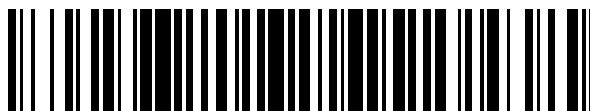


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 590 260**

51 Int. Cl.:

**G01N 15/14** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 15/00** (2006.01)

**G01N 21/03** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.02.1999 PCT/US1999/03775**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.09.1999 WO9945384**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.1999 E 99909542 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 1062507**

54 Título: **Determinación del diferencial de glóbulos blancos**

30 Prioridad:

**07.03.1998 US 77207 P**

**18.02.1999 US 252153**

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

**21.11.2016**

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (50.0%)**

**100 Abbott Park Road, Patent & Trademark Dept.  
0377, AP6A-1A**

**Abbott Park, IL 60064-6008, US y**

**BECTON DICKINSON AND COMPANY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WARDLAW, STEPHEN C.;**

**LEVINE, ROBERT A. y**

**RODRIGUEZ, RODOLFO R.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 590 260 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**

Determinación del diferencial de glóbulos blancos

5 Campo técnico

Esta invención se refiere a un método para analizar una muestra quiescente de sangre completa anticoagulada. Más particularmente esta invención se refiere a un método para analizar la muestra de sangre en un estado quiescente para proporcionar un recuento diferencial de glóbulos blancos, un análisis de recuento de reticulocitos, una enumeración de glóbulos rojos nucleados, y a la capacidad de detectar células en circulación nucleadas anormales, tales como células cancerosas, que son eventos raros.

Técnica anterior

15 Los recientes avances en hematología analítica han aumentado la cantidad y calidad de la información disponible a partir de una muestra de sangre de un paciente. Como resultado, el interés de la comunidad médica en el uso de muestras sanguíneas de pacientes como herramienta de diagnóstico también ha aumentado, siendo el ensayo realizado más habitualmente sobre sangre completa anticoagulada el recuento de sangre completa o CBC, que es un conjunto de ensayos que pueden incluir, además de la enumeración de los componentes celulares y plaquetas, la métrica de glóbulos rojos; los recuentos de reticulocitos; y el recuento diferencial de leucocitos (LDC o "Dif") que es la clasificación de los tipos de glóbulos blancos presentes en la muestra de sangre. Las propiedades físicas generales de la muestra, concretamente diversas células o recuentos deben analizarse usando métodos cuantitativos que se refieren a la muestra completa. En instrumentación y métodos convencionales, esto requiere una medición y dilución precisa de la muestra, seguida por un aparato especializado de medición.

25 Adicionalmente, el instrumento debe medir aspectos cuantitativos de las células individuales, que habitualmente implica proporcionar una alta dilución de la muestra con un posterior pase del material diluido a través de una celda de flujo que mide las células usando medios eléctricos u ópticos. Además, se usan mediciones cualitativas para clasificar el porcentaje de glóbulos blancos totales que están compuestos de subpoblaciones específicas. La cantidad de subpoblaciones depende de la sofisticación del instrumento implicado, que puede ser tan poco como dos o más de siete clasificaciones.

35 Históricamente, los aspectos diferenciales del CBC se han realizado usando métodos diferentes de los usados para la enumeración. Por ejemplo, la parte LDC de un CBC se realizaba tradicionalmente distribuyendo una pequeña cantidad de sangre no diluida sobre un portaobjetos, tiñendo el frotis fijado seco y examinando el frotis en un microscopio. Pueden obtenerse resultados razonables a partir de dicho frotis, pero la precisión y fiabilidad de los datos depende en gran medida de la experiencia del técnico y la técnica. Un problema con dichos frotis es que las células deben inactivarse y fijarse, y esto excluye muchos tipos de colorantes supravitales y análisis cuyos resultados dependen de la célula viva, tal como algunos análisis citoquímicos. Además, el uso de frotis sanguíneos es muy laborioso y costoso, y generalmente, por lo tanto, no está favorecido para aplicaciones comerciales.

45 Otro método de realización de LDC usa impedancia eléctrica o citometría de flujo óptico. La citometría de flujo implica pasar una muestra diluida de sangre a través de un pequeño recipiente donde la impedancia eléctrica o detectores ópticos pueden evaluar las células constituyentes según pasan en serie a través del recipiente. El mismo aparato también puede usarse para enumerar simultáneamente y proporcionar datos métricos de las células. Para evaluar WBC, la muestra de sangre debe diluirse y la muestra debe tratarse para mitigar la cantidad enorme de las RBC respecto a las WBC. Aunque de forma más conveniente y coherente que los métodos de frotis descritos anteriormente, la citometría de flujo también posee varias desventajas. Una desventaja de la citometría de flujo es el drenaje y los controles de fluidos que son necesarios para controlar el caudal de la muestra de sangre diluida pasados los detectores. El drenaje en citómetros de flujo actuales puede, y a menudo lo hace, filtrar, comprometiendo por tanto potencialmente la precisión y la seguridad del equipo. Estos análisis también son generalmente incapaces de proporcionar ningún tipo de análisis morfométrico, ya que no se obtiene una imagen real de cada célula; solamente puede analizarse la señal total de cualquier célula dada. Otra desventaja de muchos citómetros de flujo actuales se refiere a la precisión de los controles del flujo de fluido interno y el equipo automatizado de dilución. La precisión del citómetro de flujo depende de la precisión de los controles del flujo de fluido y el equipo de dilución de la muestra y su capacidad de permanecer calibrado de forma precisa. Los controles de flujo y el equipo de dilución requieren recalibrado periódico. La necesidad de recalibrado ilustra el potencial de resultados imprecisos y los indeseables costes de funcionamiento que existen con muchos citómetros de flujo actualmente disponibles. Un artículo autorizado por John L. Haynes y publicado Cytometry Supplement 3: 7-17 en 1988 describe los principios de la citometría de flujo, tanto de impedancia como óptica, y la aplicación de dicha tecnología a diversos campos de especialidad. Las muestras de sangre que se examinan en citómetros de flujo se diluyen en cualquier lugar de 10:1 a 50.000:1.

