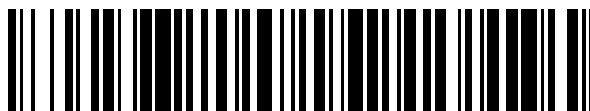


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 223**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/64** (2006.01)

**G01N 15/14** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 15/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.03.2009 PCT/US2009/037845**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2009 WO09117683**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2009 E 09721546 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2269038**

54 Título: **Procedimiento para el análisis de células individuales o partículas en la sangre usando fluorescencia y absorción de un colorante**

30 Prioridad:  
**21.03.2008 US 38578**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**31.10.2016**

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

72 Inventor/es:  
**LEVINE, ROBERT, A.;  
WARDLAW, STEPHEN, C.;  
LALPURIA, NITEN, V. y  
UNFRICHT, DARRYN, W.**

74 Agente/Representante:  
**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 588 223 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el análisis de células individuales o partículas en la sangre usando fluorescencia y absorción de un colorante

5

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

## 1. CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a procedimientos para el análisis de muestras de sangre en general, y procedimientos para detectar, identificar y recuento de los constituyentes, como células o partículas, en la muestra en particular.

## 2. INFORMACIÓN DE ANTECEDENTES

15

Los médicos, veterinarios y científicos han examinado los fluidos biológicos de los animales y el ser humano, especialmente la sangre, para determinar las cantidades constituyentes, así como para identificar la presencia de constituyentes inusuales que no se observan en sujetos sanos. Los constituyentes generalmente medidos, cuantificados e identificados incluyen glóbulos rojos (eritrocitos), glóbulos blancos (leucocitos) y plaquetas. Los análisis de eritrocitos pueden incluir determinaciones del número de eritrocitos, el tamaño, volumen, forma, contenido de hemoglobina y la concentración, y el hematocrito (también conocido como volumen concentrado de eritrocitos). Los análisis de eritrocitos también pueden incluir la determinación de la presencia y/o concentración de ciertos constituyentes dentro de los glóbulos rojos como ADN, ARN, incluyendo la detección de la presencia y/o recuento de hematoparásitos (por ejemplo, parásitos de la malaria), ya sea en los eritrocitos o tripanosomas que son organismos extracelulares o leishmaniasis que están en los leucocitos, así como muchos otros hematoparásitos. Los análisis de leucocitos pueden incluir una determinación de la frecuencia de la población de subtipos de leucocitos conocido generalmente como recuento de leucocitos diferencial, así como la notificación de cualquier tipo de célula inusual que no se encuentre en sujetos sanos. Los análisis de las plaquetas (o en algunos animales, incluyendo aves, reptiles y peces, trombocitos, que funcionalmente son similares a las plaquetas de los mamíferos, pero son aproximadamente diez veces mayores y nucleadas) pueden incluir determinaciones del número de plaquetas, tamaño, forma, textura, y volumen, incluyendo la determinación de la presencia de agregados plaquetarios o trombocitos en la muestra.

Las técnicas de análisis de sangre conocidas, descritas en los textos médicos detallados como Wintrobe's Clinical Hematology 12<sup>a</sup> edición, por lo general divide los procedimientos de análisis en procedimientos de tipo manual, centrífugos, y de impedancia. Los procedimientos manuales típicamente implican la creación de un volumen determinado con precisión de una muestra de sangre o fluido que se diluye cuantitativamente y se recuenta visualmente en una cámara de recuento. Los procedimientos de análisis manual incluyen el análisis de un frotis periférico en el que las cantidades relativas de los tipos de partículas se determinan mediante inspección visual. Los procedimientos de análisis centrífugos implican la centrifugación de la muestra, haciendo que la muestra se separe en capas constituyentes de acuerdo con las densidades relativas de los constituyentes. Las capas de componentes se pueden teñir para mejorar la visibilidad o detección. Los procedimientos de impedancia implican el análisis de un volumen exacto de sangre tratada de acuerdo con las partículas que se estén midiendo; por ejemplo, lisis de los eritrocitos para el recuento de células nucleadas y dilución volumétrica de la muestra en un fluido conductor. El proceso implica típicamente el control de un voltaje de corriente que se aplica a la muestra pasando a través de un paso estrecho para determinar el efecto que las partículas tienen en la corriente/voltaje a medida que las partículas pasan en una sola fila. Otras técnicas implican el análisis de la intensidad y el ángulo de dispersión de la luz incidente de las partículas al pasar en fila a través de un único haz de luz. Los procedimientos de citometría de flujo también se pueden usar e implican la tinción de las partículas de interés en suspensión con fluoróforos unidos a anticuerpos dirigidos contra epítomos de superficie presentes en los tipos de células o partículas, excitando las partículas teñidas con luz a las longitudes de onda apropiadas, y analizando la emisión de las partículas/células individuales.

Todos los procedimientos mencionados anteriormente, salvo el frotis de sangre periférica o separación centrífuga, requieren dispensar un volumen exacto de muestra. Las imprecisiones en el volumen de muestra darán como resultado errores cuantitativos de la misma magnitud en el análisis asociado. Con la excepción de los procedimientos centrífugos, todos los procedimientos mencionados anteriormente también requieren mezclar la muestra con uno o más reactivos líquidos o diluyentes, y también requieren la calibración del instrumento para obtener resultados precisos. En el caso de los frotis periféricos, se necesita un alto grado de formación para examinar adecuadamente el frotis. Varios de los procedimientos mencionados anteriormente generan grandes volúmenes de residuos contaminados, lo cual es caro de manejar. Además, los procedimientos descritos anteriormente no son adecuados para determinar el recuento sanguíneo completo (RSC) en aves, reptiles, peces, en los que los glóbulos rojos y los trombocitos están nucleados y en ciertos mamíferos, en los que el tamaño de los glóbulos rojos es muy pequeño y pueden confundirse con las plaquetas.

65

La cantidad de información que puede determinarse mediante el análisis de la sangre de un ser humano o animal es enorme. Es particularmente útil para determinar los índices de eritrocitos; por ejemplo, tamaño celular individual, contenido y concentración de hemoglobina en células individuales, y estadística poblacional de los eritrocitos en una muestra. Las estadísticas medias y de dispersión (por ejemplo, coeficientes de variación) para cada uno de los parámetros mencionados anteriormente pueden también proporcionar información importante, como lo demuestra su discusión en el texto de Wintrobe mencionado anteriormente, lo que ha permitido a los médicos clasificar mejor los trastornos de eritrocitarios.

El documento WO 98/02727 divulga un procedimiento y un aparato para la realización de un análisis automatizado. El documento US4615878 divulga medios de sorción de colorante metacromático para la determinación diferencial de subpoblaciones de linfocitos.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

De acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento para el análisis de los constituyentes de una muestra de sangre en reposo, como se reivindica en la reivindicación 1.

