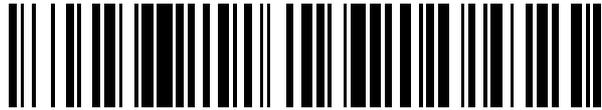


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 464 572**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/49** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2009 E 12190944 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014 EP 2554987**

54 Título: **Método y aparato para determinar los índices de células sanguíneas rojas en una muestra de sangre utilizando la pigmentación intrínseca de la hemoglobina contenida en las células sanguíneas rojas**

30 Prioridad:

**21.03.2008 US 38545**  
**21.03.2008 US 38557**  
**21.03.2008 US 38559**  
**21.03.2008 US 38574**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.06.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 464 572 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método y aparato para determinar los índices de células sanguíneas rojas en una muestra de sangre utilizando la pigmentación intrínseca de la hemoglobina contenida en las células sanguíneas rojas

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

#### 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 volumen de una célula sanguínea roja así como del volumen medio de células de una muestra en particular.

#### 2. Información de los antecedentes

10 El documento WO 99/44593 A describe el análisis de muestras de sangre entera anticoagulada quiescente.

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 la malaria) o bien en las RBC o tripanosomas que son extracelulares u organismos de leishmaniasis que están en las WBC así como muchos 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 12ª 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 un volumen exacto 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, unidos a anticuerpos dirigidos contra epítopos superficiales presentes en células o tipos de partículas, excitar las partículas teñidas con luz de longitudes de onda apropiadas, y analizar la emisión de las partículas/células individuales.

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 muestra 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 y peces en los que las células sanguíneas rojas y trombocitos están nucleados y ciertos mamíferos en los que el tamaño de las células sanguíneas rojas es muy pequeño y se puede confundir con las plaquetas.

La cantidad de información que se puede determinar examinando la sangre de un humano o de un animal es enorme. Es particularmente útil para determinar los índices de RBS, por ejemplo, tamaño de células individuales,

5 contenido y concentración de hemoglobina en células individuales y estadísticas de población de RBC dentro de una muestra. Los valores estadísticos medios y de dispersión (por ejemplo coeficientes de variación) para cada uno de los parámetros anteriormente mencionados pueden proporcionar una importante información, como resulta evidente de su discusión dentro de el texto anteriormente referenciado de Wintrobe, el cual ha permitido a los médicos catalogar mejor los trastornos de RBC.

**Sumario de la invención**

Según un aspecto de la presente invención, se proporcionan métodos para determinar un volumen de célula de una célula sanguínea roja dentro de una muestra de sangre, según las reivindicaciones 1 a 13.

10 Los métodos pueden comprender las etapas de: determinar el volumen de células para una pluralidad de células sanguíneas rojas en contacto con ambas superficies interiores; y determinar un volumen medio de células usando el volumen de células determinado por cada pluralidad de células sanguíneas rojas. Se pueden captar imágenes de la muestra entera.

15 Los métodos pueden comprender además la etapa de mezclar un agente de formación de esferas isovolumétricas con al menos una parte de la muestra. El agente de formación de esferas isovolumétricas puede ser un detergente anfótero.

Las superficies interiores de los paneles pueden ser sustancialmente paralelos, y se puede conocer la altura de la cámara antes de la determinación del volumen de células. La altura de la cámara puede estar dentro del intervalo de aproximadamente dos micrómetros a seis micrómetros.

20 Los métodos pueden comprender además las etapas de: captar imágenes de una pluralidad de células sanguíneas rojas dentro de la muestra, teniendo cada una una parte en contacto con ambas superficies interiores; determinar para cada célula sanguínea roja una densidad óptica de la parte de esa célula sanguínea roja en contacto con ambas superficies interiores con un criterio por unidad de imagen; y determinar un valor medio de la densidad óptica máxima usando la densidad óptica determinada para la parte de cada pluralidad de células sanguíneas rojas en contacto con ambas superficies interiores.

25 Los métodos pueden comprender además las etapas de: captar imágenes de una o más células sanguíneas rojas que no están en contacto con ambas superficies interiores; determinar una densidad óptica de las células sanguíneas rojas que no están en contacto con ambas superficies interiores; determinar un volumen de células para una o más células sanguíneas rojas que no están en contacto con ambas superficies interiores, usando la densidad óptica de esa célula sanguínea roja, el valor medio determinado de la densidad óptica máxima, y la altura de la cámara.

La muestra puede tener una primera parte mezclada con un agente de formación de esferas isovolumétricas y una segunda parte libre de agente de formación de esferas isovolumétricas.

35 Al menos algunas de una o más células sanguíneas rojas que no están en contacto con ambas superficies interiores pueden estar dentro de la segunda parte de la muestra, y el método puede comprender además la etapa de determinar la morfología sin alterar en al menos una o más de las células sanguíneas rojas dentro de la segunda parte que no están en contacto con ambas superficies interiores.

40 Los métodos pueden comprender además las etapas de: captar imágenes de al menos una célula sanguínea roja que no está en contacto con ambas superficies interiores; determinar la densidad óptica de la célula sanguínea roja que no está en contacto con ambas superficies interiores; determinar la concentración de hemoglobina de la célula sanguínea roja que no está en contacto con ambas superficies interiores, usando el valor medio determinado de la densidad óptica para las células sanguíneas rojas en contacto con ambas superficies interiores.

Los métodos pueden comprender además la etapa de mezclar un colorante supravital con la muestra, el cual es operable para producir reticulina dentro de reticulocitos dentro de la muestra para emitir radiación fluorescente cuando se excitan por luz de una o más longitudes de onda predeterminadas.

45 Los métodos pueden comprender además la etapa de determinar una cantidad relativa de reticulina dentro de uno o más reticulocitos fluorescentes.

50 Los métodos pueden comprender además las etapas de: captar imágenes de una pluralidad de células sanguíneas rojas, estando al menos una parte de cada una de dicha células sanguíneas rojas en contacto con las superficies interiores, donde la captación de imágenes se realiza usando luz que es absorbida por la hemoglobina dispuesta dentro de las células sanguíneas rojas; captar imágenes de la pluralidad de células sanguíneas rojas a las longitudes de onda predeterminadas operables para producir la reticulina dispuesta dentro de los reticulocitos dentro de la muestra para emitir radiación fluorescente; determinar el volumen de células para cada pluralidad de células sanguíneas rojas; y determinar un volumen medio de células usando el volumen de células para cada pluralidad de células sanguíneas rojas, excluyendo del volumen medio de células el volumen de células de cada célula sanguínea roja que emite radiación fluorescente.

La etapa de captar imágenes se puede realizar en una o más longitudes de onda predeterminadas, y la determinación de la concentración de hemoglobina puede utilizar un coeficiente de extinción molar de hemoglobina para una o más longitudes de ondas predeterminadas.

5 Los métodos pueden comprender además las etapas de: determinar la concentración de hemoglobina de la célula sanguínea roja, usando la densidad óptica determinada para la parte de la célula sanguínea roja en contacto con ambas superficies interiores; y determinar el contenido de hemoglobina dentro de la célula sanguínea roja usando la concentración de hemoglobina y el volumen de célula.

10 Los métodos pueden comprender además las etapas de: determinar el contenido de hemoglobina dentro de una pluralidad de células sanguíneas rojas, teniendo cada una una parte en contacto con ambas superficies interiores; determinar un contenido medio de hemoglobina usando el contenido de hemoglobina determinado para cada una de la pluralidad de células sanguíneas rojas.

La muestra de sangre puede estar sustancialmente no diluida. La muestra de sangre puede ser sangre entera. La unidad de imagen puede ser un pixel.

15 En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un aparato para determinar un volumen de células de al menos una célula sanguínea roja dentro de una muestra de sangre sustancialmente no diluida, según la reivindicación 16.

20 Una ventaja de la presente invención es que se puede usar para determinar las características de una muestra de sangre 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.

25 Otra ventaja de la presente invención es que puede funcionar para determinar las características de una muestra de sangre usando 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 permite realizar determinaciones exactas de su concentración relativa o absoluta dentro de distancias de camino óptico muy pequeñas, tan pequeñas como unos pocos micrómetros.