65 Otro enfoque para el análisis celular es la exploración capilar volumétrica resumida en las patentes de Estados Unidos n.º 5.547.849; 5.585.246 y otras, donde una muestra relativamente no diluida de sangre completa se coloca en un capilar de volumen y grosor conocidos y se examina mientras la sangre esté en un estado quiescente. Esta

técnica trata con la presencia de glóbulos rojos limitando las longitudes de onda de exploración a aquellas para las que los glóbulos rojos son relativamente transparentes, y requiere que la muestra se trate de modo que los glóbulos rojos no se agreguen durante el proceso de medición. Por tanto, esta técnica está limitada al uso de fluorescencia de longitud de onda más larga, y no existe dotación para la enumeración de reticulocitos o glóbulos rojos nucleados. Adicionalmente, como con la citometría de flujo, no hay información morfológica disponible a partir de las exploraciones. Hay varios instrumentos comerciales disponibles para realizar un CBC o ensayos relacionados, pero aquellos que proporcionan más de unos pocos ensayos CBC se vuelven rápidamente complejos, caros y propensos a mal funcionamiento. Además, existen varios métodos propuestos para ensayos hematológicos específicos, pero estos no proporcionan toda la información clínicamente útil que se espera en un CBC.

Los documentos EP0479231A1, US3961346A, US4790640A, US4207554A, US4125828A y EP1063974A1 describen los métodos de clasificación de las células sanguíneas, con tinción celular con colorante que emite fluorescencia cuando se ilumina a diversas longitudes de onda.

Todos los métodos anteriores están generalmente limitados a un único modo de análisis, en que una combinación de tinción histoquímica y morfología celular no es posible. Tener la capacidad de realizar estos dos tipos de ensayos expande la cantidad de grupos que pueden reconocerse por el método.

Sería deseable tener un método para examinar una muestra quiescente de sangre completa anticoagulada, siendo capaz dicho método de proporcionar resultados precisos para un LDC, enumeración de reticulocitos y detección de glóbulos rojos nucleadas y células nucleadas en circulación anormales, tales como células cancerosas, y que no requiere flujo del fluido de muestra a través de una cámara de muestreo durante el análisis de la muestra.

#### Descripción de la invención

Esta invención proporciona un método para identificar al menos una subpoblación de células diana que contienen material nucleado o que contienen remanentes intracelulares de material nucleado, como se reivindica en la reivindicación 1. El método puede ser para su uso en el examen y obtención de información a partir de una muestra de sangre completa anticoagulada sustancialmente no diluida quiescente que está contenida en una cámara. La expresión "sustancialmente no diluida" como se usa en relación con esta invención describe una muestra de sangre que se diluye en no más de aproximadamente 1:1, y preferiblemente mucho menos. Generalmente, los únicos reactivos que se usarán en la realización del método de esta invención son colorantes, tintes y anticoagulantes, y estos reactivos, incluso si son líquidos, no están diseñados para diluir la muestra. El análisis puede realizarse dentro de una cámara que tiene una profundidad fija, siempre que la profundidad soporte la formación de agregaciones y lagunas de glóbulos rojos, que se forman en una capa que tiene un grosor de aproximadamente siete a aproximadamente cuarenta micrómetros, dependiendo del hematocrito de la muestra. Sin embargo, tener una profundidad fija hace más difícil analizar las muestras que tienen un recuento de glóbulos blancos ampliamente variable, y la enumeración simultánea de reticulocitos es imposible en este tipo de cámara.

Se usa una cámara que tiene un grosor variable a través del plano como se describe a continuación. Las varias regiones en la cámara crearán suficientes fuerzas capilares en todas las regiones de la cámara para causar propagación de la muestra de sangre por toda la cámara, que finalmente produce una muestra de sangre quiescente en la cámara. El único movimiento en la muestra de sangre en el momento del análisis será un movimiento browniano de los constituyentes formados de la muestra de sangre, cuyo movimiento no incapacita la utilidad de esta invención. El aparato incluye una cámara portamuestras que tiene paredes opuestas de contención de la muestra, al menos una de las cuales es transparente, que son paredes que convergen preferiblemente en al menos una parte de la cámara.

En la realización preferida, el grosor a través del plano de la cámara por tanto varía en diferentes regiones de la cámara. Como se usa en esta descripción la expresión "a través del plano" se refiere a una línea de visión que corresponde a la distancia más corta entre las paredes convergentes en cualquier región de la cámara. El grado de convergencia en las dos paredes, es decir, la distancia entre las dos paredes, en cualquier punto particular en la cámara es conocido o puede medirse después de que la muestra se haya colocado en la cámara, como se describirá a partir de ahora en este documento.

La región más delgada en la cámara estará dimensionada de modo que se formará una monocapa de células de glóbulos rojos individuales presentes en la muestra cuando la cámara se llena con la muestra de sangre. El grosor de esta región de la cámara debe ser entre aproximadamente dos y aproximadamente siete micrómetros, y es preferiblemente de aproximadamente cinco micrómetros. Por tanto, las mediciones de los recuentos de reticulocitos diferenciales de glóbulos rojos pueden obtenerse en esta región de la cámara.

A partir del punto delgado de la cámara, el grosor de la cámara aumenta para formar regiones progresivamente más gruesas en la cámara que se usan para diferenciar y enumerar de forma diferencial diversos tipos de glóbulos blancos y glóbulos rojos nucleados en la muestra de sangre. Los glóbulos rojos nucleados tienden a ser de aproximadamente el tamaño de linfocitos pequeños, pero pueden ser más grandes. El grosor de la cámara en esta

región de la misma está típicamente en el intervalo de entre aproximadamente siete a aproximadamente cuarenta micrómetros. La cámara está contenida en un portamuestras en que puede extraerse la muestra de sangre.