Se describe un procedimiento para analizar una muestra de sangre que incluye las etapas de: a) proporcionar una muestra de sangre sustancialmente sin diluir que tiene una o más primeras partículas y una o más segundas partículas, siendo las segundas partículas diferentes de las primeras partículas; b) depositar la muestra en una cámara de análisis adaptada para mantener en reposo la muestra para el análisis, estando definida la cámara por un primer panel y un segundo panel, siendo ambos paneles transparentes; c) mezclar un colorante con la muestra, siendo el colorante operativo para hacer que las primeras partículas y las segundas partículas emitan fluorescencia después de exponerlas a las primeras longitudes de onda de luz predeterminadas, y siendo el colorante operativo para absorber la luz en una o más segundas longitudes de onda de luz predeterminadas; d) iluminar al menos una parte de la muestra que contiene las primeras partículas y las segundas partículas con a las primeras longitudes de onda y a las segundas longitudes de onda; e) formar imágenes de al menos una parte de la muestra, incluyendo la producción de señales de imagen indicativas de las emisiones fluorescentes de las primeras partículas y de las segundas partículas y la densidad óptica de las primeras partículas y de las segundas partículas; f) determinar uno o más valores de emisión fluorescente para cada una de las primeras partículas y de las segundas partículas usando las señales de imagen; g) determinar uno o más valores de densidad óptica para cada una de las primeras partículas y de las segundas partículas, siendo la densidad óptica una función del colorante absorbido por las partículas, usando las señales de imagen; y h) identificar las primeras partículas y las segundas partículas usando los valores de emisión fluorescente y de densidad óptica determinados.

Se describe un procedimiento para analizar una muestra de sangre que está previsto que incluya las etapas de: a) proporcionar una muestra de sangre sustancialmente sin diluir que tiene uno o más primeros constituyentes y uno o más segundos constituyentes, siendo los segundos constituyentes diferentes de los primeros constituyentes; b) depositar la muestra en una cámara de análisis adaptada para mantener en reposo la muestra para el análisis, estando definida la cámara por un primer panel y un segundo panel, siendo ambos paneles transparentes; c) mezclar un colorante con la muestra, siendo el colorante operativo para hacer que los primeros constituyentes y los segundos constituyentes emitan fluorescencia después de exponerlos a longitudes de onda de luz predeterminadas; d) iluminar al menos una parte de la muestra que contiene los primeros constituyentes y los segundos constituyentes a las longitudes de onda de luz de una manera constante durante un período de tiempo; e) formar imágenes de al menos una parte de la muestra en puntos discretos en el tiempo durante el período, y producir de señales de imagen indicativas de las emisiones fluorescentes de los primeros constituyentes y de los segundos constituyentes para cada punto discreto en el tiempo; f) determinar uno o más valores de emisión fluorescente para cada uno de los primeros constituyentes y de los segundos constituyentes dispuestos en reposo en la muestra usando las señales de imagen para cada punto discreto en el tiempo, y una tasa de cambio de los valores de emisión fluorescente entre el punto discreto en el tiempo para cada uno de los primeros y segundos constituyentes; y g) identificar los primeros constituyentes y los segundos constituyentes usando la tasa de cambio determinada de los valores de emisión fluorescente para cada uno de los primeros y segundos constituyentes.

Una ventaja de la presente invención es que puede usarse para determinar las características de una muestra de sangre usando un volumen de muestra muy pequeño que se puede obtener directamente del paciente por punción capilar lo que lo hace más útil para el centro sanitario o de una muestra de sangre venosa si se desea.

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

El presente procedimiento y las ventajas asociadas con el mismo se harán más fácilmente evidentes a la vista de la descripción detallada proporcionada a continuación, incluyendo los dibujos adjuntos.

#### BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Las figuras 1-4 son representaciones esquemáticas en sección transversal de cámaras de análisis que pueden usarse en el presente procedimiento.

La figura 5 es una vista plana esquemática de una cinta que tiene una multitud de cámaras de análisis.

La figura 6 es una vista plana esquemática de un recipiente desechable que tiene una cámara de análisis.

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

La figura 8 es un diagrama esquemático de un dispositivo de análisis que puede usarse con el presente procedimiento.

La figura 9 es un gráfico que ilustra esquemáticamente una cantidad de desintegración fluorescente en función del tiempo para los neutrófilos.

La figura 10 es un gráfico que ilustra esquemáticamente una cantidad de desintegración fluorescente en función del tiempo para los linfocitos.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

El presente procedimiento usa una cámara de análisis que es operable para mantener en reposo una muestra de sangre completa anticoagulada sustancialmente sin diluir para el análisis. La cámara está típicamente el tamaño necesario para contener aproximadamente 0, 2-1,0  $\mu$ l de la muestra, pero la cámara no se limita a una capacidad de volumen particular, y la capacidad puede variar para adaptarse a la aplicación del análisis. La frase "sustancialmente sin diluir" como se usa en el presente documento describe una muestra de sangre que está o bien no diluida en absoluto o no se ha diluido a propósito, pero se le han añadido algunos reactivos a la misma para los propósitos del análisis. En la medida en que la adición de reactivos diluye la muestra, en todo caso, dicha dilución no tiene un impacto clínicamente significativo en los análisis realizados. Típicamente, los únicos reactivos que se usarán en la realización del presente procedimiento son anticoagulantes (por ejemplo, EDTA, heparina) y colorantes. Estos reactivos se añaden generalmente en forma seca y no están destinados para diluir la muestra. En determinadas circunstancias (por ejemplo, un análisis muy rápido), puede que no sea necesario añadir un agente anticoagulante, pero es preferente hacerlo en la mayoría de los casos para asegurar que la muestra está en una forma aceptable para el análisis. El término "en reposo" se usa para describir que la muestra se deposita dentro de la cámara para el análisis, y la muestra no se mueve a propósito respecto a la cámara durante el análisis; es decir, la muestra reside en reposo dentro de la cámara. En la medida en que el movimiento está presente en la muestra de sangre, será predominantemente debido al movimiento browniano de los constituyentes formados de la muestra de sangre, dicho movimiento no invalida el procedimiento de esta invención.

El colorante (por ejemplo, tinte, tintura, etc.), que se mezcla con al menos una parte de la muestra de sangre, facilita el análisis cuantitativo de los constituyentes (por ejemplo, leucocitos y otras células nucleadas, y partículas, incluyendo las plaquetas, y otros constituyentes que contienen ADN y/o ARN, por ejemplo, hematoparásitos intracelulares o extracelulares, etc.) que absorben el colorante. Las células y las partículas pueden denominarse colectivamente en este documento como "constituyentes" de la muestra. El colorante emite fluorescencia en una serie de longitudes de onda características (por ejemplo, 530 nm, 585 nm y 660 nm) cuando se excita por la luz en una serie de ciertas longitudes de onda (por ejemplo, aproximadamente 470 nm). Las longitudes de onda específicas a las que emiten fluorescencia una célula y la(s) longitud(es) de onda(s) de la luz de excitación son una característica de esa célula. El colorante también absorbe luz a una o más longitudes de onda predeterminadas en función de la concentración del colorante dentro de la célula. Ejemplos de colorantes aceptables incluyen tinciones supravitales, el naranja de acridina y el naranja astrozone. Sin embargo, la invención no se limita a tinciones supravitales.

Con referencia ahora a la figura 1, la cámara de análisis 10 se define por un primer panel 12 que tiene una superficie interna 14, y un segundo panel 16 que tiene una superficie interna 18. Los paneles 12, 16 son ambos suficientemente transparentes para permitir la transmisión de luz en una serie de longitudes de onda predeterminadas en una cantidad suficiente para llevar a cabo el análisis de la densidad óptica descrita a continuación. Al menos una parte de los paneles 12, 16 son paralelos entre sí, y dentro de esa parte, las superficies internas 14, 18 están separadas entre sí por una altura de 20, pudiendo dicha altura ser conocida o medible. Se muestran 22 eritrocitos dispuestos dentro de la cámara 10.