Otra ventaja de la presente invención es que es posible determinar los índices de RBC individuales en una célula particular, de manera que se pueden identificar asociaciones entre índices.

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

35 Otra ventaja del método de la presente invención es que a diferencia de los contadores de impedancia, el aparato de la presente invención no necesita ser calibrada cada vez que se usa. El aparato de la presente invención no es tampoco objeto de variaciones tales como la forma de las células, la orientación de las células a medida que fluyen a través un orificio de los contadores de células de tipo impedancia para su medida, o los efectos de osmolalidad de los fluidos diluyentes necesarios para el recuento por impedancia.

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**

40 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.

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

La Figura 9 es una vista aumentada de una parte de la cámara de análisis mostrada en la Figura 1.

La Figura 10 es un diagrama de bloques que ilustra las etapas del método para determinar la concentración de hemoglobina dentro de una célula sanguínea roja, y la concentración media de hemoglobina dentro de una pluralidad de células sanguíneas rojas según un aspecto de la presente invención.

La Figura 11 es un diagrama de bloques que ilustra las etapas del método para determinar el volumen de célula de una célula sanguínea roja, y el volumen medio de las células de una población de células sanguíneas rojas según un aspecto de la presente invención.

5 La Figura 12 es un diagrama de bloques que ilustra las etapas del método para determinar el contenido de hemoglobina de una célula sanguínea roja, y el contenido medio de hemoglobina de una población de células sanguíneas rojas según un aspecto de la presente invención.

### Descripción detallada de las realizaciones de la invención

10 El método y aparato de la presente invención para analizar una muestra de sangre entera sustancialmente no diluida permite la determinación del volumen de célula (CV) de una célula sanguínea roja (RBC), el volumen medio de las células (MCV), la concentración de hemoglobina de una célula (CHC), la concentración media de hemoglobina de las células (MCHC), y el contenido medio de hemoglobina de las células (MCH), así como sus valores estadísticos de población, sin añadir ningún colorante, reactivo (aparte de anticoagulantes en algunas realizaciones) o diluyentes a la muestra.

15 El presente método utiliza una cámara de análisis que es operable para contener de forma quiescente una muestra de sangre entera anticoagulada sustancialmente no diluida para su análisis. La cámara tiene típicamente un tamaño para contener aproximadamente 0,2 a 1,0  $\mu$ 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. Estos reactivos se añaden generalmente en forma seca 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, y dicho movimiento no está inutilizando el uso del dispositivo de esta invención.

35 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 través de los mismos 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.

50 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 espaciado 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.

60 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 14, 18 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 los 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 ejemplos 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 4204A, con un diámetro de cuatro micrómetros (4  $\mu\text{m}$ ). 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, y las Solicitudes de Patentes Provisionales de EE.UU. números 61/041.783, archivada el 2 de abril de 2008; y 61/110.341, archivada el 31 de octubre del 2008.

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 mas 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 22 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  $\mu\text{m}$ ) 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 aquellas realizaciones de cámaras que no utilizan separadores 26, se puede determinar la altura 20 de la cámara 10 como una parte del procedimiento de fabricación de la cámara y proporcionada con la cámara. De manera alternativa, la altura 20 de la cámara 10 se puede determinar usando una variedad de técnicas que incluyen el uso de una cantidad conocida de colorante sensible, o el uso de características geométricas dispuestas dentro de la cámara, que se pueden usar para determinar el volumen de muestra para un área de campo conocida, y consiguientemente la altura de la cámara. Estas técnicas y otras se describen en las Patentes de EE.UU. N° 6.723.290 y 6.929.953. Sin embargo, la presente invención no se limita a estas técnicas.

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. Las RBC 22 en su estado natural tienen 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, un elevado porcentaje de las RBC 22 con forma de disco no estará en contacto con ambos paneles 12,16 de la cámara. El aumento del número de RBC 22 que tienen una geometría sustancialmente esférica aumentará el número de RBC 22 en contacto con ambos paneles 12, 16, incluyendo algunas células 42 que están contraídas por los paneles de la cámara, pero que de otro modo serían esféricas. El agente de formación de esferas isovolumétricas puede estar dispuesto en una región individual de una cámara 10 (por ejemplo, colocando una parte particular de una superficie interior). En ausencia de mezclado de muestra dentro de la cámara 10, el agente se mezclará sólo con la parte de la muestra próxima a dicho agente, dejando, de este modo, otras partes de la muestra sin tratar por dicho agente de formación de esferas.

Esta falta selectiva de una parte de las RBC 22 para formar esferas isovolumétricas permite, como se describirá a continuación, examinar la morfología cualitativa de las RBC 22 mediante análisis de imagen así como la presentación de imágenes a un médico para inspeccionar características tales como su redondez, su forma, y la presencia de protuberancias en las células. La formación de esferas isovolumétricas no perturba ninguno de los análisis cuantitativos de las RBC 22.

El análisis de la muestra dispuesta de forma quiescente dentro de la cámara 10 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 definida 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 aumento de un dispositivo de captación de imágenes se puede describir también en términos lineales (por ejemplo, micrómetros por píxel en el plano focal), donde la dimensión lineal está a lo largo de un eje particular de una rejilla ortogonal aplicada a la imagen. El área real de la muestra capturada por píxeles (u otra unidad de imagen) del sensor en el plano focal es, por lo tanto, una función del factor de aumento aplicado por el dispositivo de formación de imágenes. Por lo tanto, el aumento del dispositivo de captación de imágenes ha de ser conocido o determinable. El volumen asociado a ese píxel es, por lo tanto, el área de la imagen por píxel por la altura conocida de la cámara, ya que el punto en la cámara que fue detectado es uno en el que la RCB se extiende a través de toda la cámara. Por ejemplo, si el aumento fuese de 0,5 micrómetros por píxel, una imagen que ocupa 200 píxeles tendría un área de 50 micrómetros cuadrados, y un volumen de 50 micrómetros cuadrados por la altura de la cámara.

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 de las RBC dentro de una muestra de sangre humana en vista de la elevada absorción de luz que ocurre dentro de la hemoglobina a las longitudes de onda anteriormente mencionadas, lo cual se refleja en el elevado coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) a las longitudes de onda anteriormente mencionadas) 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 de imagen 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 44 se adapta para determinar un valor de OD asociado a la señal de luz detectada con un criterio por unidad de imagen para una parte de la muestra de la que se han captado imágenes. La OD de una RBC 22 se determina por la concentración de hemoglobina dentro de la célula, el coeficiente de extinción molar (también denominado absortividad molar) para la hemoglobina a una longitud de onda dada, y la distancia del camino óptico recorrida a través de la hemoglobina, y se puede representar por la siguiente relación:

$$OD = \epsilon cL$$

en la que  $\epsilon$  = coeficiente de extinción molar de la hemoglobina,  $c$  = concentración de hemoglobina, y  $L$  = la distancia recorrida a través de la RBC 22 (es decir, la hemoglobina dispuesta dentro de la célula). El coeficiente de extinción molar es una propiedad intrínseca de la hemoglobina que se puede obtener de la experimentación, o mediante datos empíricos comúnmente disponibles. En realizaciones del dispositivo de análisis que utilizan fuentes de luz que tienen un margen de error (por ejemplo, un LED que tiene un diseño considerando la longitud de onda, más o menos cierta cantidad), resulta útil para fines de exactitud calibrar inicialmente el dispositivo y determinar el coeficiente de extinción molar de la hemoglobina, el cual se puede usar luego con ese dispositivo particular hasta que se reemplace la fuente de luz, en cuyo momento el dispositivo se puede recalibrar.

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 22 que están en contacto con ambas superficies interiores de la cámara 10 tienen un perfil de OD similar al de una esfera parcialmente comprimida. Los bordes laterales de las células 22 que no están en contacto con las superficies 14, 18 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 22 (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 14, 18 (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 22 (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, y no está limitado a las RBC en contacto con ambas superficies interiores.

