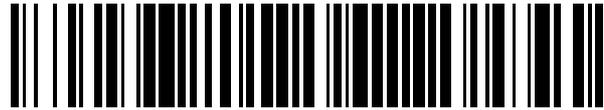


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 567**

51 Int. Cl.:

G01N 33/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2005 E 05732677 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 1733226**

54 Título: **Cámara desechable para analizar fluidos biológicos**

30 Prioridad:

07.04.2004 US 560307 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.10.2015

73 Titular/es:

LEVINE, ROBERT AARON (33.3%)
31 Pilgrim Lane
Guilford, Connecticut 06437, US;
WARDLAW PARTNERS, LP (33.3%) y
WARDLAW, STEPHEN CLARK (33.3%)

72 Inventor/es:

WARDLAW, STEPHEN C.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 548 567 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

Cámara desechable para analizar fluidos biológicos

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Campo de la Invención

10 La presente invención se refiere a cámaras para analizar fluidos biológicos en general, y a cámaras que permiten la iluminación de material particulado dentro del fluido biológico en particular.

2. Información de los antecedentes

15 El método clásico de enumeración de partículas en un medio líquido, tales como células sanguíneas en sangre entera o bacterias u otro material en la orina u otro fluido biológico, es el hemocitómetro, que incluye una cámara fabricada con una altura precisa y que tiene áreas ralladas y visibles de dimensión precisa. El líquido que contiene las partículas que se van a enumerar se introduce en la cámara. El líquido se diluye en caso necesario para reducir el número de partículas hasta un número que pueda manejarse. El operador cuenta entonces el número de partículas en un área demarcada y determinada. Ya que el área y la altura de la cámara se conocen con precisión, puede calcularse la cuenta de partículas por volumen. Aunque estas cámaras se controlan generalmente para delimitar un área conocida, esto no es necesario si tal cámara se usa en un analizador de imagen. Con un analizador de imagen, las rallas en la cámara son innecesarias ya que el campo de visión puede calcularse exactamente a partir de la imagen.

25 Ya que se fabrican con precisión, las cámaras del hemocitómetro son relativamente caras y no se consideraban desechables. Las modernas técnicas de moldeo de plástico de precisión han permitido la fabricación de algunos tipos de cámaras de hemocitómetro a suficiente bajo coste para considerarse desechables en algunos casos, pero las cámaras que necesitan una precisión sustancial y/o espesores menores que el tradicional 0,1 mm son muy difíciles de moldear con precisión.

30 La patente de Estados Unidos con nº 4.950.455 describe una cámara de conteo formada a partir de una placa de vidrio rígida y un cubreobjetos de vidrio rígido con partículas rígidas, tales como perlas de vidrio, contenidas entremedias. Las perlas mantienen una fina separación entre la placa y el cubreobjetos, formando por tanto la cámara de conteo.

35 Una cámara de conteo formada a partir de paneles superiores e inferiores, rígidos y separados por partículas rígidas tiene limitaciones sustanciales, sin embargo. En referencia a las FIGS. 1 y 2, un conjunto de la técnica anterior denotado generalmente con el número 2 consiste en una placa 3 de vidrio inferior, un cubreobjetos 4 de vidrio superior y una capa atrapada formada a partir de una pluralidad de perlas 5. Ya que cualquier perla microscópica no es completamente uniforme, con un coeficiente de variación del diámetro de hasta el 10% o más, las perlas 6 grandes "soportan" el cubreobjetos 4 hasta cierto punto, y las perlas 7 pequeñas no tienen efecto en la separación. Las diferencias en el diámetro de la perla son un problema ya que aunque es fácil determinar y/o controlar el diámetro medio de las perlas, la extensión de los diámetros no se controla tan bien, convirtiendo el sistema en menos preciso de lo deseado. Esto tiene como resultado una separación entre las capas superior e inferior de aproximadamente el diámetro medio de la perla más una desviación estándar. Un problema mayor es la presencia de residuos particulados tal como se muestra en la FIG. 2. Estos residuos pueden estar presentes cuando la cámara se fabrica o pueden introducirse mediante el ambiente o a partir de una muestra. Los residuos 8 pueden "soportar" el cubreobjetos 4 y crear una gran área de volumen incrementado en la cámara, lo que destruye su precisión.

50 Otro problema con este tipo de cámara de la técnica anterior es que es difícil empaquetar una pluralidad de tales desechables en un instrumento usado para escanear y contar partículas automáticamente, tal como un sistema de análisis de imagen.

55 El documento US 3.607.090 también describe una disposición para analizar muestras reteniendo muestras de líquido en ubicaciones absorbentes entre miembros planos.

60 Lo que se necesita es un aparato y método para superar las limitaciones de la técnica anterior, que proporcione una cámara para analizar fluidos biológicos, incluyendo la enumeración de material particulado dentro del fluido, que sea barato de producir, relativamente insensible a los residuos particulados atrapados, y dispuesto para empaquetarse para su uso en un sistema de ensayo automatizado.

SUMARIO DE LA INVENCION

65 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un aparato para analizar fluido biológico que incluye un primer miembro plano, un segundo miembro plano, y al menos tres separadores tal como se define en la reivindicación 1. Al menos uno de los miembros planos es transparente. Los separadores están dispuestos

entre los miembros, y separan los miembros para formar una cámara que tiene una altura. Al menos uno de los miembros o separadores es lo suficientemente flexible para permitir que la altura de la cámara se aproxime al tamaño medio de los separadores. Durante el uso, el fluido biológico a analizar está dispuesto dentro de la cámara.

5 De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método tal como se define en la reivindicación 13.

De acuerdo con una realización de la presente invención, cada miembro plano es una cinta que puede enrollarse en un carrete. En algunas realizaciones, los miembros planos están unidos inicialmente entre sí. En otras realizaciones, cada miembro plano está separado inicialmente del otro miembro plano.