La muestra a ensayarse se mezcla con un colorante que puede ser, por ejemplo, un colorante o colorantes fluorescentes, y la mezcla resultante se propaga en la cámara para formar una muestra quiescente que tiene un grosor variable debido a la convergencia de las paredes de la cámara. El colorante o colorantes pueden añadirse a la muestra antes de la admisión de la muestra en la cámara, o el colorante puede añadirse a la muestra mientras la muestra está dentro de los confines de la cámara, tal como por recubrimiento en seco del colorante sobre las paredes de la cámara. Las regiones de interés en la cámara se iluminan selectivamente por una fuente de luz que tiene una longitud de onda o longitudes de onda seleccionadas, que causa que el colorante en la muestra emita fluorescencia. Las regiones en la cámara que contienen las monocapas de glóbulos rojos y los agregados apilados glóbulos blancos y glóbulos rojos en la muestra de sangre se exploran de este modo, preferiblemente por un instrumento óptico, y los resultados de las exploraciones pueden digitalizarse y analizarse. Los recuentos diferenciales de plaquetas con plaquetas agrupadas por tamaño y contenido de ARN, determinados por fluorescencia, también pueden obtenerse en la región de la cámara donde se forman los agregados apilados y lagunas de glóbulos rojos. Las plaquetas con ARN aumentado son plaquetas más jóvenes.

El método se usa para realizar al menos un recuento diferencial de glóbulos blancos de tres partes en una muestra de sangre completa anticoagulada, incluyendo dicho método las etapas de: proporcionar una cámara de muestreo que esta dimensionada para posibilitar la agregación de la población de glóbulos rojos y la separación de glóbulos blancos individuales de los glóbulos rojos en una muestra de sangre completa anticoagulada sustancialmente no diluida que se introduce en la cámara. Una mezcla de un colorante o colorantes fluorescentes y la muestra de sangre completa anticoagulada se forma en la cámara de muestreo.

El colorante o colorantes son funcionales para poner de relieve de forma diferencial al menos tres diferentes tipos de glóbulos blancos en la sangre completa, y preferiblemente cinco tipos diferentes de glóbulos blancos. La mezcla se deja dispersar a través de la cámara para formar grupos quiescentes separados de uno o más glóbulos blancos individuales dentro de las lagunas abiertas de plasma en campos de trabajo ópticos en la muestra. Debe entenderse que los glóbulos blancos se excluyen en gran medida de la masa de glóbulos rojos según se agregan los últimos. Sin embargo, para los propósitos de esta invención, los glóbulos blancos pueden descansar sobre la parte superior de los glóbulos rojos individuales de los agregados de glóbulos rojos y aún detectarse y evaluarse siempre que los glóbulos blancos sean visibles al instrumento de exploración. Los campos se exploran de forma óptica realizando una exploración campo por campo X-Y-Z de la mezcla dispersada en la cámara bajo condiciones adecuadas de iluminación que causa que se pongan de relieve de forma diferencia al menos tres y preferiblemente cinco o más tipos diferentes de glóbulos blancos por dicho colorante o colorantes. Todas las células diferencialmente puestas de relieve que se detectan en la mezcla se enumeran, y las células enumeradas se agrupan por tipo celular. Pueden usarse los mismos colorantes y condiciones de iluminación para realizar recuentos de reticulocitos o glóbulos rojos nucleados en la muestra de sangre debido a la presencia de material nuclear en las células. En el caso de los reticulocitos, el material nuclear en las células constituye remanentes del núcleo de las células, tal como ARN intracelular, y en algunos casos ADN intracelular. El material intracelular de emisión diferencial de fluorescencia presente en los reticulocitos puede caracterizarse como "remanentes de material nucleado intracelular". Los análisis de los parámetros de reticulocitos y glóbulos rojos no nucleados se realizan en la región más delgada de la cámara donde puede esperarse que los glóbulos rojos maduros individuales y monocapas de glóbulos rojos maduros, así como reticulocitos, se encuentren debido a su tamaño.

Por lo tanto, un objetivo de esta invención es proporcionar un método para obtener recuentos diferenciales de células sanguíneas de ciertas células sanguíneas nucleadas y plaquetas en una muestra de sangre completa anticoagulada quiescente.

Un objetivo adicional de esta invención es proporcionar un método que posibilite que una muestra de sangre completa sustancialmente no diluida se examine para recuentos diferenciales de subpoblaciones de glóbulos blancos; recuentos de subpoblaciones totales de glóbulos blancos; recuentos de reticulocitos; recuentos de glóbulos rojos nucleados; recuentos de plaquetas; y detección de células en circulación nucleadas anormales, tales como células cancerosas.

Breve descripción de los dibujos

Estos y otros objetivos y ventajas de la invención llegarán a ser más fácilmente evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de varias realizaciones de la invención cuando se toman junto con los dibujos adjuntos en que:

la FIG. 1 es una vista en perspectiva esquemática de un dispositivo de análisis de muestras sanguíneas que incluye una cámara de recepción de muestras, incluyendo dicha cámara regiones de grosor variable a través del plano;

la FIG. 2 es un diagrama de la relación entre el grosor de la cámara y la distancia desde la región de grosor más pequeño a través del plano en la cámara a cualquier otra región de grosor a través del plano en la cámara,

siendo el trazo sólido representativo de una cámara lineal tal como la mostrada en la FIG. 1 y siendo el trazo discontinuo representativo de una cámara de grosor variable no lineal;

5 la FIG. 3 es una vista en planta esquemática de una parte de una cámara de grosor variable formada de acuerdo con esta invención y que ilustra en un sentido esquemático el modo en que los constituyentes formados de diverso tamaño en una muestra de sangre quiescente se separarán en las diversas regiones de grosor en la cámara para ser individualmente visibles en diferentes campos de visión en la cámara;

10 la FIG. 4 es una vista en planta esquemática de una parte de la cámara que muestra cuatro campos diferentes de visión que podrían superponerse por un instrumento de exploración de muestras;

15 la FIG. 5 es una vista esquemática de un instrumento de exploración que puede usarse para identificar, contar y analizar ciertas características de los componentes formados de una muestra de sangre completa anticoagulada colocada en la cámara;

la FIG. 6 es un diagrama bidimensional que muestra el agrupamiento de grupos de glóbulos blancos en un conjunto específico de condiciones de análisis;

20 la FIG. 7 es un diagrama bidimensional que muestra el subagrupamiento de uno de los grupos re la FIG. 6 en un segundo conjunto de condiciones de análisis; y

la FIG. 8 es un diagrama bidimensional que muestra el subagrupamiento de uno o más de los grupos de la FIG. 6 en un tercer conjunto de condiciones de análisis.