En algunas realizaciones, el dispositivo de análisis 44 está adaptado además para determinar un valor medio de OD máxima para un grupo de RBC 22 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 22 identificado como que está en contacto con ambas superficies interiores 14, 18, 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 22 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 22 en contacto con ambos paneles 12, 16, o el grupo existente se puede ampliar, hasta que el análisis anteriormente mencionado establezca un grupo de RBC 22 que tenga un valor medio de OD máxima con una desviación estándar aceptable. Un valor medio de OD máxima de las RBC 22 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 14, 18 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 22 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 exactitud aceptable; por ejemplo, para muestras procedentes de un individuo que tiene parámetros normales de 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 de sangre puede requerir el análisis de 1000 o más RBC. El número específico de RBC 22 y/o agregados de RBC 23 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 22 y/o agregados de RBC 23 dentro de una muestra, y puede incluir todas (por ejemplo, miles) de las RBC 22 y/o agregados de RBC 23 en contacto con ambas superficies 14,18.

Haciendo ahora referencia a las Figuras 9 y 10, el dispositivo de análisis 44 se adapta además para determinar la concentración de hemoglobina ("CHC") de una RBC 22 examinado una parte 25 de una RBC en contacto con ambas superficies interiores 14, 18 de la cámara 10. La concentración de hemoglobina es uniforme dentro de cualquier RBC dada. El valor de OD se determina con un criterio por píxel (u otra unidad de imagen). La señal de OD por píxel es representativa de la señal de OD atribuible a la altura "L" de la parte de la cámara "alineada" con dicho píxel. En la determinación de la CHC, la OD se detecta, al altura de la cámara o bien se conoce o se puede determinar, y el coeficiente de extinción molar de la hemoglobina ( $\epsilon$ ) se conoce. Por lo tanto, la CHC se determina usando la relación entre la densidad óptica (OD), el coeficiente de extinción de la hemoglobina ( $\epsilon$ ), y la longitud del camino a través de la hemoglobina (L), la cual, para una parte 25 de una RBC 22 en contacto con las superficies interiores de la cámara es igual a la altura de la cámara:

$$OD = \epsilon c L, \quad c = OD / \epsilon L,$$

La concentración media de hemoglobina de la célula ("MCHC") de una RBC 22 se determina usando la misma metodología descrita anteriormente para determinar la CHC de una RBC individual, repetida para el mismo número de RBC en contacto con ambas superficies interiores de la cámara, usando los resultados para determinar un valor medio y una desviación estándar aceptable.

Haciendo ahora referencia a las Figuras 9 y 11, el dispositivo de análisis 44 se adapta además para determinar el volumen de célula ("CV") de una RBC individual 22 en contacto con ambas superficies interiores de la cámara 10 integrando el volumen de la RBC como una función de la OD de la hemoglobina dentro de la RBC. La integración del volumen se puede realizar usando una variedad de técnicas analíticas. Por ejemplo, según una primera técnica, se puede determinar el volumen de célula de una RBC 22 individual en contacto con ambas superficies interiores 14, 18

usando la altura de la cámara 20, el valor medio de la densidad óptica máxima determinado por la parte 25 de la RBC 22 de la que se han captado imágenes en contacto con ambas superficies interiores 14, 18, y la densidad óptica determinada para la RBC 22 entera de la que se han captado imágenes. La densidad óptica total de la RBC de la que se han captado imágenes se divide por el valor medio de la densidad óptica máxima, y el resultado se corrige para la altura de la cámara. Según otra técnica, el volumen de célula se determina dividiendo la RBC 22 individual en diferentes partes: la parte 25 que está en contacto con ambas superficies ("Región I") y una parte 27 que no está en contacto con ambas o incluso una de las superficies interiores 14, 18 ("Región II"). El volumen de la parte de la célula 25 en contacto con las superficies interiores 14, 18 se determina detectando la OD de dicha parte 25 (es decir, Región I). La OD es detectada y definida con un criterio por píxel (u otra unidad de imagen). El área de la cámara representada por el píxel se determina, como se estableció anteriormente, por el tamaño de la imagen por píxel que es una función del factor de aumento del instrumento. El volumen asociado a ese píxel es, por lo tanto, el área de la imagen por píxel multiplicado por la altura conocida de la cámara, ya que el punto de la cámara que se detectó es uno en el que la RBC 22 se extiende a través de toda la altura de la cámara 20. El volumen de la parte de RBC 25 en contacto con ambas superficies 14, 18 (es decir, Región I) se determina sumando los volúmenes asociados a cada píxel dentro del área de contacto de las dos superficies. El volumen de la parte 27 de la de la RBC 22 que no está en contacto con ambas superficies 14, 18 (es decir, Región II) se determina de manera similar. El valor de OD determinado por el área de contacto de las dos superficies se compara con el valor de OD para cada píxel dentro de la parte 27 de la RBC 22 que no está en contacto con ambas superficies 14, 18 (es decir, Región II). Puesto que el coeficiente de extinción molar de la hemoglobina ( $\epsilon$ ) es una función lineal, el valor de OD relativo de cada píxel dentro de la Región II también representa la altura de la RBC 22 asociada a ese píxel; por ejemplo, si la OD para ese píxel es el 50% de la OD en la Región I, la altura de la RBC 22 en ese punto es el 50% de la altura de la RBC en la Región I (es decir, la altura de la cámara 20). El volumen asociado a cada píxel en la Región II se determina con un criterio por píxel como se describió anteriormente y se suma para determinar el volumen en la Región II de la RBC 22. El volumen de la RBC 22 es la suma de las Regiones I y II. Disminuyendo el área de la imagen en cada píxel (es decir, aumentando la resolución) aumenta la exactitud de la determinación del volumen de célula. Estas técnicas se proporcionan como ejemplos de técnicas operables, pero el método de la presente invención no se limita a dichas técnicas.

Las técnicas anteriormente mencionadas para determinar el volumen de célula son operables para determinar el volumen de la RBC 22 particular detectada para la OD. Debido a que la OD de la hemoglobina dentro de las RBC 22 puede variar de una RBC a otra incluso dentro de una muestra particular, la determinación del volumen de la célula 22 usando la OD detectada para esa célula particular aumenta la exactitud de la determinación del volumen. Sin embargo, muchas RBC 22 no están en contacto con ambas superficies 14, 18 de la cámara 10. Para aquellas RBC 22 que no están en contacto con ambas superficies, el volumen de la célula se puede determinar usando el valor medio de la densidad óptica máxima obtenido previamente de las RBC que están en contacto con ambas superficies 14, 18. El valor medio de la densidad óptica máxima obtenido como se describe es suficientemente exacto para proporcionar un volumen exacto de las otras células 22. Como una alternativa adicional, para aquellas realizaciones de la presente invención que utilizan un agente de formación de esferas isovolumétricas, el volumen de célula para un fragmento de RBC o una RBC 22 que no está en contacto con ambas superficies interiores 14, 18 se puede determinar también asumiendo que el fragmento de RBC o la RBC anteriormente mencionados son esféricos. Si el perímetro de la RBC 22 se puede determinar usando una técnica de determinación del perfil como se describió anteriormente, el área circular se puede usar para determinar el tamaño de la esfera y, por lo tanto, el volumen de la RBC 22.

El dispositivo de análisis 44 se adapta además para determinar el volumen medio de célula ("MCV") para las RBC 22 dentro de la muestra usando la misma metodología descrita anteriormente, repetida para cierto número de RBC 22, usando los resultados para determinar un valor medio y una medida de la exactitud o confianza del valor medio, por ejemplo, un error estándar aceptable del valor medio. El número de RBC 22 necesario para determinar una MCV con una medida aceptable de exactitud dependerá de la población de RBC analizada, y dicho número puede estar comprendido en el intervalo de aproximadamente unos pocos cientos a varios miles de RCB 22. Una manera de determinar si el número de RBC, cuyos volúmenes de célula han sido determinados, es una población aceptable para determinar un MCV, es determinar de forma iterativa los volúmenes medios de células de la muestra dentro de la población y determinar el error estándar para esos valores medios, es decir, la desviación estándar de los valores medios. Una vez que la medida de exactitud, (por ejemplo, el error estándar) está dentro de un intervalo aceptable predefinido, entonces se acepta el valor de MCV.