De acuerdo con una realización de la presente invención, se proporciona un casete que tiene al menos un carrete fuente y al menos un carrete receptor. Los miembros planos se enrollan inicialmente en un carrete fuente, y se transfieren a un carrete receptor durante el funcionamiento del aparato. Una región de análisis está dispuesta entre los carretes fuente y receptor. Los miembros planos pasan a través de la región de análisis durante el funcionamiento del aparato.

Existen numerosas ventajas asociadas con la presente invención. Se descubrió que si una cámara de conteo se produce usando separadores dispuestos entre miembros planos, y si al menos uno de los miembros planos y separadores es flexible, la cámara se comporta de manera diferente de los dispositivos de la técnica anterior, y la diferencia es altamente ventajosa. Cuando una cámara de conteo se llena con un líquido, las fuerzas capilares tienden a unir los miembros planos superiores e inferiores, ejerciendo de esta manera una ligera presión en los separadores retenidos. Esta presión provocará que el elemento flexible se deforme de tal manera que provoque que el espesor de la cámara se aproxime, de media, a la dimensión media de los separadores dispuestos entre los miembros planos. Por ejemplo, si tanto los miembros planos superiores como inferiores son rígidos y los separadores son flexibles, se comprimirán unos separadores mayores que el diámetro medio, y los miembros planos se aproximarán hasta que más y más separadores entren en contacto con los miembros planos, evitando una aproximación adicional. En ese punto, la altura de la cámara se aproxima a la altura media de los separadores y es fácilmente comprobable, siempre que la desviación estándar de las alturas de los separadores sea aceptable y los separadores sean suficientemente flexibles. En otro ejemplo, si los separadores son rígidos y el miembro plano superior es flexible, el miembro plano superior se deformará y "se elevará como una tienda de campaña" en una pequeña área alrededor de cada uno de los separadores grandes y será menor sobre los separadores pequeños. La cámara tendrá una altura media que se aproximará de cerca a la altura media del separador, siempre que el miembro plano superior sea suficientemente flexible.

Una ventaja de la presente invención es, por tanto, que una cámara se forma con un volumen que puede determinarse con precisión ya que la altura de la cámara es sustancialmente uniforme.

Otra ventaja de la presente invención es que puede fabricarse de manera barata y aún así proporcionar la precisión deseada. La presente invención no requiere huecos o separadores mecanizados con precisión para establecer con precisión el volumen. Por consiguiente, la invención puede fabricarse de manera barata y aún así proporcionar la precisión deseada. Además, ya que puede fabricarse de manera barata, la presente invención puede ofrecerse prácticamente en un formato desechable.

45 Estos y otros objetos, rasgos y ventajas de la presente invención serán aparentes a la luz de la descripción detallada de la invención proporcionada a continuación, y tal como se ilustra en los dibujos adjuntos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

50 Los principios de la invención se aclaran adicionalmente en referencia a las siguientes figuras, donde:

La FIG. 1 es un esquema en sección transversal de la invención de la técnica anterior, que usa un sistema en el que todos los elementos son rígidos;

La FIG. 2 es un esquema en sección transversal de la invención de la técnica anterior, que usa un sistema en el que todos los elementos son rígidos, y donde los residuos particulados se han atrapado;

La FIG. 3 es un esquema en sección transversal de la presente invención, donde los separadores son flexibles en relación con los miembros planos superiores e inferiores;

La FIG. 4 es un esquema en sección transversal de la presente invención, donde el miembro plano superior es flexible en relación con todos los otros elementos;

La FIG. 5 es un esquema en sección transversal de la presente invención, donde el miembro plano superior es flexible en relación con todos los otros elementos y donde los residuos particulados se han atrapado;

La FIG. 6 es una vista esquemática de una primera realización de la presente invención;

La FIG. 6A es una vista esquemática de un instrumento diseñado para utilizar una segunda realización de la presente invención;

La FIG. 7 es una vista esquemática de un casete que contiene la primera realización de la presente invención;

La FIG. 8 es una vista esquemática de un instrumento diseñado para utilizar una realización de la presente invención;

La FIG. 9 es una vista esquemática del instrumento de la FIG. 6 donde la muestra se ha añadido al miembro plano;

5 La FIG. 10 es una vista esquemática de la muestra tras extenderla entre los miembros planos; y

La FIG. 11 es una vista esquemática del campo de análisis.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 En referencia a las Figuras 3-11, el aparato 10 de la presente invención para analizar fluido biológico incluye un primer miembro plano 12, un segundo miembro plano 14, y al menos tres separadores 16. Al menos uno de los miembros planos 12, 14 es transparente. Los separadores 16 están dispuestos entre los miembros 12, 14 y separan los miembros planos 12, 14 para formar una cámara 18 con una altura 20. Al menos uno de los miembros 12, 14 o separadores 16 es suficientemente flexible para permitir que la altura de la cámara entre los miembros 12, 14 se aproxime a la altura media de los separadores 16.

15 Los separadores 16 pueden tener cualquier estructura que puede estar dispuesta entre los miembros planos 12, 14, que pueda hacerse funcionar para separar los miembros planos 12, 14 entre sí. La dimensión de un separador 16 que se extiende entre los miembros planos se denomina en el presente documento altura 22 del separador 16. Las alturas 22 de los separadores 16 normalmente no son iguales entre sí exactamente, sino que entran dentro de una tolerancia comercialmente aceptable para medios de separación usados en aparatos de análisis similares. Las perlas esféricas son un ejemplo de un separador 16 aceptable y comercialmente disponible gracias a, por ejemplo, Bangs Laboratories de Fishers, Indiana, Estados Unidos.

20 En algunas realizaciones, los separadores 16 consisten en un material que tiene una mayor flexibilidad que uno o ambos del primer miembro plano 12 y el segundo miembro plano 14; es decir, en términos relativos, uno o ambos de los miembros planos 12, 14 pueden considerarse rígidos en relación con los separadores 16 y los separadores 16 pueden considerarse flexibles en relación con uno o ambos de los miembros planos 12, 14.

