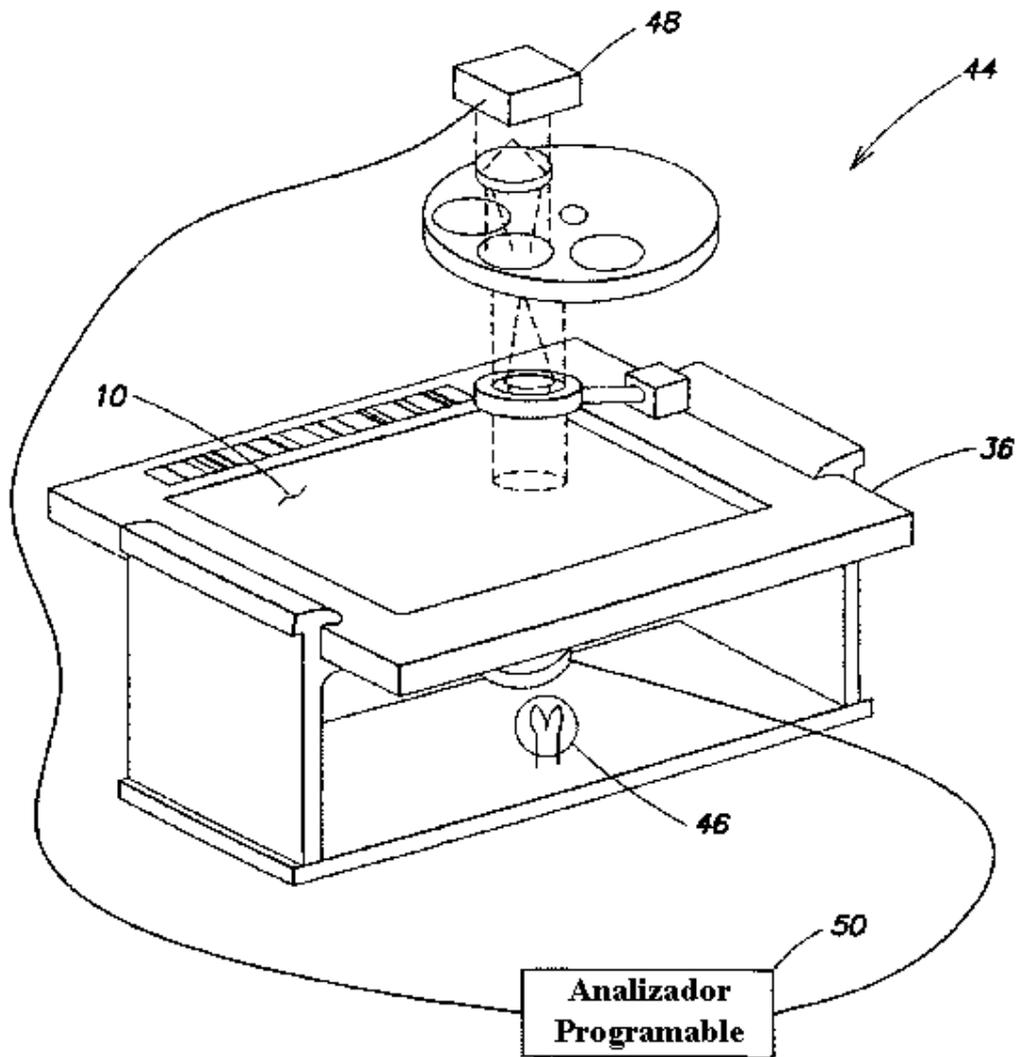


FIG. 8

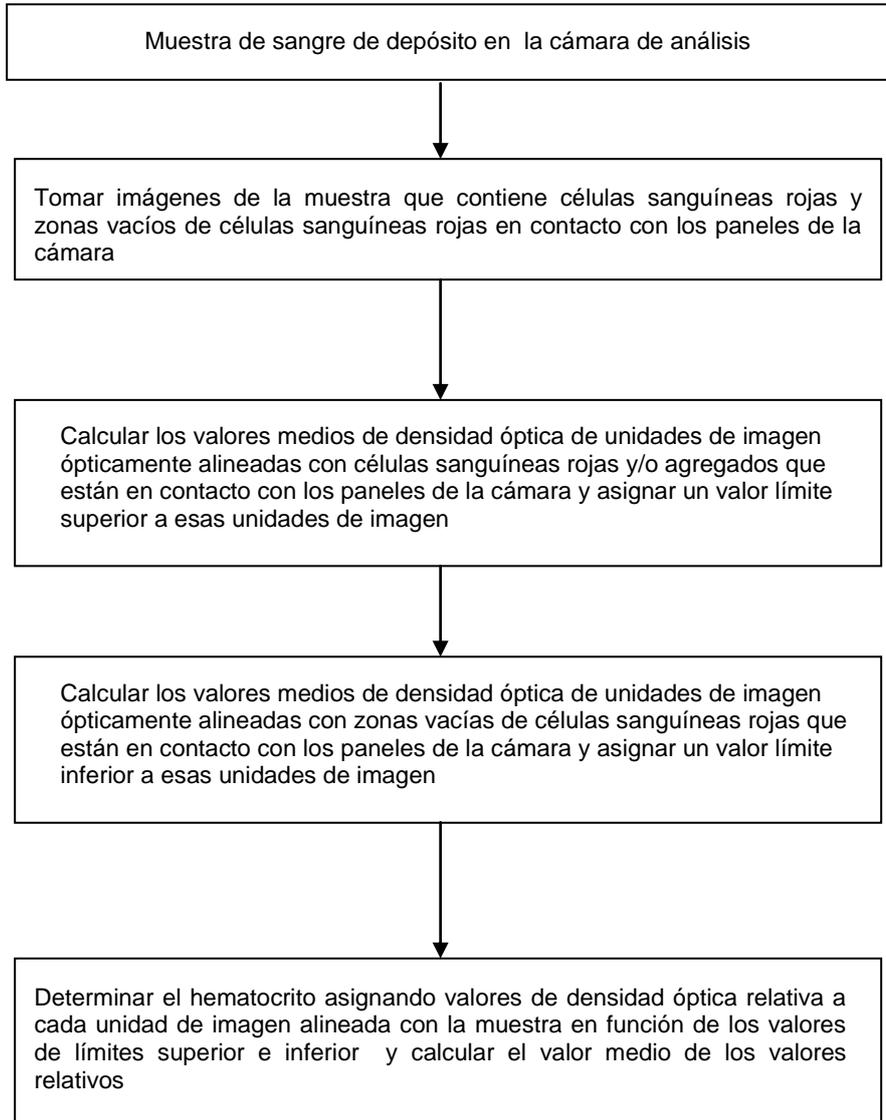


FIG. 9