Haciendo ahora referencia a las Figuras 9 y 12, el dispositivo de análisis 44 se adapta además para determinar el contenido de hemoglobina de la célula ("CH") de una RBC 22 integrando la concentración de hemoglobina sobre el volumen determinado ocupado por la RBC 22 individual. Para las RBC 22 en contacto con ambas superficies interiores 14, 18 de la cámara 10, el CH se determina usando la concentración (CHC) y el volumen (CV) determinados para esa RBC 22 particular, como se describió anteriormente. Si el CH se determina en base a una RBC 22 individual, entonces se puede hacer usando la CHC determinada para esa RBC 22 particular en lugar de un valor medio de CHC (MCHC), con lo que se llega a un mayor grado de exactitud. Para las RBC 22 que no están en contacto con ambas superficies interiores 14, 18 de la cámara 10, la CH se determina usando el valor medio de la densidad óptica máxima para determinar la concentración y volumen para esa RBC 22 particular.

El dispositivo de análisis 44 está adaptado además para determinar el contenido medio de hemoglobina de la célula ("MCH") para RCB 22 dentro de la muestra usando la misma metodología descrita anteriormente, repetida para cierto número de RBC 22, usando los resultados para determinar un valor medio y una medida aceptable de exactitud (por ejemplo, el error estándar del valor medio). El número de RCB 22 necesario para determinar un MCH con una medida aceptable de exactitud dependerá de la población de RBC analizada, cuyo número puede estar comprendido en el intervalo de unos pocos cientos a varios miles de RBC 22. Una vez que la medida de exactitud (por ejemplo, el error estándar) están dentro del un intervalo aceptable, entonces se acepta el valor de MCH.

Las metodologías descritas anteriormente para determinar los valores de CHC, MCHC, CV, MCV, CH y MCH son ejemplos de cómo se pueden determinar estos parámetros de una muestra de sangre sustancialmente no diluida usando la cámara y el dispositivo de análisis descritos con la presente invención. La presente invención no está limitada estos ejemplos específicos.

Con el método de la presente invención, se coloca una muestra de sangre entera sustancialmente no diluida en una cámara 10, 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 en el momento 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 presente invención no se limita a reactivos en forma seca, y se pueden usar, por ejemplo, reactivos líquidos que no diluyen 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. En ciertos análisis (por ejemplo, los que proporcionan información sobre RCB individuales), puede resultar preferible no incluir el agente agregante.

Se obtienen imágenes de al menos una parte de la muestra que está en forma quiescente dentro de la cámara 10 usando el dispositivo de análisis 44 transmitiendo luz a través de la muestra y detectando la luz transmitida. Aunque no es un requisito que se capten imágenes de toda la muestra que está dentro de la cámara 10, es preferible hacerlo ya que proporciona típicamente un análisis más completo de dicha muestra (y de todos sus constituyentes), y un aumento adicional en la exactitud, ya que la distribución de RBC 22 y de zonas vacías de RBC 24 dentro de una cámara no es típicamente homogénea para una muestra de sangre entera sustancialmente no diluida.

Se determina un grupo de RBC 22 en contacto con las superficies interiores 12, 16 de la cámara 10 mediante el dispositivo de análisis 44 usando la imagen de la parte de la muestra. Dependiendo de qué parámetro de la muestra de sangre se requiera, el dispositivo de análisis 44 determinará uno o más valores de los valores de parámetros para llegar al valor del parámetro requerido.

Una ventaja del método de la presente invención es que no es necesario tener todas las RBC 22 dentro de la muestra en contacto con cada panel de la cámara. El método se puede realizar con sólo algunas de las RBC 22 en contacto con ambas superficies interiores 14, 18 de la cámara 10. 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 pueden determinar los valores de CHC, MCHC, CV, MCV, CH y MCH de la muestra sin conocer el área o volumen total de dicha muestra dentro de la cámara 10.

Las RBC 22 identificadas y analizadas mediante la presente invención incluyen reticulocitos (células sanguíneas rojas inmaduras), que se desarrollan en la médula espinal como células nucleadas. Antes de que los reticulocitos sean liberados a la circulación, se despojan de sus núcleos. Los reticulocitos circulan durante aproximadamente un día en la corriente sanguínea antes de perder su tinte reticular (que depende de los restos tintados de ARN citoplasmático y ADN nuclear) y se desarrollan en RBC 22 maduras que contiene sólo esencialmente hemoglobina. El número relativo de reticulocitos en la muestra de sangre puede ser un indicador importante de diversos trastornos. Por ejemplo, el número de reticulocitos es un buen indicador de la actividad de producción de células rojas de la médula espinal, debido a que representa la producción reciente. Un número absoluto anormalmente bajo de reticulocitos puede ser indicativo de anemia aplásica, anemia perniciosa, afecciones malignas en la médula espinal, problemas en la producción de eritropoyetina, diversas deficiencias de vitaminas o minerales (B9, B12, y hierro), etc. Un recuento de reticulocitos absoluto anormalmente alto puede indicar una producción rápida debido a la sustitución del cuerpo de pérdidas de sangre causadas por hemorragias o hemólisis. Como consecuencia, existen motivos importantes para ser capaces de detectar y enumerar reticulocitos. En la presente invención los reticulocitos se identifican como una RBC 22 debido a que contienen hemoglobina, y debido a que puede ser teñidos para identificar el ARN y ADN restante.

Los reticulocitos se pueden distinguir también de otras RBC 22 y enumerarlos mezclando la muestra con un colorante tal como un colorante supervital tal como naranja de acridina, "naranja astrozone", o compuestos similares. Los colorantes hacen que la reticulina presente de forma natural en los reticulocitos emitan radiación fluorescente cuando son excitados con luz ultravioleta de aproximadamente 470 nm. La ubicación de las RBC 22 dentro de la muestra quiescente se puede determinar por medio de la densidad óptica de la RBC debido a la hemoglobina contenida en todos los reticulocitos y determinar a partir de las imágenes de la muestra. Los reticulocitos se pueden distinguir de las RBC22 que no contienen reticulina y de las células sanguíneas blancas mediante la captura de

5 imágenes y examinado la muestra bajo fluorescencia a una o más longitudes de onda seleccionadas (por ejemplo 470 nm) asociadas al colorante supravital. Para las RBC identificadas como reticulocitos por la presencia de hemoglobina y la fluorescencia de la reticulina, las metodologías descritas anteriormente para determinar el volumen de célula, el contenido de hemoglobina de la célula, y la concentración de hemoglobina de la célula se pueden usar para determinar los mismos parámetros para reticulocitos individuales. Además, se puede determinar información estadística (por ejemplo, valores medios y medidas de exactitud). Se puede determinar también la cantidad relativa de reticulina dentro de cada reticulocito, que varía inversamente con la madurez del reticulocito, por la intensidad de la señal fluorescente. Como consecuencia, se puede determinar una información incluso más específica referente a reticulocitos individuales así como a la población de reticulocitos. Se puede determinar la cantidad relativa de reticulina en un reticulocito individual usando o bien el área o la intensidad del pico de fluorescencia, y se puede calcular como una función del volumen de un reticulocito individual.

10 Mediante el uso de la presente invención, se pueden determinar también los índices de RBC incluyendo o excluyendo los reticulocitos. Por ejemplo, el MCV de una muestra se puede representar tanto incluyendo como sin incluir la contribución al volumen debido a los reticulocitos. La determinación del MCV sin reticulocitos puede enmascarar la microcitosis de la población que se ve afectada por el elevado tamaño de los reticulocitos. Se pueden determinar otras múltiples relaciones matemáticas entre las RBC y los reticulocitos.