25 En otras realizaciones, los separadores 16 consisten en un material que tiene menos flexibilidad que uno o ambos del primer miembro plano 12 y el segundo miembro plano 14; es decir, en términos relativos, uno o ambos de los miembros planos 12, 14 pueden considerarse flexibles en relación con los separadores 16 y los separadores 16 pueden considerarse rígidos en relación con uno o ambos de los miembros planos 12, 14.

30 Sujetos a las características de flexibilidad descritas anteriormente, los miembros planos 12, 14 pueden fabricarse a partir de una variedad de materiales, siempre que al menos uno de los miembros planos 12, 14 sea transparente. Las películas de plástico transparentes que consisten en acrílico o poliestireno son ejemplos de miembros planos 12, 14 aceptables. Los miembros planos 12, 14 con la forma de una cinta son particularmente útiles ya que pueden enrollarse fácilmente en un carrete. En algunas realizaciones, uno o ambos del primer miembro plano y el segundo miembro plano incluyen una pluralidad de elementos rígidos enlazados entre sí.

35 Ahora, en referencia a la FIG. 3, en una realización de la presente invención 10, el primer miembro plano 12 y el segundo miembro plano 14 están separados mediante una cámara 18 formada mediante una pluralidad de separadores 16 en la forma de perlas esféricas. Estas perlas 16 se forman a partir de un material que tiene una mayor flexibilidad que el primer miembro plano 12 y el segundo miembro plano 14; es decir, los miembros planos 12, 14 pueden considerarse rígidos en relación con las perlas 16 y las perlas 16 pueden considerarse flexibles en relación con los miembros planos 12, 14. Pueden usarse perlas 16 de plástico formadas a partir de poliestireno, policarbonato, silicona y similares. En este ejemplo, las perlas 16A grandes se comprimen hasta el punto donde los miembros planos 12, 14 se aproximan al punto donde la mayoría de perlas 16 están tocando las superficies interiores 24 de los miembros planos 12, 14, haciendo por tanto que la altura 20 de la cámara sea ligeramente menor que el diámetro medio de la perla.

40 En la FIG. 4, en otra realización de la presente invención 10, el primer miembro plano 12 se forma a partir de un material más flexible que las perlas 16 esféricas y el segundo miembro plano 14, y cubrirá las perlas 16 de teja a modo de tienda de campaña, donde las áreas entre las perlas 16 son de una altura algo arbitraria determinada mediante los diámetros de perla que soportan esa pieza del miembro plano 12. Cualquier película de plástico transparente, tal como acrílica, de poliestireno o similar funcionará siempre que sea lo suficientemente fina para flexionarse tal como se muestra. Debería ser aparente que en esta circunstancia, aunque las pequeñas áreas locales se desviarán de la altura 20 deseada de la cámara, la altura media de todas las áreas con forma de tienda de campaña estará muy cerca de la del diámetro medio de la perla. Los ensayos indican que la altura media de la cámara puede controlarse hasta un 1% o mejor en alturas de la cámara de menos de cuatro micrómetros usando la presente invención.

45 La FIG. 5 muestra la cámara 18 de la FIG. 4, en la que se ha alojado una pieza de residuo 26 particulado. El primer miembro plano 12 sobre el residuo 26 ha adquirido la forma de una tienda de campaña, y el área bajo el residuo 26

es de altura desconocida, pero esta perturbación solo afecta a una pequeña área de la cámara 18, en comparación con lo que ocurriría si todo el sistema fuera rígido.

La FIG. 6 muestra otra realización de la invención 10, donde el segundo miembro plano 14 se forma a partir de una tira de 2,5 cm de ancho de película de plástico transparente (por ejemplo, tereftalato de polietileno (PET)) de aproximadamente cincuenta (50) micrómetros de espesor, el primer miembro plano 12 se forma a partir del mismo material que el segundo miembro plano 14 pero con un espesor de veintitrés (23) micrómetros, y la cámara 18 entremedias se forma a partir de una pluralidad de perlas 16 de plástico con un diámetro medio de cuatro (4) micrómetros. El primer miembro plano 12 tiene un revestimiento interior de un agente de coloración, tal como naranja de acridina, que coloreará de manera diferente las células sanguíneas blancas cuando se examinen con iluminación fluorescente. Otros reactivos para la fluorescencia incluyen astrozone naranja, FITC, rodamina y similares. Los reactivos que pueden usarse con luz transmitida para colorear de manera diferente las células sanguíneas blancas incluyen astrozone naranja, azul de metileno, oxacina¹⁷⁰. El primer miembro plano 12 incluye una pluralidad de puertos 28 (por ejemplo, aproximadamente trescientos (300) micrómetros de diámetro) punzonados a intervalos regulares, y los miembros planos 12, 14 se unen en algunos puntos 29 entre los puertos 28 para formar una serie de cámaras 18 de análisis separadas.

Esta separación entre los dos miembros planos 12, 14 en esta realización se logra mediante perlas 16 esféricas de diámetro conocido y controlado con precisión (por ejemplo, aproximadamente cuatro (4) micrómetros de diámetro). Estas perlas 16 se distribuyen aleatoriamente en al menos uno de los miembros planos 12, 14 y pueden unirse como parte de la película reactiva que contiene el material de coloración. El material que retiene las perlas 16 debería ser tal que estas permanezcan fijas al miembro plano 12, 14 hasta al menos después de que el movimiento de la película fluida haya cesado para que no las arrastre. Un método aceptable de revestimiento de una película con perlas 16 es suspender las perlas 16 en una solución de aproximadamente 0,5% de fitagel y aplicar un revestimiento fino de la suspensión mediante pulverización o revestimiento de menisco. La concentración óptima de perlas 16 dependerá del tipo de perla y su método de fabricación, así como de la rigidez relativa y de los miembros planos 12, 14 superiores e inferiores. Esta concentración puede determinarse empíricamente en una base de lote a lote aplicando una serie de concentraciones de perla en los miembros planos 12, 14 que se van a usar y después añadiendo un líquido que contiene un colorante, tal como hemoglobina, que aportará una densidad óptica útil en el espesor de la capa de líquido usado. La densidad óptica media de la capa de líquido se representa entonces en función de la densidad de la perla 16 para determinar el punto donde la concentración adicional de la perla no produce un cambio útil en el espesor de la capa de líquido; es decir, el punto donde la altura 20 de la cámara es sustancialmente uniforme. Un medio alternativo de proporcionar los separadores es estampar negativamente uno de los miembros planos 12, 14 con proyecciones que tienen aproximadamente la misma altura de aproximadamente cuatro (4) micrómetros, por ejemplo, grabando con láser marcas en un rodillo de presión y haciendo pasar un miembro plano 12, 14 a través del conjunto de rodillo de presión.