El presente procedimiento puede usar una variedad de tipos diferentes de cámaras de análisis que tienen las características mencionadas anteriormente, 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 por lo tanto es preferente, pero no es necesaria para la presente invención; por ejemplo, se podría usar una cámara que tiene un panel dispuesto en un ángulo no paralelo conocido en relación con el otro panel.

Con 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 ser de cualquier estructura que sea desechable entre los paneles 12, 16, operable para separar los paneles 12, 16 separados entre sí. La dimensión 28 de un separador 26 que se extiende entre los paneles 12, 16 se denomina en el presente documento como la altura 28 del separador 26. Las alturas 28 de los separadores 26 típicamente no son iguales entre sí exactamente (por ejemplo, las tolerancias de fabricación), pero están dentro de la tolerancia comercialmente aceptable para la separación de los medios usados en aparatos de análisis similares. Las perlas esféricas son un ejemplo de separador aceptable 26 y están disponibles comercialmente a través de, por ejemplo, Bangs Laboratories de Fishers, Indiana, EE.UU.

En la cámara mostrada en la figura 3, los separadores 26 consisten en un material que tiene una mayor flexibilidad 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 se comprimen hasta el punto en el que la mayoría de los separadores 26 estén tocando las superficies internas de los paneles 12, 16, con lo que la altura de la cámara es justo ligeramente menor que los diámetros medios del separador 26. En el modo de realización de la cámara mostrada en la figura 4, los separadores 26 consisten en un material que tiene menos flexibilidad que uno o ambos del primer panel 12 y el segundo panel 16. En la figura 4, el primer panel 12 está formado por un material más flexible que los separadores esféricos 26 y el segundo panel 16, y se superpondrá a los separadores 26 en forma de tienda de campaña. Aunque pequeñas regiones locales de la cámara 10 pueden desviarse de la altura de la cámara deseada 20, la altura media 20 de la cámara 10 será muy similar al diámetro medio separador 26. El análisis indica que la altura media de la cámara 20 puede controlarse hasta aproximadamente uno por ciento (1%) o mejor en alturas de cámara de menos de cuatro micrómetros usando esta cámara. Sin perjuicio de las características de flexibilidad descritas anteriormente (así como otros factores como la densidad de distribución de los separadores), los separadores 26 y los paneles 12, 16 pueden estar fabricados con diversos de materiales, siempre que los paneles 12, 16 sean suficientemente transparentes. Las películas de plástico transparentes que consisten en acrílico o poliestireno son ejemplos de paneles aceptables 12, 16, y perlas esféricas de poliestireno, policarbonato, silicona, y similares, son separadores aceptables 26. Un ejemplo específico de un separador aceptable son esferas de poliestireno que están disponibles comercialmente, por ejemplo, a través de Thermo Scientific de Fremont, California, EE.UU., n.º de catálogo 4204A, de cuatro micrómetros (4 [mu]m) de diámetro. En referencia a la figura 5, el panel 12 que ha de disponerse verticalmente por encima del otro incluye una multitud de puertos 30 dispuestos a intervalos regulares (por ejemplo, que actúan como salidas de aire), y los paneles 12, 16 están unidos entre sí en puntos. En algunos modos de realización, el material de unión 32 forma una pared de la 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 mayor detalle en las publicaciones de las solicitudes de patente de EE.UU. n.º. 2007/0243117, 2007/0087442 y los números de solicitud de patente provisional de EE.UU. 61/041.783, presentada el 2 de abril de 2008; y 61/110.341, presentada el 31 de octubre de 2008.

Otro ejemplo de una cámara aceptable 10 está dispuesto en un contenedor desechable 36, como se muestra en las figuras 6 y 7. La cámara 10 se forma entre un primer panel 12 y un segundo panel 16. Tanto el primer panel 12 como el segundo panel 16 son transparentes para permitir que la luz pase a través de la cámara 10. Al menos una parte del primer panel 12 y del segundo panel 16 son paralelas entre sí, y dentro de esa parte de las superficies internas 14, 18 están separadas entre sí por una altura 20. Esta cámara 10 se describe con mayor detalle en la patente de EE.UU. n.º 6.723.290. Las cámaras de análisis mostradas en las figuras 2-7, representan cámaras que son aceptables para su uso en el presente procedimiento. El presente procedimiento no está, sin embargo, limitado a estas cámaras particulares.

Algunos de los leucocitos de la muestra probablemente se pondrán en contacto con ambas superficies internas de los paneles de la cámara y otros no. No es un requisito que entren en contacto con las superficies internas, y no es necesario conocer la altura exacta de la cámara para los propósitos de la presente invención. Una altura de la cámara de aproximadamente dos a seis micrómetros (2-6 um) es aceptable para la mayoría de las especies animales en base a los tamaños típicos de los leucocitos y por el hecho de que los leucocitos pueden deformarse en cierto grado (por ejemplo, comprimirse parcialmente entre las superficies internas de la cámara). Una altura de la cámara 20 de aproximadamente tres a cinco micrómetros (3-5 um) está particularmente bien adaptada para el análisis de sangre humana. Un análisis de una especie animal que tenga leucocitos sustancialmente mayores o menores que los leucocitos humanos se puede realizar en una cámara que tenga, respectivamente, una altura de cámara más grande o más pequeña, respectivamente.

El análisis de la muestra en reposo dispuesta dentro de la cámara 10 se realiza usando un dispositivo de análisis que es operable para iluminar y generar imagen de al menos una parte de la muestra y puede realizar un análisis de la imagen. La imagen se produce de manera que permita determinar en unidades las emisiones fluorescentes de, y la densidad óptica de, la parte de la muestra que se va a determinar o por base unitaria. El término "por base unitaria" o "unidad de imagen" significa una unidad incremental definida de la que se puede diseccionar la imagen de la muestra. Un "píxel", que generalmente se define como el elemento más pequeño de una imagen que puede ser procesado de forma individual dentro de un sistema de formación de imágenes en particular, es un ejemplo de una unidad de imagen, y una unidad de imagen también puede incluir un pequeño número de píxeles en una unidad colectiva. La ampliación de un dispositivo de formación de imágenes también se puede describir en términos lineales