25 Descripción detallada de las realizaciones específicas de la invención

Con referencia ahora a los dibujos, la FIG. 1 es una ilustración esquemática de un dispositivo que se indica generalmente por el número 2, incluyendo dicho dispositivo 2 una cámara que contiene la muestra 14 que tiene un grosor variable a través del plano. El dispositivo 2 incluye una pared de soporte inferior 4, que por motivos ilustrativos puede ser, por ejemplo, un portaobjetos de microscopio. El dispositivo también puede incluir un calzo rectilíneo 6; y una pared superior 8, que por motivos ilustrativos puede ser, por ejemplo, un cubreobjetos de microscopio. Al menos una de las paredes 4 u 8 debe ser transparente para que la muestra dispuesta entre las mismas pueda examinarse a través de la pared transparente 4 u 8. Si se desea, las dos paredes 4 y 8 pueden ser transparentes. La pared 8 tiene un borde 10 que descansa sobre, o muy cerca de, la pared 4, y un borde opuesto 12 que está dispuesto sobre la superficie superior del calzo S. El resultado de la relación convergente entre las paredes 4 y 8 es la formación de una cámara 14 que tiene un grosor variable a través del plano, aumentando el grosor a través del plano desde el bode 10 hasta el borde opuesto 12 de la pared 8, como se observará en la FIG. 1.

40 La FIG. 2 es una representación gráfica que muestra el modo en que el grosor de la cámara 12 puede variar desde el borde más delgado 10 hasta el borde más grueso 12. La línea sólida PL muestra una relación grosor-distancia creada por una configuración de cámara que es lineal; y la línea discontinua PNL muestra una relación grosor-distancia creada por una configuración de cámara que es no lineal.

45 La FIG. 3 es una representación esquemática de una vista en planta del dispositivo 2 que incorpora la cámara 14, y el modo en que cualquier constituyente formado de diferente tamaño presente en la muestra de sangre que se está examinando se distribuirá de forma quiescente en la cámara 14 cuando la última se llena con la muestra. El numero 10 indica una región de grosor menor de la cámara 14, y el numero 12 indica una región de grosor mayor de la cámara 14. En la representación del dispositivo 2 mostrado en la FIG. 3, hay tres regiones de diferente grosor, A, B y C en la parte de la cámara 14 representada. La región A es una región de grosor menor en la cámara 14; la región B es una región de grosor medio en la cámara 14; y la región C es la región de grosor mayor en la cámara 14. Obviamente, esta cantidad particular de diferentes regiones de grosor se usa simplemente para ilustrar una característica principal de la cámara preferida 14 de esa invención, y no es limitante de la invención, ya que la cámara 14, como se ha indicado anteriormente puede incluir una cantidad esencialmente infinita de regiones de diferente grosor. También existen tres diferentes campos de visión 1, 3 y 5 mostrados en la FIG. 3. Estos campos de visión 1, 3 y 5 están representados como círculos para ilustrar el campo de visión observado por un instrumento óptico, tal como un microscopio. En la ilustración representada en la FIG. 3, la muestra de sangre ha llenado la cámara 14 y ha estado quiescente durante al menos unos pocos segundos. En la región más delgada A de la cámara 14 se encuentran los glóbulos rojos aplanados, individualmente 32 o en una monocapa 31. Unas pocas plaquetas 30 también pueden encontrarse en la región A. Pueden realizarse recuentos de reticulocitos y de glóbulos rojos no nucleados en la región A de la cámara 14, como se describe a continuación en este documento.

50 En la parte inferior de la región B, existe suficiente espacio para que los glóbulos rojos formen agregados apilados u otros agregados 33 que están rodeados por lagunas de plasma que están libres de los glóbulos rejos debido a la formación de agregados apilados. En el campo de visión 3 hay suficiente volumen de cámara para permitir la enumeración y clasificación de los glóbulos blancos 34 y también de glóbulos rojos nucleados. Los glóbulos blancos

34 por tanto pueden ensayarse en esta región para sitios de receptores superficiales; pueden tiparse; pueden medirse volumétricamente, pueden estudiarse morfológicamente; y pueden obtenerse cantidades pequeñas adicionales de información acerca de los glóbulos blancos 34 a partir de la muestra de sangre en la parte superior de la región B. Según aumenta el grosor de la cámara hasta la mostrada en la región C, los aglomerados de glóbulos rojos 33 forman una capa confluyente, y se reduce la capacidad de localizar glóbulos blancos, aunque esta región puede utilizarse para recuentos muy bajos de glóbulos blancos.

La FIG. 4 es una vista en planta de un fragmento de la cámara 14, donde el número 12 indica un extremo más grueso de la cámara 14 y el número 10 indica un extremo más delgado de la cámara 14. Una cámara 14 que tiene un grosor variable que varía de aproximadamente cero micrómetros en su parte más delgada 10, hasta aproximadamente doscientos micrómetros en su parte más gruesa 12, permitirá un intervalo dinámico de factor cien de recuentos por unidad de volumen de la muestra de particulados de la muestra de sangre. Hay cuatro campos esquemáticos de visión 7', 7, 9 y 11 mostrados en la FIG. 4. Los constituyentes formados 32 se representan en cada uno de los campos de visión 7, 9 y 11, y ninguno se muestra en el campo de visión 7'. Las lagunas 35 también se representan en los campos de visión 7', 7 y 9, pero no en el campo 11.