La FIG. 7 muestra un casete 30 que tiene una cubierta 32 en la que están dispuestos un carrete fuente 34, un carrete receptor 36 y una cinta 38 que se extiende entremedias. La "cinta 38" es la realización de la presente invención mostrada en la FIG. 6 y descrita anteriormente. Inicialmente, la cinta 38 se enrolla en el carrete fuente 34. El avance de la cinta 38 se controla mediante los rodillos 40, que aplican tracción a la cinta 38 en un punto remoto del área de examinación 42 y pueden actuar para extraer la cinta 38 del carrete fuente 34 según sea necesario. El casete 30 tiene un orificio pasante que permite que un sistema óptico proporcione iluminación a través de la cinta 38.

La FIG. 8 muestra un sistema 44 de análisis óptico que contiene el casete 32. El sistema 44 de análisis óptico consiste en componentes unidos que incluyen una lente 46, una fuente 48 de luz de longitud de onda variable y una cámara CCD 50 que pueden moverse en tres dimensiones para permitir que el sistema 44 óptico se enfoque sobre la cinta 38 en el área de examinación 42 y proporcionar un movimiento X-Y para permitir el escaneo de toda el área de examinación 42, bajo el control de un ordenador 52 de sistema. No se muestra la sonda de muestreo para extraer un fluido biológico (por ejemplo, sangre) a partir de un tubo de muestreo y depositar una pequeña gota en la cinta 38. Este dispositivo de muestreo puede tener la forma de una sonda de perforación de tubo o similar, que usa una jeringuilla de progresión accionada a motor para extraer y depositar las muestras de fluido biológico. Estos dispositivos se emplean ampliamente y son bien conocidos en la técnica y, por tanto, no se describirán en más detalle en este documento.

La FIG. 9 muestra el conjunto de la FIG. 8 justo después de haber depositado una gota de fluido biológico 54 (por ejemplo, sangre) en el puerto 28 de entrada de muestras (véase la FIG. 6) de una cámara 18 formada entre los miembros planos 12, 14.

La FIG. 10 es una vista esquemática de toda el área de la película 64 de muestreo del fluido biológico 34, que generalmente tiene un borde irregular. En este ejemplo, el fluido biológico es sangre. Ya que las células sanguíneas blancas dentro de la película 64 de muestreo tienden a atraparse de inmediato en la cámara 18, se encuentran generalmente en una mayor concentración dentro de unos pocos milímetros del puerto 28.

La FIG. 11 es una vista esquemática del campo de análisis 66 en la FIG. 10, que, en el caso de una muestra de sangre entera, mostraría las células 56 sanguíneas rojas, las células 58 sanguíneas blancas, y las plaquetas 60,

todo rodeado mediante el plasma sanguíneo 62. Las perlas 16 también se ven pero se distinguen de inmediato de todos los otros elementos debido a su tamaño e índice de refracción.

5 La caracterización de las células 58 sanguíneas blancas (conteo diferencial de las células sanguíneas blancas) se realiza mediante la clasificación de cada célula 58 sanguínea blanca e individual tal como se encuentra usando métodos de procesamiento de imagen tradicionales o mediante la técnica descrita en la patente de Estados Unidos con nº 5.321.975 y 6.350.613, patentes que se incorporan en el presente documento mediante referencia. Se han descrito un número de tinciones supravitales que colorean de manera diferente las diferentes clases de células 58 sanguíneas blancas tal como se han descrito en la patente de Estados Unidos con nº 6.235.536, que también se
10 incorpora en el presente documento mediante referencia. Ya que las células 58 sanguíneas blancas se comprimen ligeramente y su imagen se forma de inmediato, el tecnólogo puede visualizar las imágenes almacenadas de células en el caso de clasificaciones de células cuestionables.

15 Como un ejemplo de la utilidad de esta invención, el conteo de células 58 sanguíneas blancas de la película 64 de muestreo puede realizarse enumerando todas las células 58 sanguíneas blancas encontradas dentro de la película 64 de muestreo y dividiendo ese número por el volumen de la película 64 de muestreo. Aunque es posible depositar una cantidad específica de la muestra dentro de la cámara 18, es preferible depositar una cantidad aproximada y medir indirectamente el volumen. Esto puede realizarse mediante mecanismos tales como: 1) el volumen de la gota de muestreo al depositarse puede calcularse mediante formación de imágenes por interferometría usando técnicas
20 ópticas disponibles a partir de fuentes tales como Zygo Corporation de Middlefield, Connecticut, Estados Unidos; o 2) el volumen de la muestra después de la formación de la película se calcula midiendo el área de la película 64 y multiplicado esto por la altura media de la película.

25 La FIG. 6A muestra un sistema 44 de análisis óptico que contiene otra realización de la presente invención 10 que incluye un casete 30 con un carrete 68 del segundo miembro plano, un carrete 70 del primer miembro plano y un carrete receptor 72. El avance de los miembros planos 12, 14 se controla mediante los rodillos de presión 74 receptores, que aplican tracción a los miembros planos 12, 14 combinados en un punto remoto del área de examinación 42 y pueden actuar para extraer los miembros planos 12, 14 de sus carretes 68, 70 según sea necesario. El sistema 44 de análisis óptico consiste en componentes unidos que incluyen una lente 46, una fuente
30 48 de luz de longitud de onda variable y una cámara CCD 50 que pueden moverse en tres dimensiones para permitir que el sistema 44 de análisis óptico se enfoque sobre los miembros planos 12, 14 unidos en el área de examinación 42 y proporcionar un movimiento X-Y para permitir el escaneo de toda el área de examinación 42, bajo el control de un ordenador 52 de sistema. Una gota de fluido biológico 54 (por ejemplo, sangre) se muestra depositada sobre el segundo miembro plano 14. Los rodillos de presión 74 pueden funcionar para hacer avanzar los miembros planos
35 12, 14 hasta un punto justo más allá de los rodillos de presión 74, donde los separadores 16 dispuestos entre los miembros planos 12, 14 están en contacto con cada miembro plano 12, 14 y el fluido biológico contacta con la superficie interior 24 de cada miembro plano 12, 14 y se extiende para formar una película 64 fina de muestreo. Los miembros planos 12, 14 se hacen avanzar entonces para que pueda leerlos el sistema 44 de análisis óptico.