(por ejemplo, micrómetros por píxel en el plano focal), donde la dimensión lineal es a lo largo de un eje particular de una cuadrícula ortogonal aplicada a la imagen. Por lo tanto, el área real de la muestra capturada por el sensor como píxeles en el plano focal es una función del factor de ampliación aplicada por el dispositivo de formación de imágenes. Por lo tanto, es útil, pero no necesario, conocer la ampliación del dispositivo de formación de imágenes. Por lo tanto, el volumen asociado con ese píxel es el área de la imagen por píxel veces la altura de la cámara. Por ejemplo, si el aumento fue de 0,5 micrómetros por píxel, una imagen que ocupa 200 píxeles tendría una superficie de 50 micrómetros cuadrados y un volumen de 50 micrómetros cuadrados veces 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 presente procedimiento incluye un iluminador de muestras 46, un disector de imágenes 48, y un analizador programable 50. El iluminador de muestras 46 incluye una fuente de luz que produce luz selectivamente en una serie de ciertas longitudes de onda deseadas. Por ejemplo, se pueden usar LED que emitan las longitudes de onda deseadas (por ejemplo, 420 nm, 440 nm, 470 nm, etc.). De forma alternativa, se puede usar una fuente de luz que produzca una amplia gama de longitudes de onda (por ejemplo, aproximadamente 400 a 670 nm), aunque en algunos casos dicha fuente de luz puede requerir filtrado. El dispositivo de análisis 44 puede incluir óptica para la manipulación de la luz. El iluminador de muestras 46 incluye una fuente de transmisión de luz y una fuente de luz epi-iluminación, siendo cada una capaz de funcionar para iluminar parte, o la totalidad, de la muestra situada dentro de la cámara 10. Un ejemplo de un disector de imágenes aceptable 48 es un dispositivo de carga acoplada (CCD) que convierte una imagen de la luz que pasa a través de la muestra en un formato electrónico de datos (es decir, una señal). El analizador programable 50 incluye una unidad de procesamiento 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 presente procedimiento. La patente de EE. UU. n° 6.866.823 titulada "Apparatus for Analyzing Biologic Fluids" (Aparato para el análisis biológicos Fluidos) expedida el 15 de marzo de 2005, divulga dicho dispositivo de análisis 44.

El dispositivo de análisis está adaptado para: 1) formar una imagen de al menos una parte de la muestra, y producir señales de imagen indicativas de las emisiones fluorescentes de la muestra de la imagen y la densidad óptica de la muestra de la imagen basándose en los píxeles; 2) determinar un valor de fluorescencia de uno o más constituyentes de un primer tipo y uno o más constituyentes de un segundo tipo, todos en reposo dentro de la parte de la muestra, usando las señales de imagen; 3) determinar un valor de densidad óptica para cada uno de los constituyentes de primero y segundo tipo de la muestra de la imagen ; y 4) identificar los constituyentes de primer tipo y los constituyentes de segundo tipo usando los valores de fluorescencia y densidad óptica determinados.

En el presente procedimiento, una muestra de sangre completa sustancialmente sin diluir se introduce en una cámara 10, y después permanece en reposo como se describe anteriormente. Un agente anticoagulante y un colorante se mezclan con la muestra, ya sea antes de su introducción en la cámara o después de su introducción en la cámara. Las células de la muestra absorben el colorante (por ejemplo, leucocitos y plaquetas). A continuación en el presente documento, cuando se hace referencia a los leucocitos individuales, el mismo procedimiento se aplica a las plaquetas individuales, u otros constituyentes de la muestra. Al menos una parte de la muestra que reside en reposo dentro de la cámara es iluminada por el dispositivo de análisis 44, que transmite luz a través de la muestra. Aunque no es un requisito que se forme una imagen de toda la muestra que reside dentro de la cámara, es preferente ya que hacerlo típicamente proporciona un análisis más completo de la muestra y un aumento concomitante de la precisión.

La muestra se ilumina con longitudes de onda conocidas para excitar una emisión fluorescente de las células relacionadas con el colorante absorbido por los leucocitos. Los leucocitos teñidos con naranja de acridina producen una emisión fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta a una longitud de onda de 470 nm. Las emisiones específicas dependen del colorante usado y la composición intracelular de la célula iluminada (por ejemplo, la interacción del colorante con el ARN y/o ADN de la célula crea las emisiones). Algunos leucocitos tienen emisiones fluorescentes que actúan como una firma fluorométrica que es relativamente única para dichos leucocitos y por lo tanto se puede usar para identificar dichos leucocitos. Otros leucocitos tienen firmas de emisión fluorescente que no pueden distinguirse fácilmente unas de otros. Los leucocitos con esas firmas de emisión "compartidas" pueden agruparse como un primer tipo de leucocitos o un segundo tipo de leucocitos, pero se requiere algo más para distinguir los dos tipos de leucocitos.

Al mismo tiempo, la muestra se ilumina para crear una emisión fluorescente (o de forma secuencial a partir de entonces), también se ilumina en una serie de una o más longitudes de onda que son absorbidas por el colorante. Los leucocitos teñidos con naranja de acridina, por ejemplo, absorben la luz a longitudes de onda de aproximadamente 420 nm debido a la presencia del naranja de acridina. La cantidad de absorción, que puede describirse en términos de densidad óptica (DO), es una función de la concentración y de las condiciones locales (por ejemplo, pH) del colorante dentro de los leucocitos. La propensión de un leucocito para absorber un colorante, cuando se expone a la misma cantidad de colorante, varía entre algunos tipos de células leucocitarias en función de las características biológicas de la célula. Por ejemplo, diferentes características biológicas en un leucocito (por ejemplo, núcleo, citoplasma, etc.) absorben el colorante en diferentes concentraciones. Estas características biológicas diferentes de cada tipo de célula, y las concentraciones diferentes asociadas de colorante absorbido por estas características, se pueden usar para distinguir ciertos tipos de células. La DO de una célula, que es una

función de la concentración de un colorante dentro de la célula, se puede usar para distinguir e identificar diferentes tipos de células. En algunas aplicaciones, la diferencia de densidad óptica entre células puede proporcionar información suficiente para permitir la identificación de las células. En otros casos, la identificación se realiza usando la firma fluorométrica y la DO de la célula.

5 Para ilustrar un ejemplo de la presente invención, una muestra de la sangre sustancialmente sin diluir se mezcla con naranja de acridina y se introduce dentro de una cámara que tiene dos paneles transparentes. La muestra reside en reposo y una multitud de leucocitos dentro de la muestra contacta ambas superficies internas de la cámara. La muestra se ilumina a 470 nm y a 420 nm. La iluminación a 470 nm produce una emisión fluorescente. El colorante absorbe la iluminación a 420 nm. Se toman imágenes digitales de la muestra iluminada. Se identifica un grupo de leucocitos que comprende neutrófilos y eosinófilos dentro de la población entera de leucocitos presente en la muestra de la imagen, y ese grupo se "separa" dentro de la imagen; por ejemplo, mediante el filtrado de la imagen de modo que solo pueda verse dicho grupo. Los neutrófilos y los eosinófilos se identifican porque cada uno de estos tipos de leucocitos produce un patrón de fluorescencia como firma después de la excitación, que consiste en una fluorescencia citoplasmática roja significativa y una fluorescencia nuclear verde. Las emisiones fluorescentes de los neutrófilos y eosinófilos del grupo son, sin embargo, suficientemente similares entre sí, siendo difícil distinguir los dos tipos de leucocitos.

20 Para distinguir entre los dos tipos de leucocitos dentro del grupo, se compara la densidad óptica de los leucocitos separados. De media, la concentración de la naranja de acridina absorbido dentro de los eosinófilos es mayor que la concentración de la naranja de acridina absorbido dentro de los neutrófilos, aunque la fluorescencia puede ser la misma. Esto se debe a que la fluorescencia del colorante dentro de los eosinófilos se inactiva con respecto a la de dentro de los neutrófilos a causa de las características únicas de los contenidos celulares de los eosinófilos. Los dos tipos diferentes de leucocitos se pueden distinguir como subgrupos independientes, por ejemplo, mediante el uso de un valor de DO de corte predeterminado; por ejemplo, aquellas células del grupo independiente que tienen una DO mayor que el valor de corte se etiquetan como eosinófilos, y las células que tienen una DO menor que el valor de corte se etiquetan como neutrófilos.