15 Como se indicó anteriormente, se pueden determinar índices individuales mediante la presente invención para las RBC 22 que no están en contacto con ambas superficies interiores de los panes 14, 18. Se pueden analizar fragmentos de RBC de la misma manera, lo que permite distinguir fragmentos de RBC de otros constituyentes encontrados dentro de una muestra de sangre, por ejemplo, plaquetas, grupos de plaquetas, fragmentos de células blancas, desechos, etc. La capacidad para detectar fragmentos de RBC usando la presente invención es particularmente útil debido a que los fragmentos de RBC pueden ser indicativos de trastornos tales como anemia microangiopática, inflamación grave, y afecciones malignas extendidas. El análisis de los fragmentos de RBC dentro de una muestra de sangre que no ha sido tratada con un agente de formación de esferas isovolumétricas puede incluir, por ejemplo, un análisis morfológico para determinar características morfológicas no alteradas tales como determinaciones del tamaño, desviación de la redondez, relación perímetro a área, y características similares. La imagen de OD producida usando la presente invención permite la determinación de parámetros tales como agudeza, elipticidad, protuberancias, etc., para cada fragmento de RBC, los cuales facilitan el análisis morfológico anteriormente mencionado. Además, se puede determinar el volumen de fragmentos de células rojas midiendo sus diámetros o circunferencias y calculando el volumen de una esfera con esas dimensiones.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un método para determinar un volumen de células de una célula sanguínea roja dentro de una muestra de sangre, que comprende las etapas de:
- 5 depositar la muestra de sangre 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), donde ambos paneles (12, 16) son transparentes, y la cámara (10) tiene una altura (20) conocida o determinable que se extiende entre las superficies interiores (14, 18) de los paneles (12, 16), cuya altura (20) es tal que al menos una célula sanguínea roja (22) dentro de la muestra está en contacto con ambas superficies interiores (14, 18);
- 10 captar imágenes de al menos una célula sanguínea roja (22) que está en contacto con las superficies interiores (14,18); incluyendo una parte de la célula sanguínea roja (22) en contacto con ambas superficies interiores (14,18) y una parte que no está en contacto con ambas superficies interiores (14,18);
- 15 determinar una densidad óptica de la parte de la célula sanguínea roja (22) en contacto con ambas superficies interiores (14, 18) y una densidad óptica de la parte que no está en contacto con ambas superficies interiores (14, 18) con un criterio por unidad de imagen; y
- determinar el volumen de célula de la célula sanguínea roja (22) usando la densidad óptica determinada de la parte de la célula sanguínea roja de la que se han captado imágenes en contacto con ambas superficies interiores (14, 18), y la densidad óptica determinada de la parte de la célula sanguínea roja de la que se han captado imágenes que no está en contacto con ambas superficies interiores (14, 18),
- 20 2.- El método de la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
- determinar el volumen de células para una pluralidad de células sanguíneas rojas (22) en contacto con ambas superficies interiores; y
- determinar un volumen medio de células usando el volumen de células determinado para cada pluralidad de células sanguíneas rojas (22).
- 25 3.- El método de la reivindicación 1, en el que se obtienen imágenes de toda la muestra.
- 4.- El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de mezclar un agente de formación de esferas isovolumétricas con al menos una parte de la muestra.
- 5.- El método de la reivindicación 1, en el que las superficies interiores (14, 18) de los paneles (12, 16) son sustancialmente paralelas, y la altura de la cámara (20) se conoce antes de la determinación del volumen de células.
- 30 6.- El método de la reivindicación 5, en el que la altura de la cámara (20) está dentro del intervalo de aproximadamente dos micrómetros a seis micrómetros.
- 7.- El método de la reivindicación 1, que comprende además las etapas de:
- captar imágenes de una pluralidad de células sanguíneas rojas (22) dentro de la muestra, teniendo cada una una parte en contacto con ambas superficies interiores (14,18);
- 35 determinar para cada célula sanguínea roja (22), una densidad óptica de la parte de esa célula sanguínea roja que está en contacto con ambas superficies interiores (14, 18) con un criterio por unidad de imagen; y
- determinar un valor medio de la densidad óptica máxima usando la densidad óptica determinada para la parte de cada pluralidad de células sanguíneas rojas (22) en contacto con ambas superficies interiores (14,18).
- 8.- El método de la reivindicación 7, que comprende además las etapas de:
- 40 captar imágenes de una o más células sanguíneas rojas (22) que no están en contacto con las superficies interiores (14, 18),
- determinar una densidad óptica de las células sanguíneas rojas (22) que no están en contacto con ambas superficies interiores (14, 18);
- 45 determinar un volumen de células para una o más células sanguíneas rojas (22) que no están en contacto con ambas superficies interiores (14, 18), usando la densidad óptica de esa célula sanguínea roja (22), el valor medio determinado de la densidad óptica máxima, y la altura (20) de la cámara (10).
- 9.- El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de mezclar un colorante supravital con la muestra, el cual es operable para producir reticulina dentro de reticulocitos dentro de la muestra para emitir radiación fluorescente cuando se excita por luz de una o más longitudes de onda predeterminadas.

10.- El método de la reivindicación 9, que comprende además la etapa de determinar una cantidad relativa de reticulina dentro de un o más reticulocitos fluorescentes.

11.- El método de la reivindicación 9, que comprende además las etapas de:

5 captar imágenes de una pluralidad de células sanguíneas rojas (22), estando al menos una parte de cada célula sanguínea roja (22) en contacto con las superficies internas (14, 18), donde la captación de imágenes se realiza usando luz que es absorbida por la hemoglobina dispuesta dentro de las células sanguíneas rojas (22);

captar imágenes de la pluralidad de células sanguíneas rojas (22) a las longitudes de onda predeterminadas operables para producir reticulina dispuesta dentro de los reticulocitos dentro de la muestra para emitir radiación fluorescente;

10 determinar el volumen de células para cada pluralidad de células sanguíneas rojas (22); y

determinar un volumen medio de células usado el volumen de células para cada pluralidad de células sanguíneas rojas (22), excluyendo del volumen medio de células el volumen de cada célula sanguínea roja (22) que emite radiación fluorescente.

12.- El método de la reivindicación 1, que comprende además las etapas de:

15 determinar la concentración de hemoglobina de la célula sanguínea roja (22), usando la densidad óptica determinada para la parte de la célula sanguínea roja (22) en contacto con ambas superficies interiores (14, 18); y

determinar el contenido de hemoglobina dentro de la célula sanguínea roja (22) usando la concentración de hemoglobina y el volumen de células.

20 13.- Un método para determinar un volumen de células de una célula sanguíneas roja dentro de una muestra de sangre que comprende las etapas de:

25 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), donde ambos paneles (12, 16) son transparentes, y la cámara (10) tiene una altura (20) conocida o determinable que se extiende entre las superficies interiores (14, 18) de los paneles (12, 16), cuya altura (20) es tal que al menos una célula sanguínea roja (22) dentro de la muestra está en contacto con ambas superficies interiores (14, 18);

captar imágenes de al menos una célula sanguínea roja (22) que está en contacto con las superficies interiores (14,18), y producir señales de imágenes;

30 determinar un valor de densidad óptica para una parte de la célula sanguínea roja (22) en contacto con ambas superficies interiores (14, 18), y una densidad óptica total de la célula sanguínea roja (22), ambas con un criterio por unidad de imagen; y

35 determinar un volumen de la célula sanguínea roja (22) de la que se han captado imágenes usando el valor de densidad óptica para la parte de la célula en contacto las superficies interiores (14, 18), la densidad óptica total, y la altura (20) de la cámara (10).

14.- El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la muestra de sangre no está sustancialmente diluida.

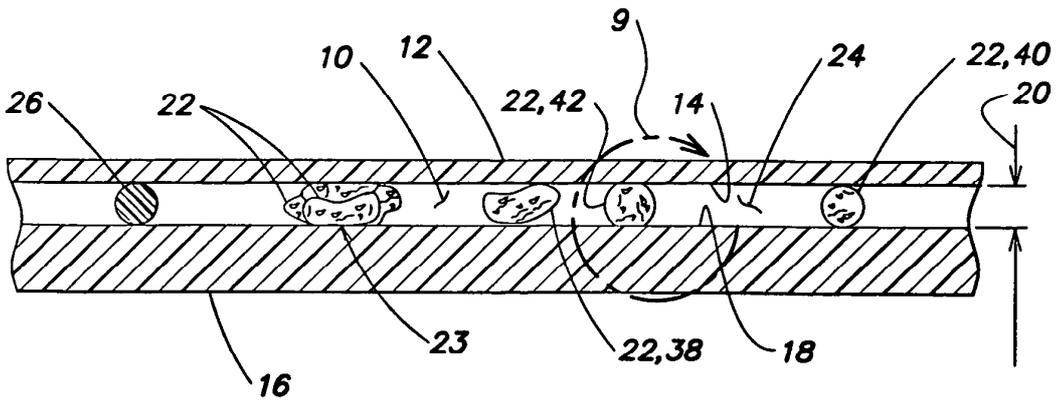
15.- El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la unidad de imagen es un pixel.