40 Ya que toda la precisión del sistema 44 cuando se usa un método de cálculo de volumen depende de la precisión de la altura 20 de la cámara, puede ser conveniente usar un medio estándar interno para calcular la altura 20 exacta de la cámara. Un ejemplo de un estándar interno incluye un material flexible o fluido que no puede mezclarse con la muestra y que contiene una concentración conocida, estable y uniforme de un colorante óptico adecuado. El material pueden ser perlas flexibles y teñidas, aceite teñido o similar, y puede estar presente en una o más áreas de la
45 cámara 18. Ya que la densidad óptica está en proporción directa con el espesor del material calibrador, la medición de la densidad óptica de la parte del material calibrador que llena completamente la altura 20 de la cámara permitirá el cálculo de la altura 20 exacta de la cámara dentro de las capacidades de precisión del sistema óptico.

50 Aunque el uso más frecuente para tal cámara 18 será la enumeración de células sanguíneas en sangre entera, es igualmente útil para la examinación de cualquier fluido sin diluir que tenga suficientes partículas para contar. La altura 20 de la cámara no se limita a los cuatro micrómetros divulgados, sino que puede ser mayor o menor para alojar diferentes tamaños y/o concentraciones del separador.

55 Aunque la presente invención se ha mostrado y descrito con respecto a las realizaciones detalladas de la misma, los expertos en la materia entenderán que pueden realizarse diversos cambios en la forma y detalle de la misma sin apartarse del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato (10) para analizar fluido biológico, que comprende:
 - 5 un primer miembro plano (12);
un segundo miembro plano (14), en el que al menos uno del primer miembro plano (12) y el segundo miembro plano (14) es transparente; y
al menos tres separadores (16) dispuestos entre los miembros planos (12, 14), teniendo cada separador (16) individualmente una altura y teniendo los separadores (16) colectivamente una altura media, separando los miembros planos (12, 14) para formar una cámara (18) con una altura (20) que se extiende entre los miembros planos (12, 14);
10 caracterizado por que al menos uno del primer miembro plano (12), el segundo miembro plano (14) o los separadores (16) puede deformarse lo suficiente para permitir que la altura (20) de la cámara sea sustancialmente igual a la altura media de los separadores (16).
 - 15 2. El aparato (10) de la reivindicación 1, en el que los separadores (16) pueden deformarse en relación con el primer miembro plano (12) y el segundo miembro plano (14)
 3. El aparato (10) de la reivindicación 1 o 2, en el que al menos uno del primer miembro plano (12) o el segundo miembro plano (14) comprende elementos rígidos enlazados.
 - 20 4. El aparato (10) de cualquier reivindicación anterior, en el que los separadores (16) son proyecciones de altura uniforme unidas al menos a uno del primer miembro plano (12) o el segundo miembro plano (14).
 - 25 5. El aparato (10) de cualquier reivindicación anterior, en el que uno del primer miembro plano (12) o el segundo miembro plano (14) comprende uno o más puertos (28).
 6. El aparato (10) de cualquier reivindicación anterior, en el que los separadores (16) se unen al menos a uno del primer miembro plano (12) o el segundo miembro plano (14).
 - 30 7. El aparato (10) de cualquier reivindicación anterior, en el que los separadores (16) incluyen perlas (16, 16A) de plástico teñidas uniformemente y ligeramente compresibles.
 8. El aparato (10) de cualquier reivindicación anterior, en el que la cámara (18) incluye un puerto (28).
 - 35 9. El aparato (10) de cualquier reivindicación anterior, en el que uno de los separadores (16), el primer miembro plano (12) y el segundo miembro plano (14), tiene una deformabilidad mayor en relación con al menos uno de los otros separadores (16), el primer miembro plano (12) y el segundo miembro plano (14).
 - 40 10. El aparato (10) de la reivindicación 9, en el que el primer miembro plano (12) tiene una mayor deformabilidad que el segundo miembro plano (14) y los separadores (16).
 - 45 11. El aparato (10) de cualquier reivindicación anterior, en el que uno del primer miembro plano (12) o el segundo miembro plano (14) comprende elementos rígidos enlazados y el otro del primer miembro plano (12) o el segundo miembro plano (14) comprende plástico flexible.
 12. El aparato (10) de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 4-10, en el que ambos del primer miembro plano (12) y el segundo miembro plano (14) comprenden plástico flexible.
 - 50 13. Un método para enumerar los constituyentes celulares o particulados de una muestra de sangre anticoagulada y entera, que comprende las etapas de :
 - 55 proporcionar un aparato (10) para analizar fluido biológico que incluye un primer miembro plano (12), un segundo miembro plano (14), en el que al menos uno del primer miembro plano (12) y el segundo miembro plano (14) es transparente, y al menos tres separadores (16) dispuestos entre los miembros planos (12, 14), teniendo cada separador (16) individualmente una altura y teniendo los separadores (16) colectivamente una altura media, separando los miembros planos (12, 14) para formar una cámara (18) que tiene una altura (20) que se extiende entre los miembros planos (12, 14), en el que al menos uno del primer miembro plano (12), el segundo miembro plano (14) o los separadores (16) puede deformarse lo suficiente para permitir que la altura (20) de la cámara sea sustancialmente igual a la altura media de los separadores (16);
60 depositar una cantidad de fluido biológico (34) en contacto con la superficie de uno del primer miembro plano (12) o el segundo miembro plano (14);
aproximar los miembros planos (12, 14) para formar una película de fluido biológico (34) confinado entre los dos miembros planos (12, 14) tal como se separan mediante los separadores (16);
65 determinar el volumen del fluido biológico (34) contenido dentro de la película (64);

enumerar directa o indirectamente todos los constituyentes de interés dentro de sustancialmente toda la película (B4); y
expresar los constituyentes enumerados como un volumen de cuenta por unidad.