La FIG. 5 es una representación esquemática de un ensamblaje de instrumento microscópico colorimétrico automatizado que está indicado generalmente por el número 54, y puede usarse para explorar una muestra de sangre que está contenida en el dispositivo 2 y puede, sin intervención humana significativa, analizar colorimétricamente longitudes de onda de emisiones de color de diferentes tipos de glóbulos blancos, reticulocitos y glóbulos rojos nucleados en la muestra de sangre, identificando de ese modo y diferenciando estos tipos celulares de otros. El ensamblaje de instrumento 54 está diseñado para crear y almacenar o transmitir las imágenes de diferentes tipos de glóbulos blancos, reticulocitos y glóbulos rojos nucleados en la muestra de sangre que se está explorando. El ensamblaje de instrumento 54 incluye una fase 56 que incluye pinzas 58 que acoplan el portamuestras 2 y posibilita que el portamuestras 2 se mueva de forma transversal en las direcciones X e Y según se exploran los contenidos del portamuestras 2.

Pueden usarse motores eléctricos reversibles 59 para rotar selectivamente los tornillos atornillados 60 en direcciones opuestas de modo que el portamuestras 2 pueda moverse de forma transversal en las direcciones X e Y. De este modo, pueden explorarse los contenidos completos del portamuestras 2. La realización automática del ensamblaje de instrumento descrito 54 incluye una cámara CCD 62, un divisor de haz 64 y un conjunto de lentes 66 que pueden moverse de forma selectiva en la dirección Z para enfocar las partes que contienen la muestra en el ensamblaje portamuestras 2. La cámara CCD 62 puede ver y registrar imágenes de la muestra a través de una pluralidad de filtros de diferente longitud de onda de emisión 68, 70 y 72 que pueden montarse sobre una rueda de filtros selectivamente giratoria 74. El ensamblaje de instrumento 54 también incluye una fuente de luz de excitación de alta intensidad 75, tal como una fuente de luz halógena, que dirige un haz de luz de excitación en el portamuestras 2 a través del divisor de haz 64 y el conjunto de lentes de enfoque 66. Una serie de filtros de longitud de onda de luz de excitación 76, 78 y 80 pueden montarse sobre una rueda de filtros selectivamente giratoria 82. El divisor de haz 64 desvía el haz de luz de excitación hacia la lente de enfoque 66, y se enfoca sobre el portamuestras 2 por la lente 66. Por tanto, las dos ruedas de filtros 74 y 82 pueden permitir controlar de forma selectiva y variar las longitudes de onda de la fuente de luz de excitación, así como de la fuente de luz emitida. Un controlador de procesador pre-programado 84 es funcional para controlar de forma selectiva el movimiento del portamuestras 2; la rotación de las ruedas de filtros 74 y 82; y el funcionamiento de la cámara CCD 62. El controlador 84 por tanto posibilita el funcionamiento completamente automático del ensamblaje de instrumento 12 sin la necesidad de intervención humana significativa.

Como se ha indicado anteriormente, según el instrumento de exploración examina la cámara 14 para regiones útiles en la cámara 14 en funcionamiento de un examen de la muestra que implica derivar los recuentos diferenciales de glóbulos blancos, reticulocitos y glóbulos rojos nucleados en la cámara 14, verá los campos de visión tales como 7', 7, 9 y 11, como se muestra en la FIG. 4.

Cuando el instrumento de exploración ha examinado una cantidad clínicamente significativa de células útiles, completará el análisis diferencial de glóbulos blancos, y el análisis de reticulocitos y glóbulos rojos nucleados. La determinación de lo que constituye una cantidad estadísticamente significativa de constituyentes contados dependerá de un margen de error clínicamente aceptable predeterminado para el procedimiento de recuento. Se apreciará que esta cantidad variará dependiendo de los constituyentes que se estén contando.

Los glóbulos blancos, los glóbulos rojos nucleados y los reticulocitos que contienen remanentes ribosómicos de material nuclear, que son células presentes en la muestra y que se tiñen de forma supravital con un colorante, tal como naranja básico 21, pueden identificarse en virtud de la fluorescencia característica de las células a 530 nm, 585 nm y 660 nm cuando se excitan por luz en el intervalo de 485 nm, y por su fluorescencia a 610 nm cuando se excitan por luz de 560 nm. Los glóbulos blancos quiescentes pueden separarse por el instrumento 54 en grupos diferenciados que consisten en linfocitos, monocitos, granulocitos, eosinófilos y basófilos en dicha cámara. Pueden usarse otros colorantes tales como naranja de acridina con longitudes de onda similares para realizar un análisis similar.

El método preferido para clasificar o diferenciar las diversas células sanguíneas es el siguiente. Se iluminan múltiples campos que contienen glóbulos blancos, y que también pueden contener glóbulos rojos nucleados grandes, con una longitud de onda de excitación de 485 nm, y se localizan los glóbulos blancos y cualquier glóbulo rojo nucleado. El algoritmo de localización depende del hecho de que los glóbulos blancos y algunos glóbulos rojos nucleados grandes son los únicos objetos grandes en cualquier campo que emite fluorescencia. Se localiza la cantidad necesaria de glóbulos blancos, y se registran cinco valores de emisión, donde:  $L_1$ ,  $L_2$  y  $L_3$  son la emisión total de cada célula a 530 nm, 580 nm y 660 nm respectivamente, y donde las emisiones totales se miden sumando las intensidades de los píxeles de las imágenes de las células;  $AL_1$  es la intensidad promedio de píxel de cada célula a 530 nm cuando se excita a 485 nm;  $AL_5$  es la intensidad promedio de píxel medida para cada célula a 610 nm cuando la célula se excita con luz a 560 nm; y  $A_{580}$  es el área de la célula determinada por la emisión a 580 nm cuando se excita a 488 nm. Por tanto, los datos usados para diferenciar los tipos celulares incluyen datos fotométricos ( $L_1$ ,  $L_2$  y  $L_3$ ) así como datos morfométricos ( $AL_1$ ,  $AL_5$ ,  $A_{580}$ ).

La FIG. 6 muestra las células en imágenes por el instrumento 54 presentadas en espacio bidimensional, donde el eje Y es la relación de  $L_1/L_2$ , y el eje X es la relación de  $L_2/L_3$ . Usando análisis de agrupación, las células se agrupan en tres poblaciones, donde el grupo 40 representa los neutrófilos y eosinófilos, el grupo 41 representa los monocitos y linfocitos, y el grupo 42 representa los basófilos. Estos son los tipos de separaciones celulares basadas en datos fotométricos solamente. Para obtener una separación más definida, la adición de datos morfométricos subdividirá adicionalmente los grupos para permitir la identificación de más tipos celulares.