30 Alternativamente, los dos tipos de leucocitos se pueden distinguir comparando la DO medida con los valores de DO derivados empíricamente almacenados en el dispositivo de análisis; por ejemplo, en una tabla de consulta, etc.

Aún más, los dos subgrupos de leucocitos se pueden distinguir entre sí mediante la determinación de la proporción entre la fluorescencia citoplasmática y la DO citoplasmática (fluorescencia/DO) en base a células individuales. Para crear la proporción, se pueden determinar y se promedian los valores de emisión fluorescente y los valores de densidad óptica basándose en los píxeles para una célula particular, y se pueden usar los valores medios de la proporción. La proporción se puede determinar usando procedimientos alternativos, como la determinación de la proporción basándose en los píxeles y promediando las proporciones por píxel. La proporción entre fluorescencia y DO expresa cuantitativamente la extinción de la fluorescencia de la tinción de una célula particular. Las células que tienen una proporción más baja muestran una extinción o "quenching" de la señal fluorescente. Las proporciones de todas las células del grupo independiente se pueden evaluar estadísticamente para determinar un punto de separación entre las dos poblaciones. Las células que estadísticamente caen por debajo del punto de separación son los eosinófilos porque la proporción entre la fluorescencia y la DO es inferior a la proporción asociada con la población de neutrófilos. Del mismo modo, las células que estadísticamente caen por encima del punto de separación son los neutrófilos, porque la proporción entre la fluorescencia y la DO es mayor que la proporción de la población de los eosinófilos.

50 En un modo de realización adicional del análisis de la proporción fluorescencia/DO anterior, las proporciones se pueden determinar usando solo los valores medios de DO y emisión fluorescente anteriores (o los valores de DO y los valores de emisión fluorescente dentro del porcentaje mayor que el 50%) de las células bajo análisis. Para explicar, la concentración de colorante en una célula particular expuesta al colorante puede ser menor en una primera región (por ejemplo, la región nuclear) de lo que es en una segunda región (por ejemplo, región citoplasmática). En consecuencia, la DO de la segunda región de la célula (por ejemplo, citoplasmática) será mayor que la DO de la primera región (por ejemplo, nuclear) de la célula. De manera similar, las emisiones fluorescentes de una región particular de una célula pueden ser mayores que las emisiones de otra región. Selectivamente usando una parte de los valores de emisión/DO fluorescentes, que representan los valores de mayor intensidad de emisión o DO, da como resultado una mejora del ruido en la proporción de la señal que facilita el análisis. Este aspecto se aprovecha del hecho de que típicamente los colorantes preferentemente se distribuyen, por ejemplo, dentro de los gránulos del citoplasma de las células.

60 En un modo de realización adicional que no está de acuerdo con la invención, las células de la muestra se pueden distinguir entre sí mediante el blanqueo" o "bleaching" de las células mezcladas con el colorante con una emisión constante de la luz a una longitud de onda (por ejemplo, 470 nm) que excita una emisión fluorescente, y la detección de la magnitud de la luz emitida en puntos discretos en el tiempo dentro de un período de tiempo. La tasa media a la que las emisiones fluorescentes reducen su intensidad de un tipo celular particular es constante para ese tipo de células, pero las tasas medias varían entre los tipos de células. En consecuencia, la tasa de decrecimiento de emisión de intensidad se puede usar para distinguir tipos de células. Por ejemplo, la figura 9 ilustra la tasa de

5 desintegración de la emisión de fluorescencia verde para los neutrófilos individuales expuestos a fotoblanqueo 52, 54, 56, y la tasa media de la desintegración de los neutrófilos 58. La figura 10 ilustra la tasa de desintegración de la emisión de fluorescencia verde para los linfocitos individuales expuestos al mismo fotoblanqueo 60, 62, y para la media 64 de estos linfocitos. Las curvas mostradas en las figuras 9 y 10 muestran claramente diferentes tasas de desintegración para los diferentes tipos de células, y que las diferentes tasas de desintegración se pueden usar para identificar el tipo de célula que se está analizando. La tasa de desintegración de la emisión también se puede usar para distinguir las células por otras características como la edad; por ejemplo, las células de un cierto tipo pero de diferente edad tendrán unas tasas decrecientes de emisión características que se pueden usar para distinguir los diversos grupos de diferente edad.

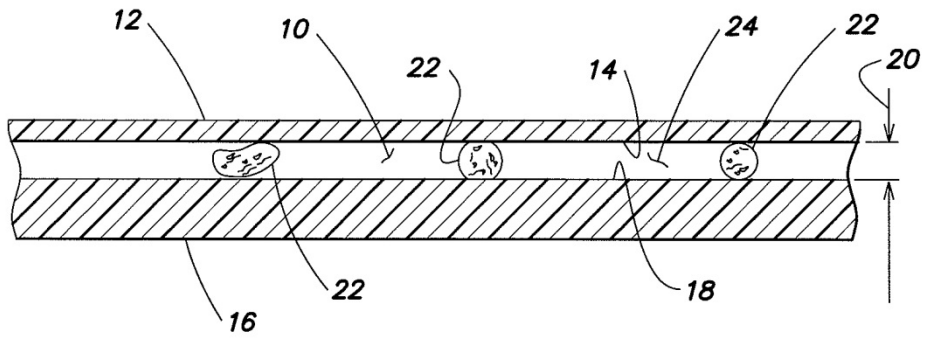
10 Aunque la invención se ha mostrado y descrito con referencia a modos de realización específicos, los expertos en la técnica entenderán que se pueden realizar varias modificaciones en forma y detalle sin apartarse del alcance de la invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.