- 5 14. El método de la reivindicación 13, en el que el fluido biológico (34) es sangre.
15. El método de la reivindicación 13 o 14, que comprende además la etapa de:
- 10 calcular la altura (20) de la cámara midiendo la atenuación media de luz transmitida a través de los separadores (16).
16. El método de la reivindicación 15, en el que la etapa de determinar el volumen de fluido biológico (34) contenido dentro de la película (64), comprende además las etapas de:
- 15 determinar el área de la película (64); y
calcular el volumen de fluido biológico (34) multiplicando la altura (20) de la cámara por el área de la película (64).
- 20 17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13-16, en el que el volumen de la película se calcula mediante formación de imágenes por interferometría de la gota de fluido biológico (34) depositada sobre el miembro plano (12, 14) antes de la aproximación de los miembros planos (12, 14).

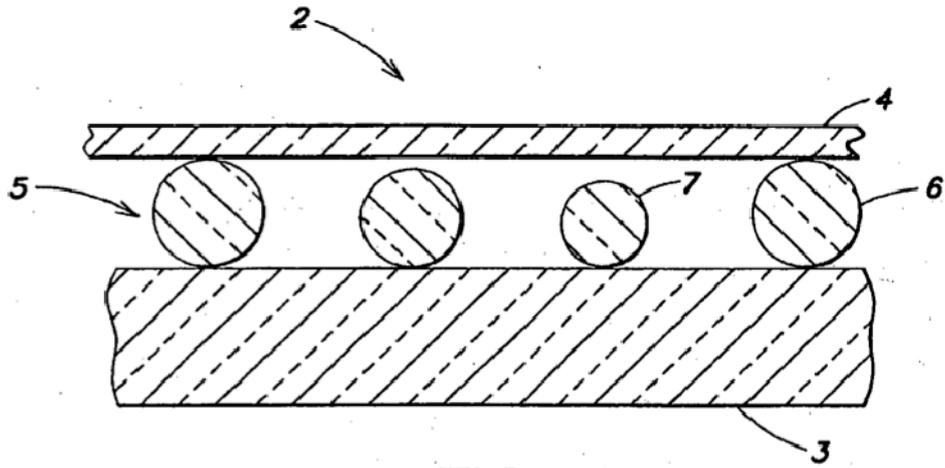


FIG. 1
(Técnica Anterior)

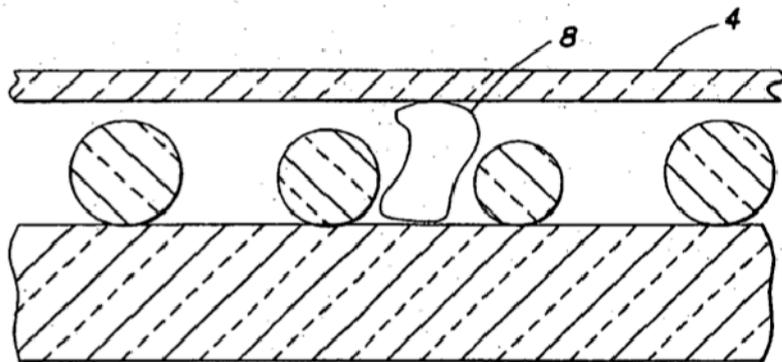


FIG. 2
(Técnica Anterior)