La FIG. 7 muestra el grupo 40 que ahora está sometido a análisis adicional de agrupación bidimensional, donde el eje X es la relación de  $AL_1/AL_5$ , y el eje Y es la relación de  $L_1/L_3$ . Este análisis de agrupación ahora permite la división del grupo original 40 en dos grupos diferentes que representan los eosinófilos 43 y los neutrófilos 44.

Si el grupo 41 se somete a análisis adicional de agrupación como se muestra en la FIG. 8, donde el eje X es  $A_{580}$  y el eje Y es la relación de  $L_1/L_3$ , el grupo 41 puede separarse en sus dos componentes, los monocitos 46 y los linfocitos 45. Por tanto, las etapas descritas anteriormente son capaces de subdividir una población de glóbulos blancos en al menos cinco subgrupos. Los diferentes tipos de glóbulos blancos identificados y enumerados se registran típicamente como porcentajes de la cantidad total de glóbulos blancos explorados durante el procedimiento.

La presencia de los reticulocitos dentro de la población de glóbulos rojos se determina midiendo la intensidad total de la fluorescencia a 585 nm y 660 nm a partir de cada glóbulo rojo cuando se excita a 485 nm, y esas células que tienen una fluorescencia total mayor que la de glóbulos rojos normales se determinan como reticulocitos. Asimismo, aquellos glóbulos rojos que muestran una fuerte fluorescencia a 530 nm se consideran glóbulos rojos nucleados.

Los ejemplos anteriores han usado colorantes supravitales que dan una indicación del carácter general de las células, pero también es posible usar agentes de unión epitópica específica, tales como anticuerpos, que pueden marcarse con colorantes fluorescentes, o marcarse con particulados coloreados o fluorescentes. Estos pueden servir para separar adicionalmente subpoblaciones de las células nucleadas basándose en antígenos superficiales u otros grupos de unión. Ejemplos de estos son marcadores que distinguen linfocitos CD4 y CD8 de la población general de linfocitos. El método de esta invención no se ve afectado de forma adversa por la presencia de glóbulos rojos en campos de visión en la muestra de sangre que se está explorando, y por tanto no requiere preparación significativa de la muestra, tal como diluciones o separación gravimétrica de diversos tipos celulares. La información morfométrica tal como el tamaño, granularidad, contenidos de material nucleado, receptores superficiales y similares puede detectarse por la técnica de esta invención.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para identificar al menos una subpoblación de células diana que contienen material nucleado o que contienen remanentes intracelulares de material nucleado, estando contenidas dichas células diana en una muestra quiescente de sangre completa anticoagulada que se mezcla con un colorante fluorescente, y que se diluye en no más de aproximadamente 1:1;
- 5 en el que dicha muestra se dispersa se dispersa en una cámara de visión (14) que incluye una región que contiene células separadas individualmente, teniendo dicha región un grosor variable a través del plano, como se define en este documento, que varía de aproximadamente cero micrómetros a aproximadamente cuarenta micrómetros; en el
- 10 que dicho colorante es funcional para poner de relieve de forma diferencial al menos tres tipos diferentes de glóbulos blancos (34) en dicha muestra;
- comprendiendo adicionalmente dicho método:
- 15 a) la etapa de exploración óptica de campos seleccionados de visión (1, 3, 5) en dicha región, conteniendo dichos campos glóbulos rojos individuales (32) y/o monocapas (31) de glóbulos rojos y/o agregados de glóbulos rojos (33);
- b) la etapa de iluminación de dichos campos seleccionados de visión (1, 3, 5) con una fuente de iluminación de una o más longitudes de onda preseleccionadas funcionales para causar que dicho colorante fluorescente produzca emisiones fluorescentes de material nucleado o material nucleado remanente de una pluralidad de
- 20 longitudes de onda conocidas, siendo dichas emisiones características de subpoblaciones de tipos de glóbulos blancos (34), en el que dichas longitudes de onda preseleccionadas incluyen luz en el intervalo de 485 nm, y dichas longitudes de onda conocidas incluyen 530 nm, 585 nm, y 660 nm; y
- c) la etapa de análisis de dichas emisiones a dicha pluralidad de longitudes de onda conocidas para identificar las subpoblaciones de células en los campos de visión;
- 25 en el que la cámara de muestra (14) tiene paredes opuestas de contención de la muestra (4, 8), y la expresión "a través del plano" se refiere a una línea de visión que corresponde a la distancia más corta entre las paredes en una región dada de la cámara.
- 30 2. El método de la reivindicación 1, en el que la cámara de visión incluye regiones adicionales (C) que tienen un grosor a través del plano que es mayor de aproximadamente cuarenta micrómetros.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el colorante es un colorante supravital.
- 35 4. El método de la reivindicación 1, en el que la subpoblación de células nucleadas es una subpoblación de glóbulos blancos (34).
5. El método de la reivindicación 1, en el que el colorante es parte de una partícula de unión que está dirigida contra un epítipo sobre la subpoblación de células nucleadas.
- 40 6. El método de la reivindicación 1, en el que las emisiones se caracterizan por características fotométricas y/o morfométricas que pueden usarse para identificar la subpoblación en cuestión.