40 16.- Un aparato para determinar un volumen de células de al menos una célula sanguínea roja dentro de una muestra de sangre sustancialmente no diluida, que comprende:

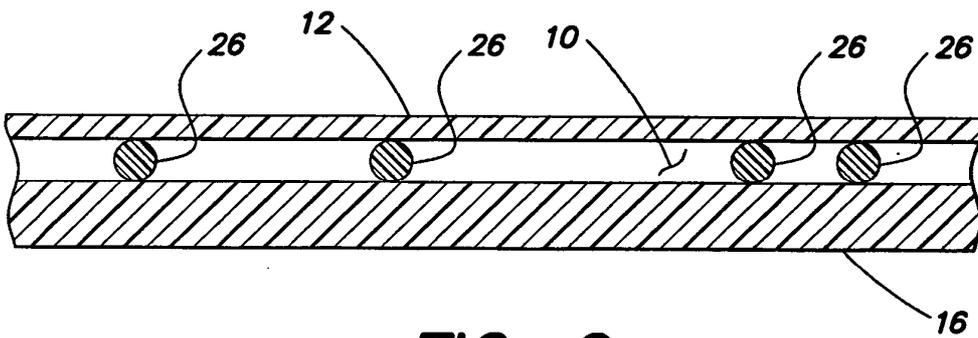
45 una cámara de análisis (10) adaptada para contener en forma quiescente la muestra para su análisis, estando la cámara (10) definida por una superficie interior (14) de un primer panel (12), y una superficie interior (18) de un segundo panel (16), donde ambos paneles (12, 16) son transparentes, y la cámara (10) tiene una altura (20) conocida o determinable que se extiende entre las superficies interiores (14, 18) de los paneles (12, 16), cuya altura (20) es tal que al menos una célula sanguínea roja (22) está en contacto con ambas superficies interiores (14, 18);

50 una unidad de captación de imágenes que incluye un iluminador (46) y un disector de imágenes (48), siendo dicha unidad operable para captar imágenes de la menos una célula sanguínea roja (22) que está en contacto con las superficies interiores (14, 18), y producir señales de imágenes representativas de dicha célula sanguínea roja (22) de la que se han captado imágenes, y un analizador programable (50) adaptado para determinar, usando las señales de imágenes, un valor de densidad óptica de al menos una célula sanguínea roja (22) que

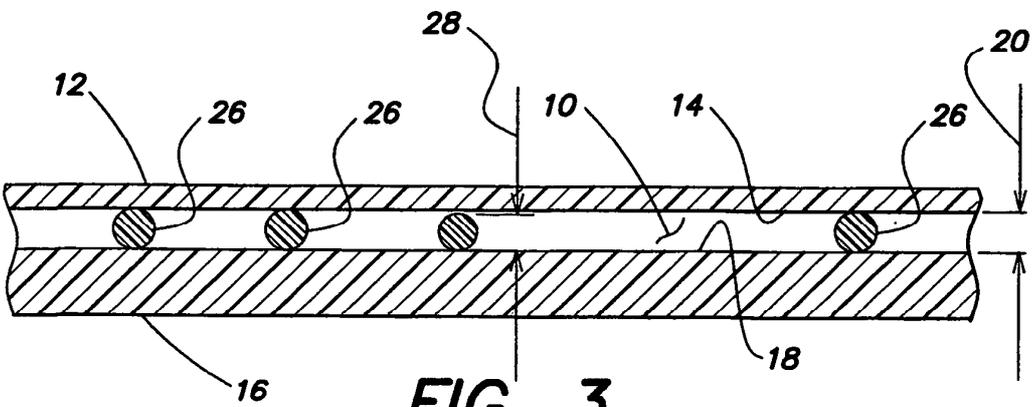
está en contacto con ambas superficies interiores (14,18) y una densidad óptica total de la célula sanguínea roja (22), y un volumen de la célula sanguínea roja de la que se han captado imágenes (22) usando la densidad óptica, la densidad óptica total, y la altura (20) de la cámara (10).