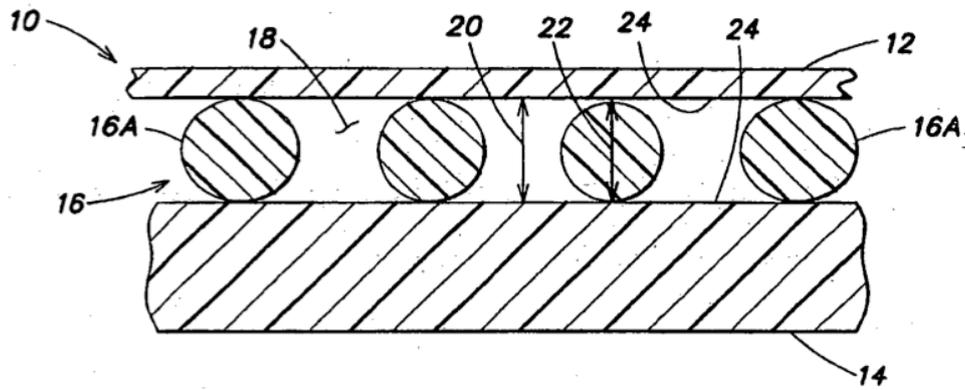


FIG. 3

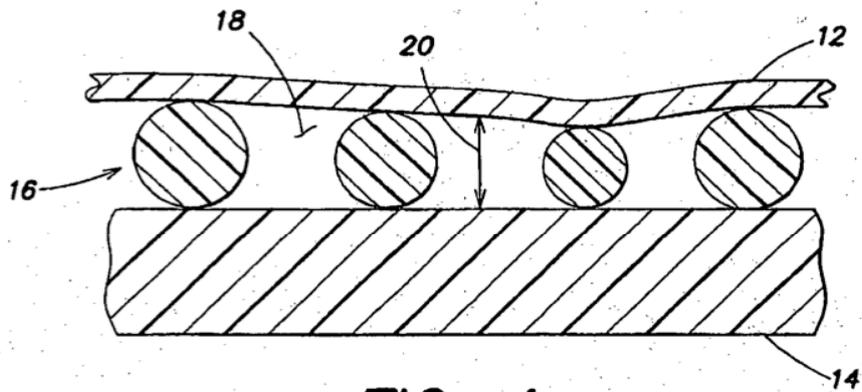


FIG. 4

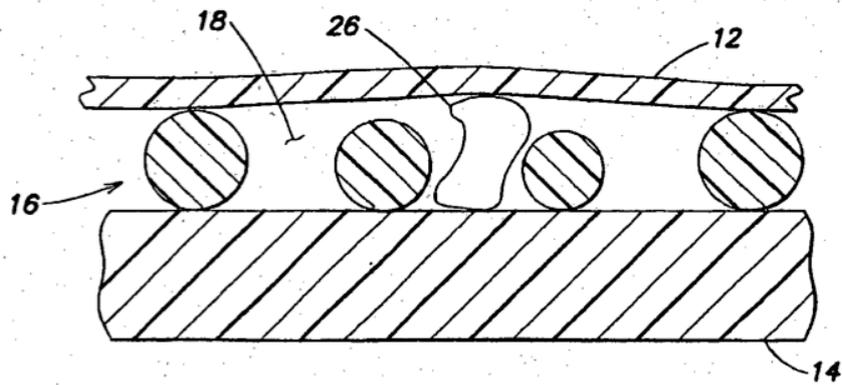


FIG. 5

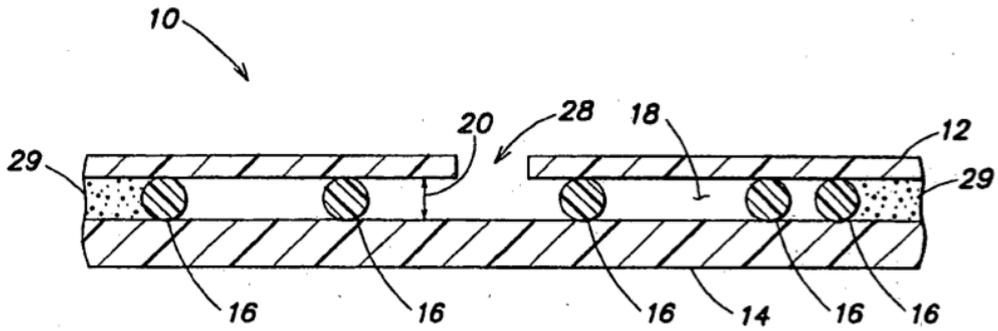


FIG. 6

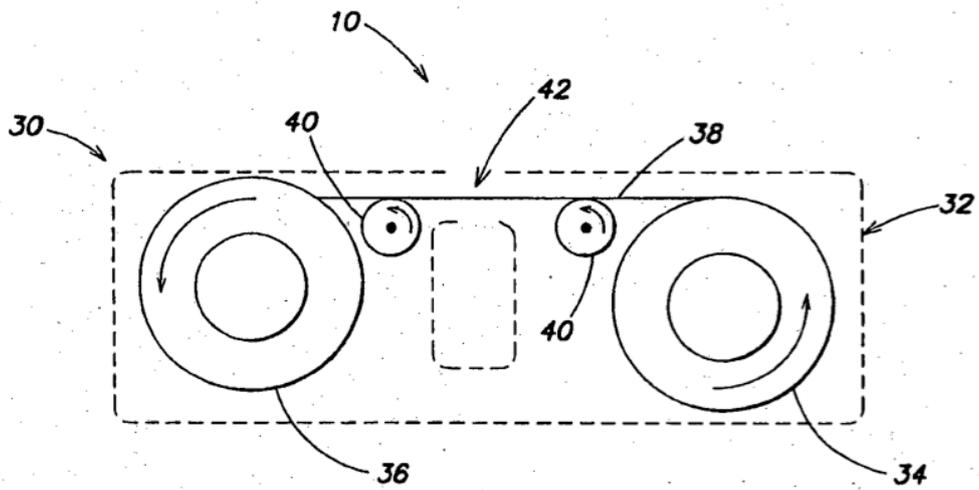


FIG. 7