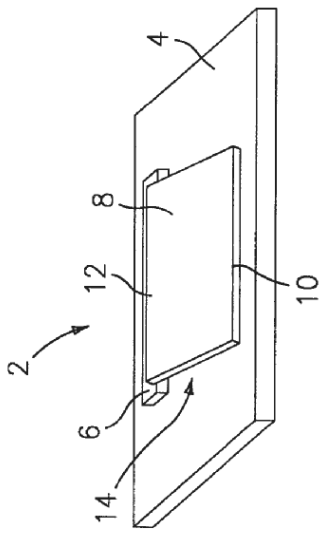


FIG. 1

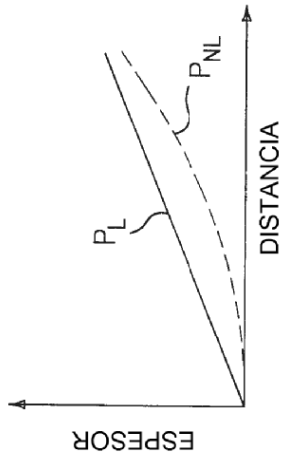


FIG. 2

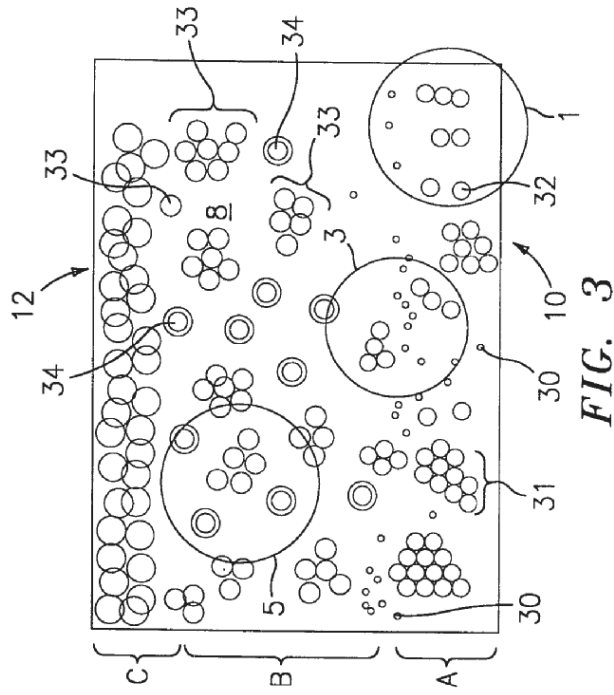
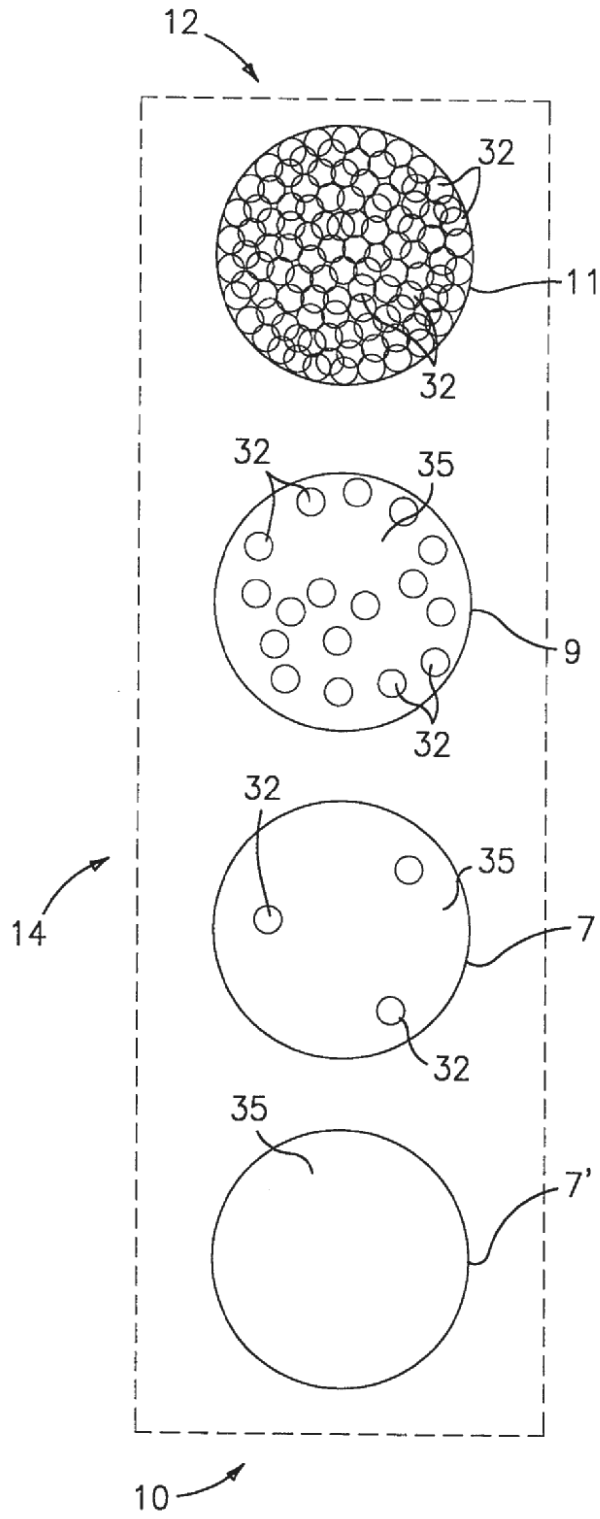