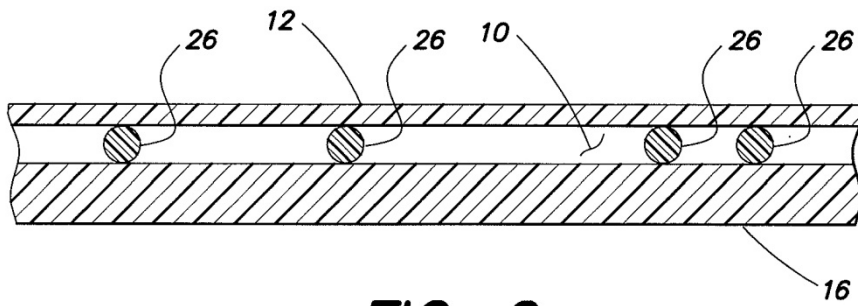
## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para analizar una muestra de sangre que comprende las etapas de:
  - 5 depositar una muestra de sangre en una cámara de análisis (10) adaptada para mantener en reposo la muestra de sangre para el análisis, estando la cámara (10) definida por un primer panel (12) y un segundo panel (16), siendo ambos paneles (12, 16) transparentes, teniendo la muestra de sangre uno o más primeros constituyentes y uno o más segundos constituyentes, siendo los segundos constituyentes diferentes de los primeros constituyentes;
    - 10 mezclar un colorante con la muestra de sangre, siendo el colorante operativo para hacer que los primeros constituyentes y los segundos constituyentes emitan fluorescencia después la exposición a unas primeras longitudes de onda de luz predeterminadas, y siendo el colorante operativo para absorber la luz en una o más segundas longitudes de onda de luz predeterminadas;
      - 15 iluminar al menos una parte de la muestra de sangre que contiene los primeros constituyentes y los segundos constituyentes de forma selectiva con las primeras longitudes de onda y con las segundas longitudes de onda; formar imágenes de al menos una parte de la muestra de sangre, incluyendo la producción de señales de imagen indicativas de las emisiones fluorescentes de los primeros constituyentes y de los segundos constituyentes y la densidad óptica a las segundas longitudes de onda de los primeros constituyentes y de los segundos constituyentes; determinar uno o más valores de emisión fluorescente para cada uno de los primeros constituyentes y de los segundos constituyentes usando las señales de imagen; determinar uno o más valores de densidad óptica a las segundas longitudes de onda para cada uno de los primeros constituyentes y de los segundos constituyentes, siendo la densidad óptica una función del colorante absorbido por los constituyentes, usando las señales de imagen; e identificar los primeros constituyentes y los segundos constituyentes usando los valores de emisión fluorescente y de densidad óptica determinados.
  2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra de sangre está sustancialmente sin diluir.
  3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra de sangre es sangre completa.
  4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los primeros y los segundos constituyentes se seleccionan del grupo que consiste en leucocitos y partículas.
  5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que los primeros y los segundos constituyentes son cada uno tipos de leucocitos.
  6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que uno o más valores de emisión fluorescente para cada uno de los primeros constituyentes y cada uno de los segundos constituyentes se determinan basándose en los píxeles; y/o uno o más valores de densidad óptica para cada uno de los primeros constituyentes y cada uno de los segundos constituyentes se determinan basándose en una base píxeles.
  7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que al menos uno de cada primer y segundo constituyente se identifica usando los valores de emisión fluorescente determinados a partir de una región dentro de ese constituyente que tienen valores de emisión fluorescente por encima de la media de la intensidad con respecto a los valores fluorescentes en otras regiones de ese constituyente.
  8. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que al menos uno de cada primer y segundo constituyente se identifica usando valores de densidad óptica determinados a partir de regiones dentro de ese constituyente que tienen valores de densidad óptica por encima de la media en magnitud con respecto a los valores de densidad óptica en otras regiones de ese constituyente.
  9. El procedimiento de la reivindicación 7, que comprende además la etapa de promediar los valores de densidad óptica determinados dentro de al menos una parte de cada uno de los primeros y segundos constituyentes; y en el que la etapa de identificación de los primeros constituyentes y de los segundos constituyentes usando los valores de emisión fluorescente y los valores de densidad óptica determinados incluye una etapa de comparar el valor de densidad óptica medio medido para cada constituyente a un valor de densidad óptica predeterminado, o comparar de los valores de densidad óptica determinados con los datos empíricos para distinguir los primeros constituyentes de los segundos constituyentes.
  10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que los primeros y los segundos constituyentes se seleccionan del grupo que consiste en eosinófilos, neutrófilos y basófilos.
  11. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la etapa de identificación de los primeros constituyentes y de los segundos constituyentes usando los valores de emisión fluorescente y los valores de densidad óptica determinados, incluye la determinación de una proporción entre los valores de emisión fluorescente determinados y los valores de densidad óptica determinados para una célula particular, por ejemplo en el que la proporción es una media de los valores de emisión fluorescente determinados para una célula sobre una media de los valores de densidad óptica determinados para esa célula.

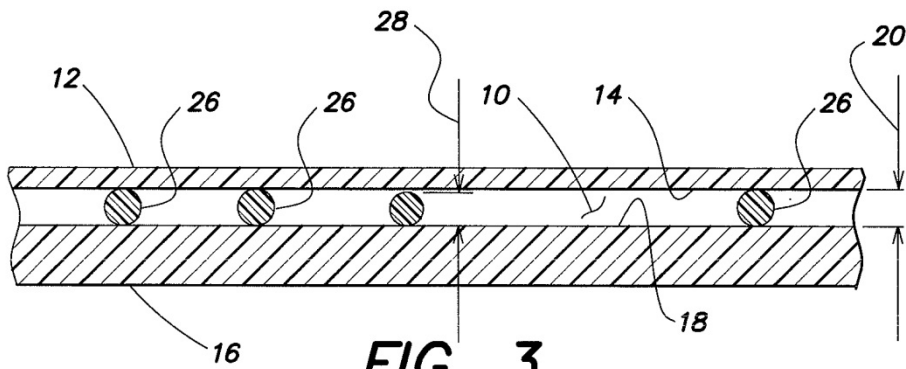
- 5 12. El procedimiento de la reivindicación 5, que comprende además la etapa de determinar la proporción entre los valores de emisión fluorescente determinados y los valores de densidad óptica determinados para cada uno de los primeros constituyentes y segundos constituyentes y evaluar estadísticamente las proporciones para identificar los primeros constituyentes y los segundos constituyentes.
- 10 13. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la etapa de identificación de los primeros constituyentes y de los segundos constituyentes usando los valores de emisión fluorescente y de densidad óptica determinados, usa las emisiones fluorescentes y la densidad óptica de solamente una región citoplasmática de cada uno de los primeros constituyentes y de los segundos constituyentes.
- 15 14. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la etapa de identificación de los primeros constituyentes y de los segundos constituyentes usando los valores de emisión fluorescente y los valores de densidad óptica determinados, incluye la comparación de los valores de emisión de fluorescencia de sustancialmente todos los constituyentes de la muestra de la imagen.
- 20 15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que los primeros constituyentes y los segundos constituyentes tienen patrones de valores de emisión fluorescente sustancialmente similares; y, opcionalmente, comprende además una media de los valores de densidad óptica determinados dentro de al menos una parte de cada uno de los primeros y segundos constituyentes; y en el que la etapa de identificación de los primeros constituyentes y de los segundos constituyentes usando los valores de emisión fluorescente y los valores de densidad óptica determinados incluye comparar el valor de densidad óptica media determinado para al menos uno de los primeros constituyentes y al menos uno de los segundos constituyentes con un valor de densidad óptica predeterminado.
- 25 16. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que los primeros y segundos constituyentes son cada uno tipos de partículas.