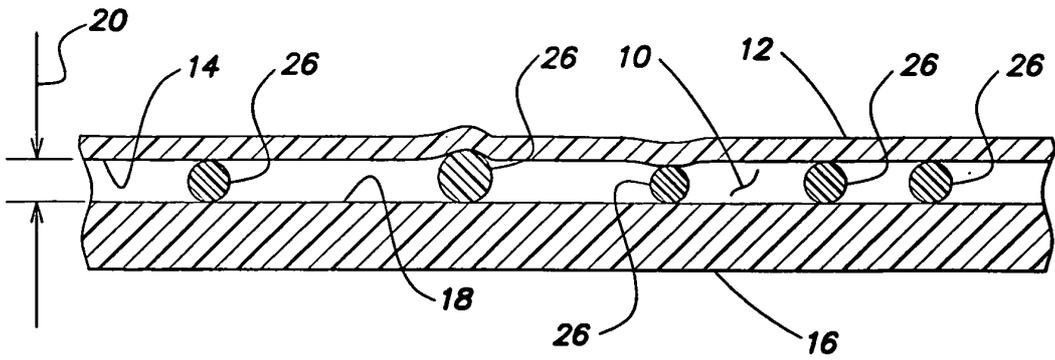
**FIG. 1**



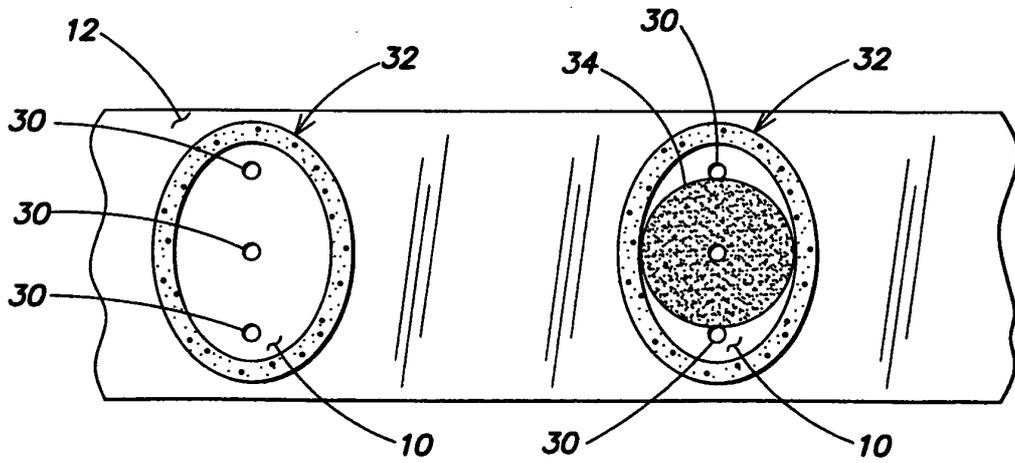
**FIG. 2**



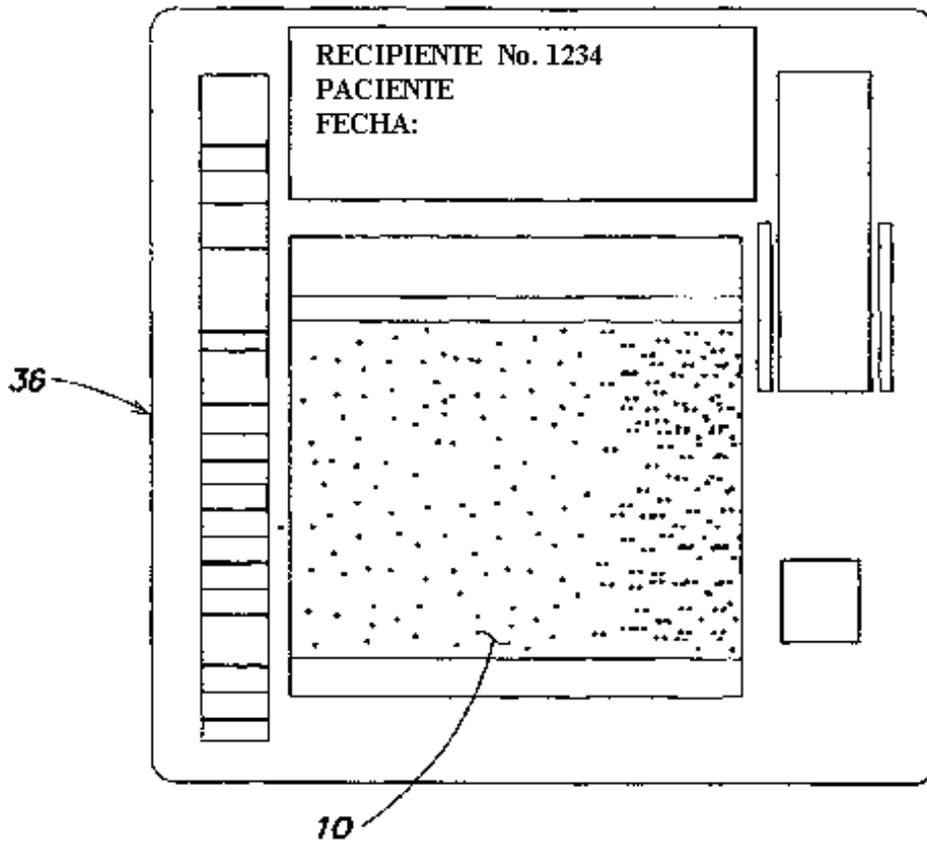
**FIG. 3**



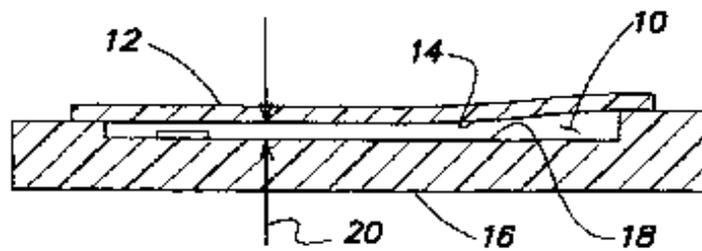
**FIG. 4**



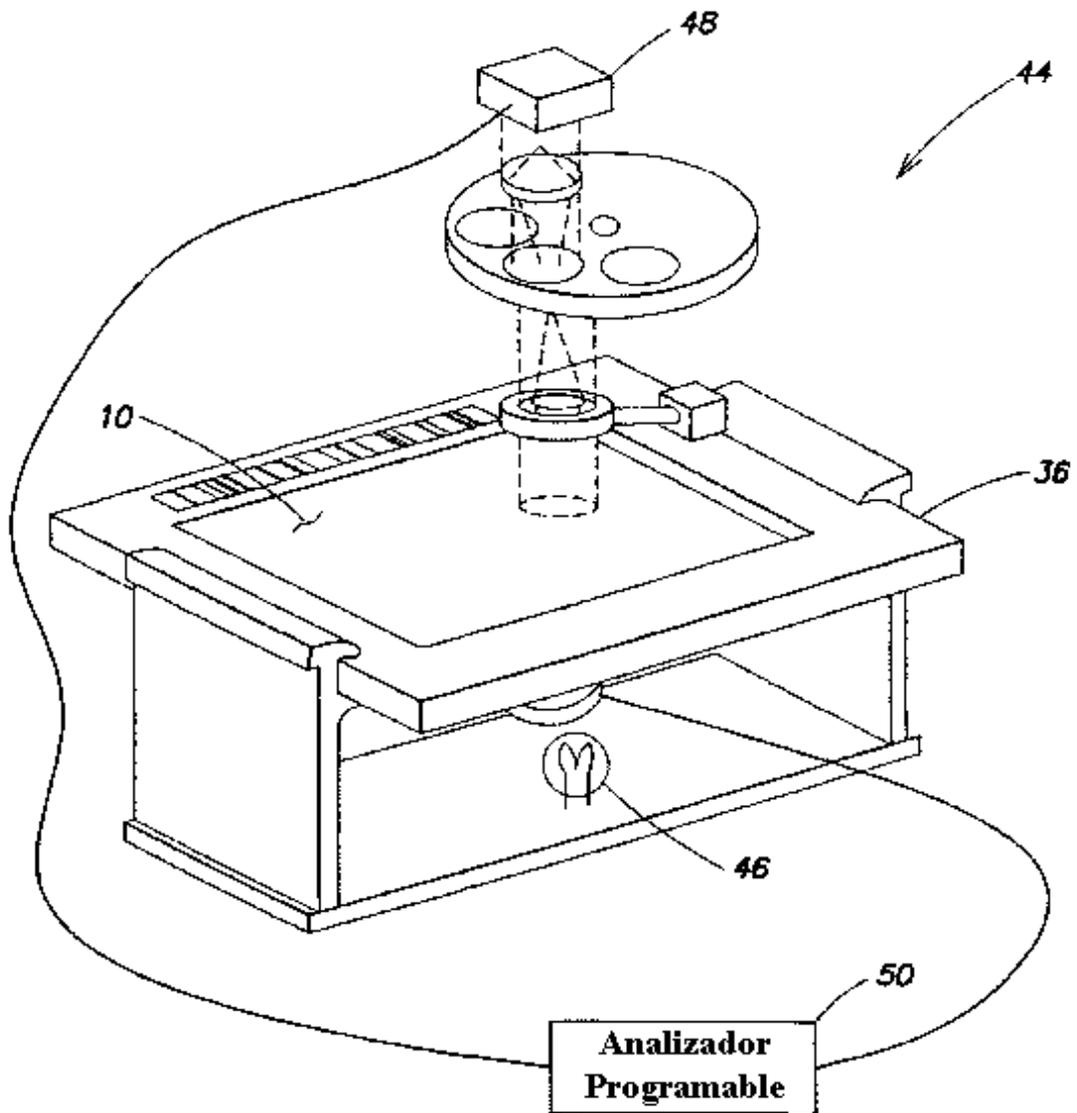