FIG. 3



**FIG. 4**

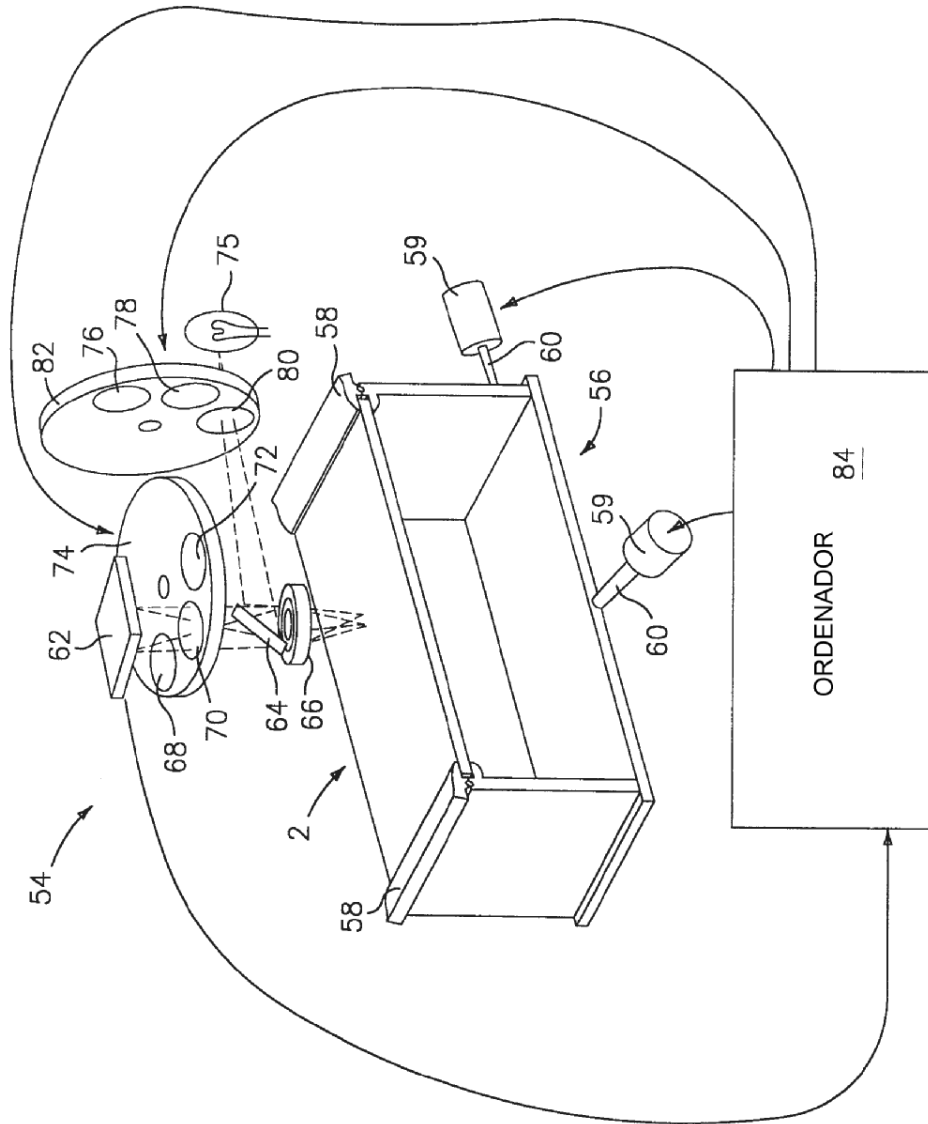
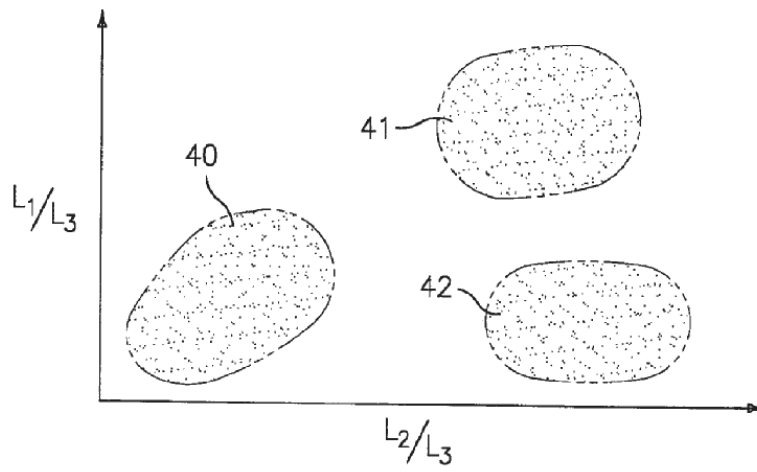
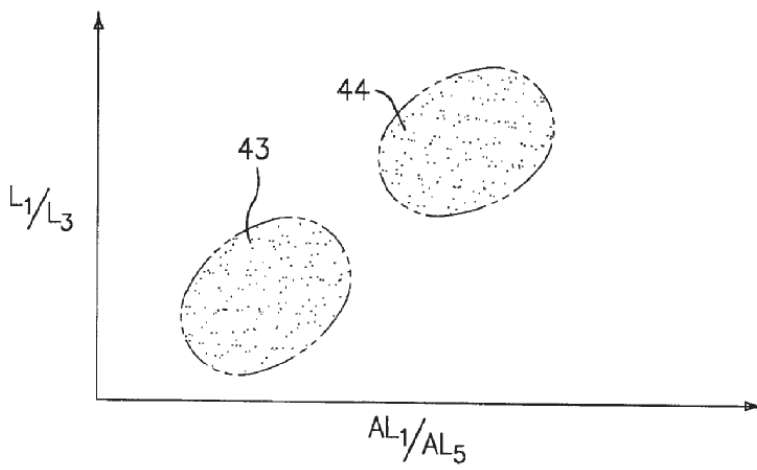


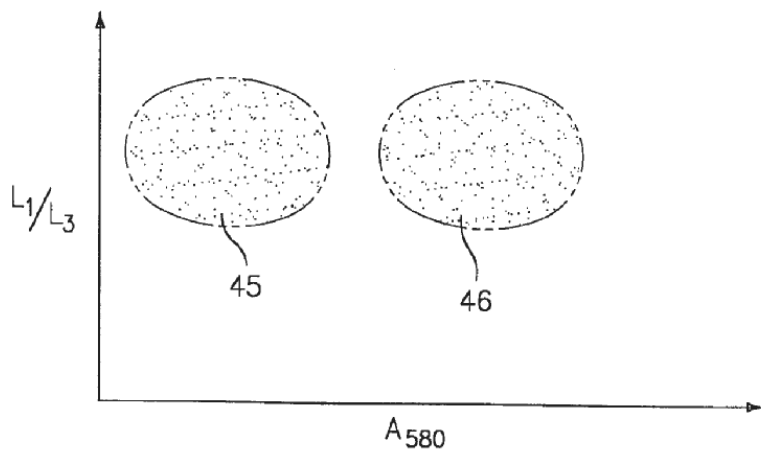
FIG. 5



**FIG. 6**



**FIG. 7**



**FIG. 8**