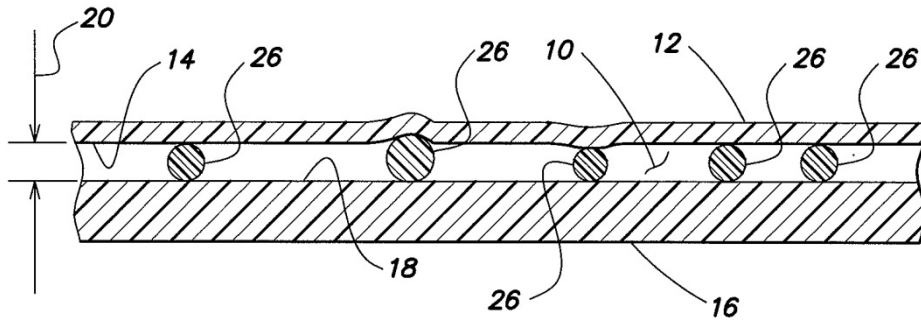
**FIG. 1**



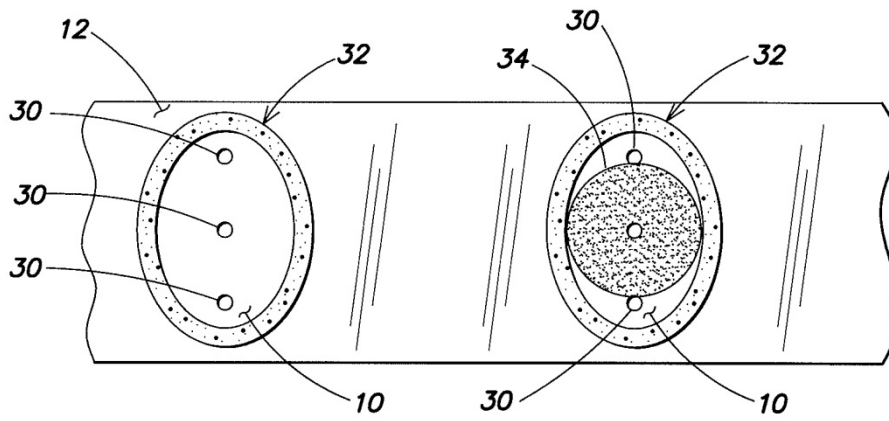
**FIG. 2**



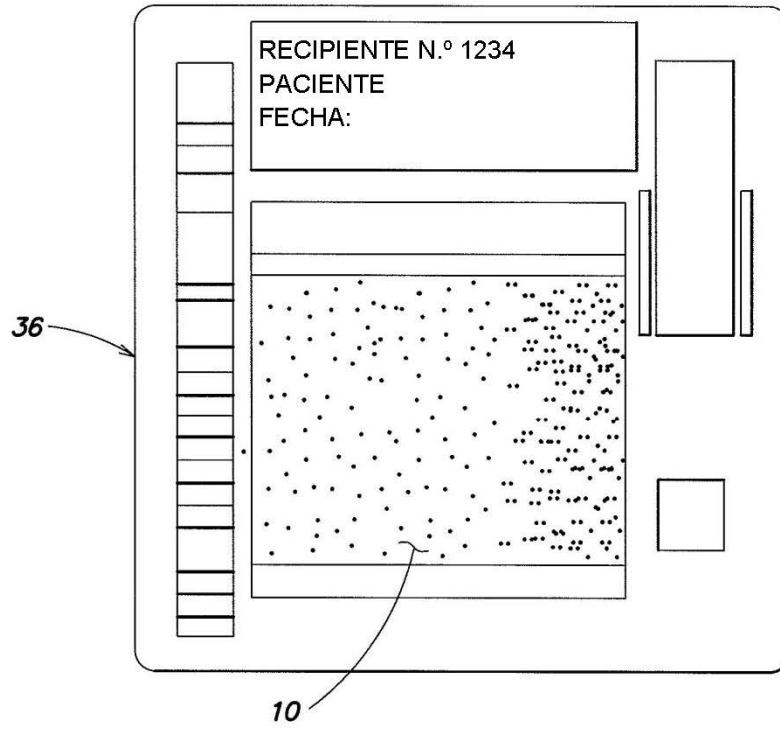
**FIG. 3**



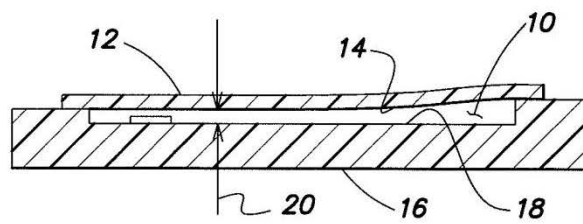