**FIG. 5**



**FIG. 6**

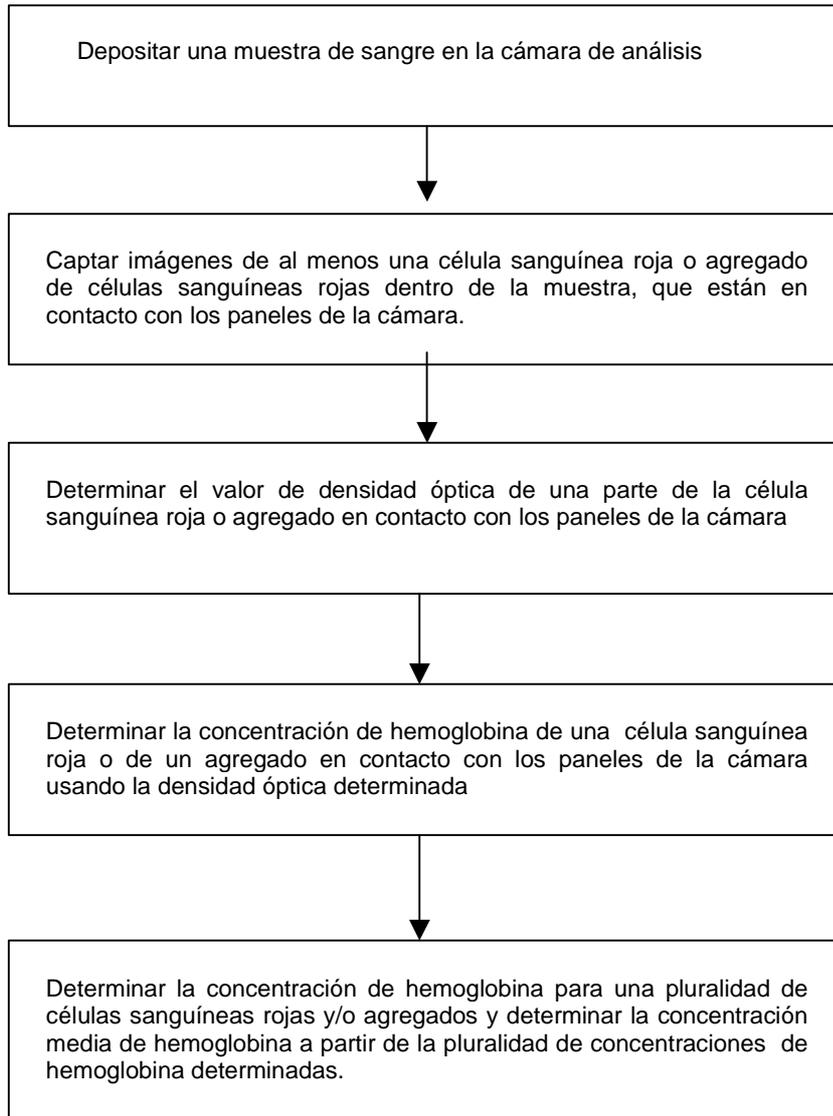


**FIG. 7**

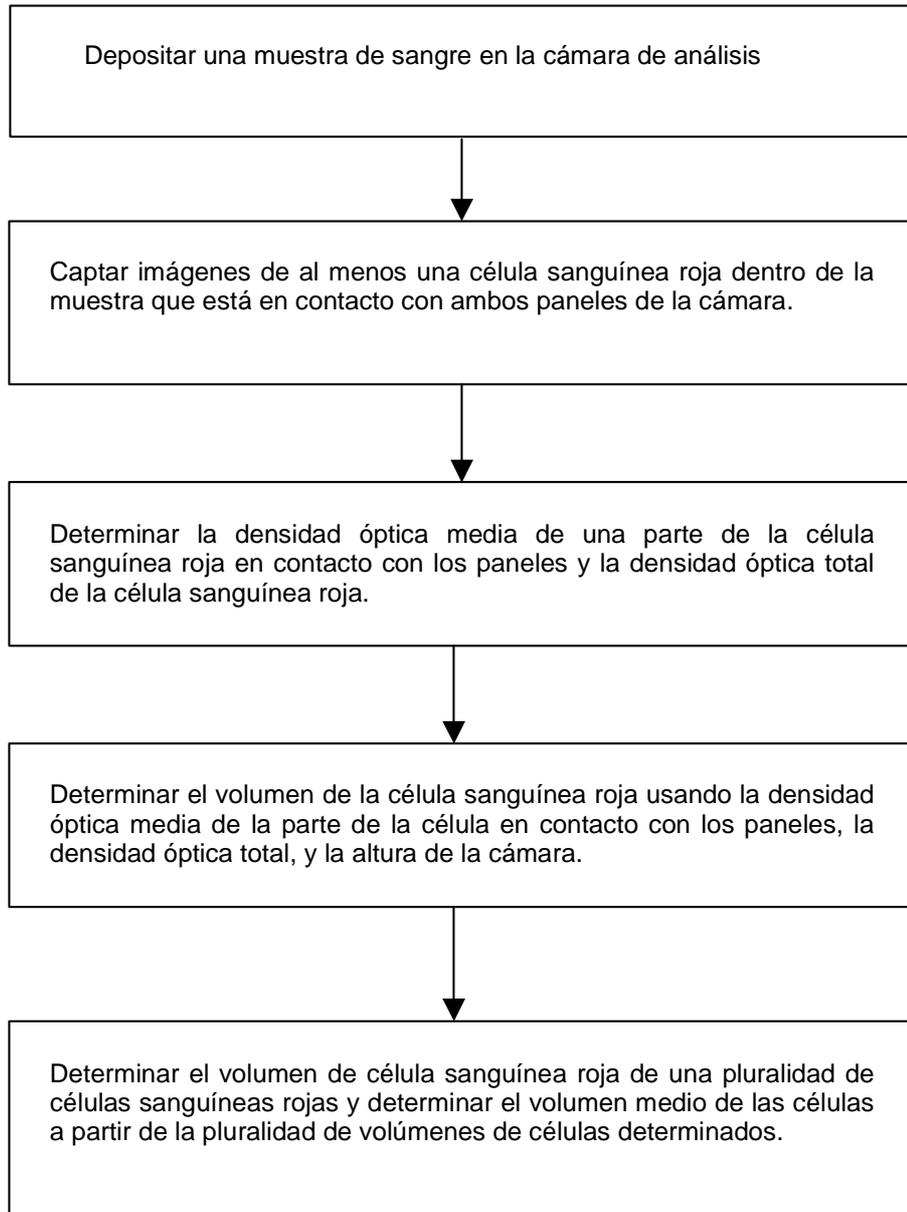


**FIG. 8**

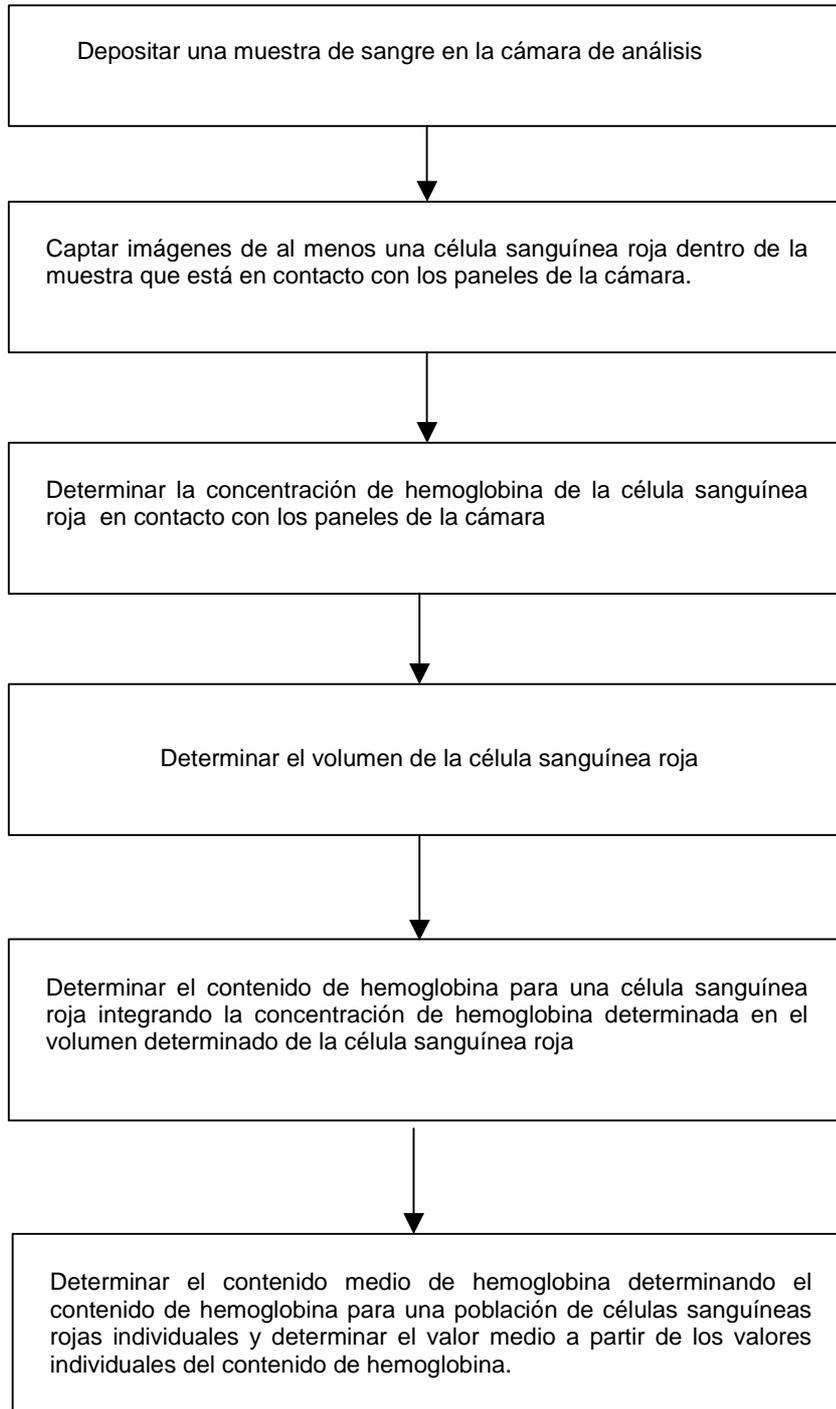




**FIG. 10**



**FIG. 11**



**FIG. 12**