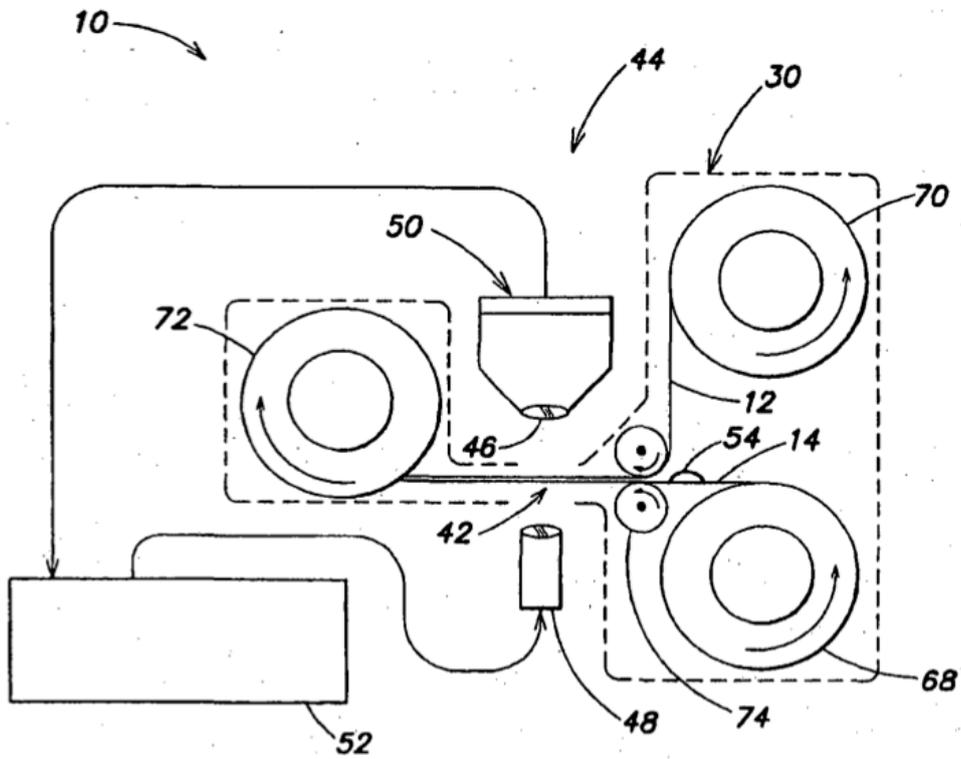


FIG. 6A

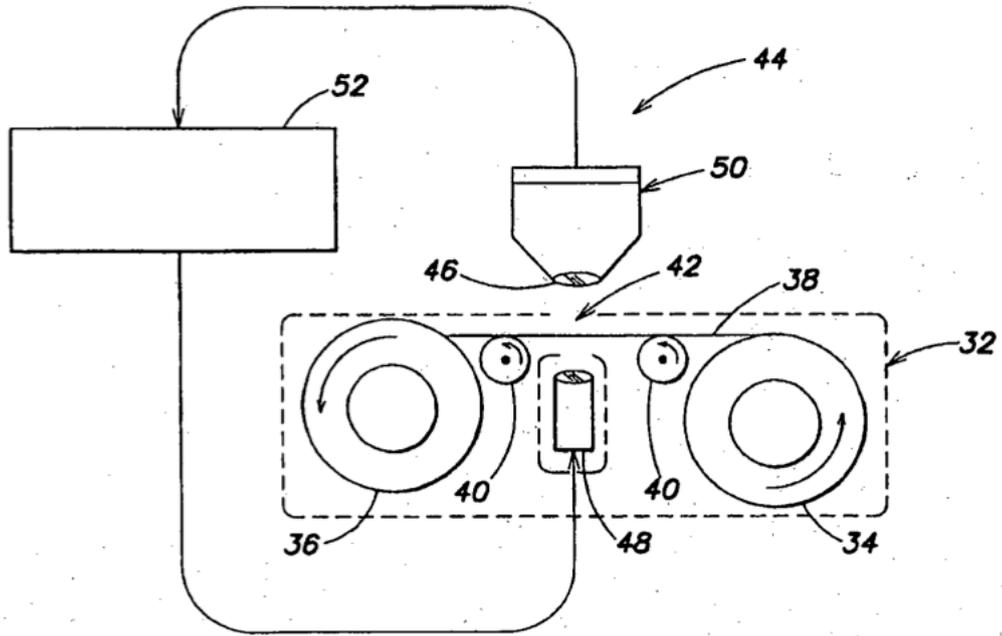


FIG. 8

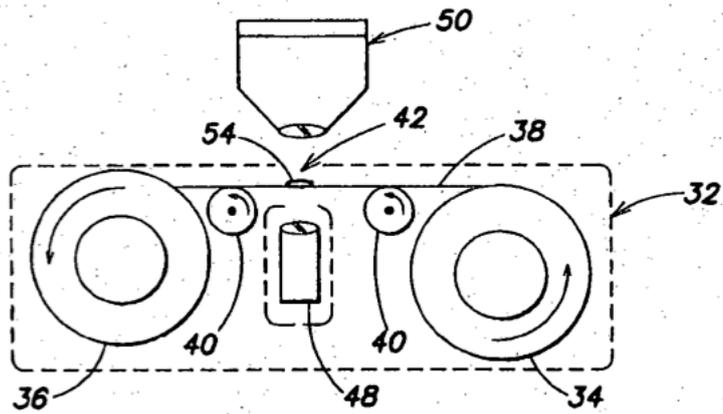


FIG. 9

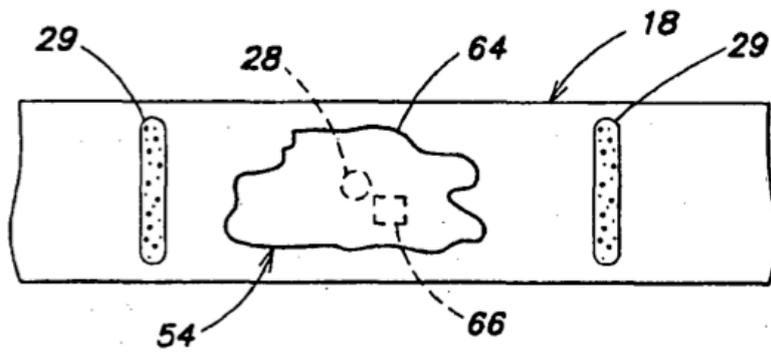


FIG. 10

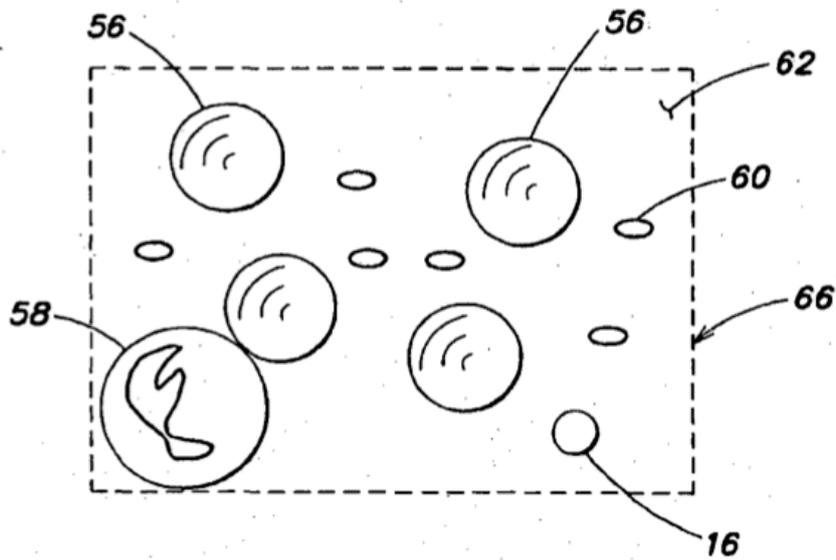


FIG. 11