**FIG. 4**



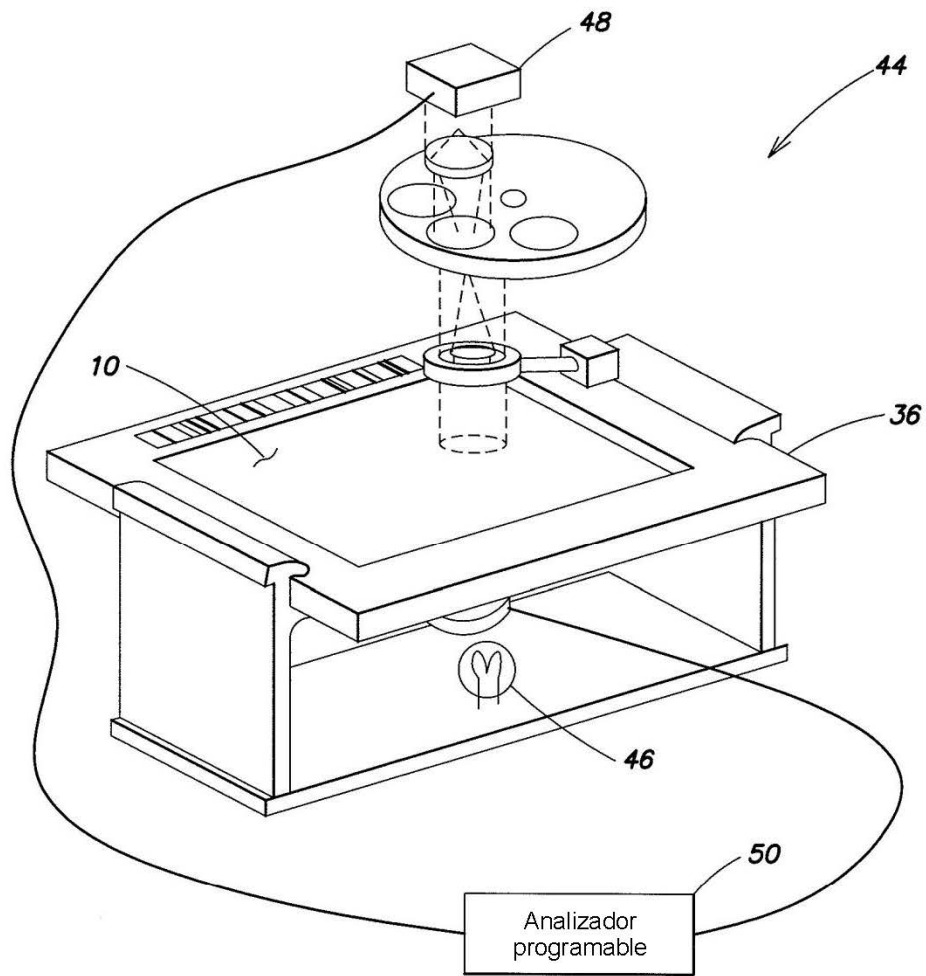
**FIG. 5**



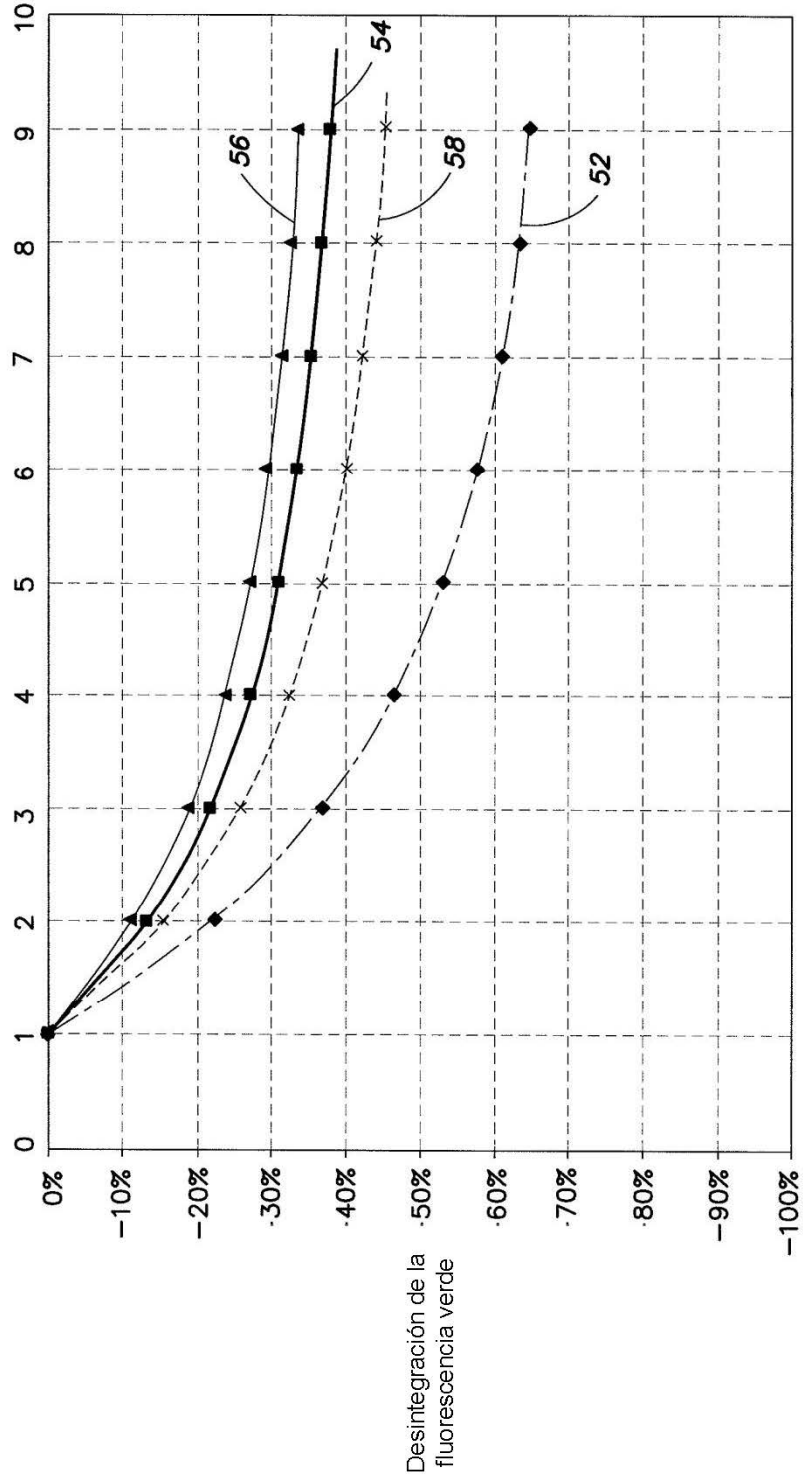
**FIG. 6**



**FIG. 7**

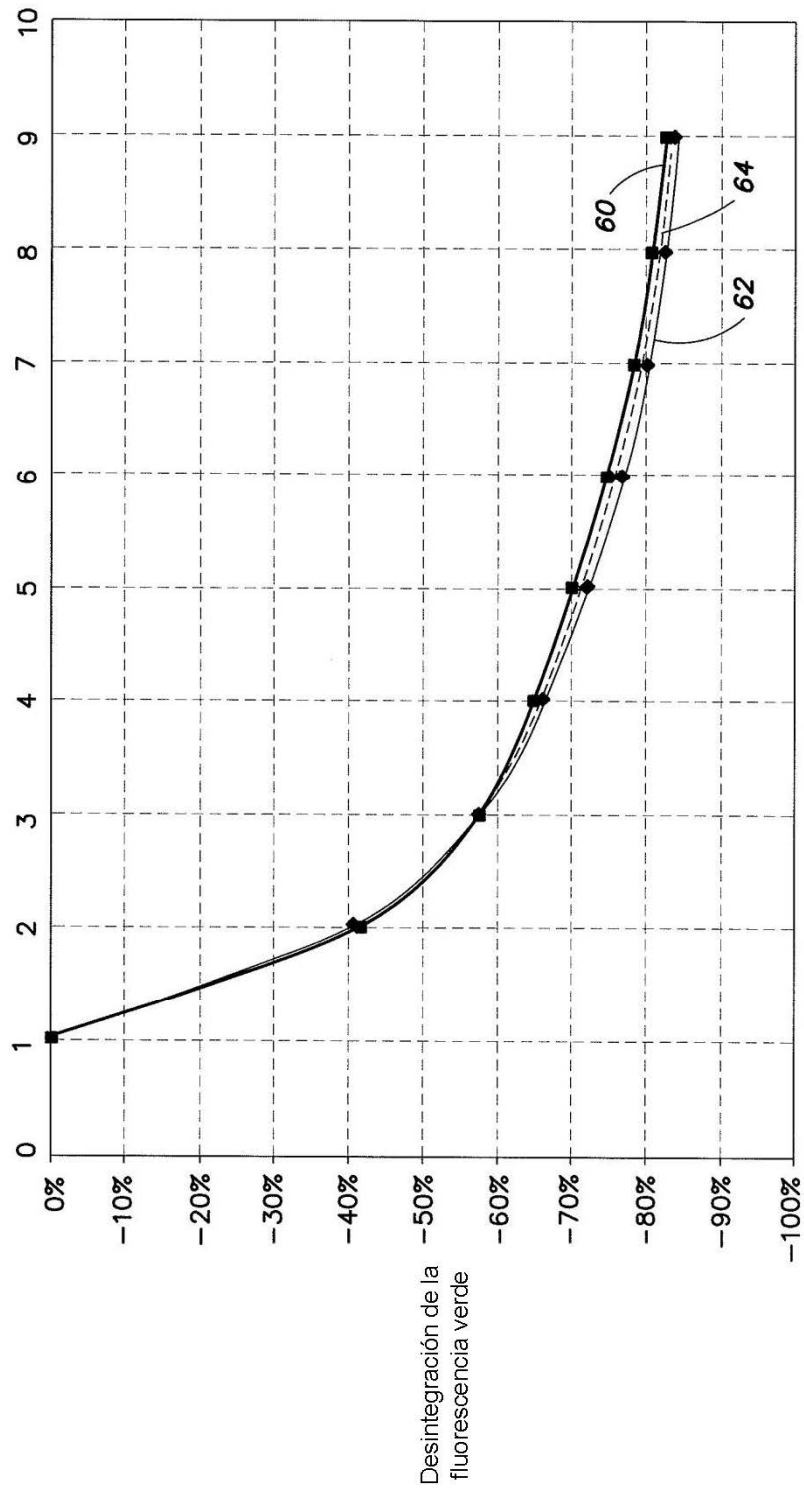


**FIG. 8**



Tiempo

FIG. 9



Tiempo

**FIG. 10**