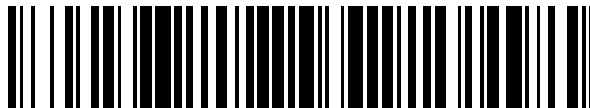


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 978**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/03** (2006.01)

**G01N 15/14** (2006.01)

**A61B 5/15** (2006.01)

**G01N 21/11** (2006.01)

**A61B 5/157** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2006 E 06110903 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 1701150**

54 Título: **Recuento de glóbulos blancos**

30 Prioridad:

**11.03.2005 SE 5005491**

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

**09.01.2018**

73 Titular/es:

**HEMOCUE AB (100.0%)  
P.O. Box 1204  
262 23 Ängelholm, SE**

72 Inventor/es:

**LINDBERG, STELLAN y  
SVENSSON, JOHNNY**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

**ES 2 648 978 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**

Recuento de glóbulos blancos

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a un dispositivo de adquisición de muestras, a un método y a un sistema para la enumeración volumétrica de glóbulos blancos en una muestra de sangre.

**10 Antecedentes de la invención**

La determinación del recuento de glóbulos blancos a menudo es importante en relación con el tratamiento de un paciente. Este análisis puede ser necesario para diagnosticar por ejemplo leucemia, o enfermedades infecciosas o inflamatorias o para monitorizar tratamientos. Es deseable permitir que los resultados del análisis se obtengan lo más rápidamente posible con el fin de minimizar los tiempos de espera para los pacientes y permitir que un médico tome una decisión de tratamiento y diagnóstico directamente cuando está realizando un primer examen del paciente. Por tanto, sería preferible proporcionar un método de análisis que el médico o una enfermera pueda realizar rápidamente sin necesidad de enviar la prueba a un laboratorio.

Actualmente, el recuento de glóbulos blancos se obtiene normalmente a través de un procedimiento manual mediante la tinción de una muestra de sangre y la observación microscópica de la muestra en una cámara de recuento especial, por ejemplo una cámara de Bürker. La cámara de recuento está dotada de una retícula que divide la cámara en volúmenes pequeños bien definidos. Se permite que los glóbulos blancos sedimenten en el fondo de la cámara de recuento con el fin de permitir que el microscopio enfoque todas las células en la cámara y, por tanto, de facilitar el recuento. Por tanto, es necesario que la muestra sedimente durante varios minutos antes de realizar el recuento. Entonces puede determinarse el recuento de glóbulos blancos contando el número de glóbulos sanguíneos por recuadro en la retícula. El recuento de glóbulos blancos lo obtiene manualmente un analista, que es necesario que tenga experiencia en la realización del análisis con el fin de poder realizar un análisis fiable.

Este análisis requiere mucho tiempo. Además, puesto que se realiza manualmente, los resultados del análisis pueden variar dependiendo de la persona que realiza el análisis.

Hay un número limitado de métodos de análisis automatizados existentes para determinar el recuento de glóbulos blancos. El recuento de glóbulos blancos puede determinarse por medio del principio de Coulter, que se basa en determinar el tamaño celular y de ese modo el tipo celular detectando una impedancia. Un método para contar glóbulos blancos mediante el principio de Coulter se describe en el documento US 5.262.302.

El principio de Coulter es el método de análisis automatizado, predominante, que está usándose actualmente. Sin embargo, se han descrito algunos otros métodos. Uno de tales métodos para determinar el recuento de glóbulos blancos se da a conocer en el documento US 5.585.246. En este caso, tiene que prepararse una muestra de sangre mediante mezclado con un tinte fluorescente y un complejo de ligando que marca los glóbulos blancos. La muestra se introduce en un capilar y se irradia por una fuente de láser que explora la muestra en el capilar. Se mide la fluorescencia con el fin de determinar el número de glóbulos blancos. Se da a conocer un método similar en el documento WO 97/02482, usando un tinte fluorescente y una fuente de láser que explora un capilar. Este método está adaptado para la enumeración de glóbulos blancos en productos de aféresis que contienen un número limitado de glóbulos blancos. En este caso, el capilar es bastante grueso y es necesario esperar hasta que los glóbulos blancos han sedimentado en el fondo del capilar antes de que pueda explorarse el capilar.

En el documento WO 99/45384, se muestra una muestra que contiene una cámara que tiene un grosor variable. El grosor variable separa diferentes compuestos de la sangre. La muestra de sangre se tiñe con un colorante para destacar de manera diferencial al menos tres tipos diferentes de glóbulos blancos en la muestra de sangre. Los glóbulos blancos pueden enumerarse usando un instrumento de exploración óptico para visualizar una parte de la cámara.

En el documento EP 1 161 994 A2, se da a conocer una cubeta para insertar hemoderivados y reactivos en la misma. La cubeta tiene un cuerpo principal hueco que contiene el hemoderivado y el reactivo de tinción fluorescente en hemólisis. La cubeta está compuesta por un plástico incoloro y transparente y tiene una tapa compuesta por caucho. El reactivo de tinción fluorescente en hemólisis se añade a la cubeta cuando está realizándose el recuento de leucocitos. Después se añade el hemoderivado a la cubeta y se mezclan el reactivo y el hemoderivado y se hace reaccionar el reactivo con el hemoderivado. Se centrifuga la cubeta y tras exponerse a la fuerza centrífuga, se ajusta sobre un micro-leucocitómetro para contar el número de los leucocitos en el hemoderivado.

La patente estadounidense 5.948.686 da a conocer una cámara de muestras que incluye una primera pared y una segunda pared transparente. Las paredes están separadas entre sí por un grosor a través del plano. El grosor a través del plano puede variar dependiendo del hematocrito y de los constituyentes objetivo. Se mezcla una muestra de sangre completa con una cantidad de un colorante sensible que puede estar en forma líquida o seca. Tras

mezclar la muestra, se introduce en la cámara de muestras donde la muestra se mantiene de manera quiescente durante un breve periodo de tiempo para permitir la formación de cilindros y lagunas. Las lagunas son áreas abiertas que quedan entre los cilindros formados, que son agrupaciones de glóbulos rojos. Los glóbulos blancos se encuentran en las lagunas junto con las plaquetas. Los glóbulos blancos se detectan mediante un microscopio en las lagunas transparentes.

Existe todavía la necesidad de acelerar y simplificar los métodos automatizados existentes para determinar el recuento de glóbulos blancos de manera que pueda proporcionarse el análisis en el punto de atención. Además, puesto que el recuento de glóbulos blancos es un análisis realizado con frecuencia de este tipo, cualquier mejora en el método de análisis tendría un gran impacto sobre la atención del paciente. Un método de análisis que proporcione la posibilidad de obtener resultados en el punto de atención sería particularmente ventajoso.

### Sumario de la invención

Un objeto de la invención es proporcionar un análisis sencillo para determinar la enumeración volumétrica de glóbulos blancos. Un objeto adicional de la invención es proporcionar un análisis rápido sin necesidad de aparatos complicados o grandes preparaciones de muestras.

Estos objetos se logran parcial o completamente mediante un dispositivo de adquisición de muestras, un método y un sistema según las reivindicaciones independientes. Las realizaciones preferidas son evidentes a partir de las reivindicaciones dependientes.

Por tanto, se proporciona un dispositivo de adquisición de muestras para la enumeración volumétrica de glóbulos blancos en una muestra de sangre. El dispositivo de adquisición de muestras comprende una cavidad de medición para alojar una muestra de sangre, en el que la muestra de sangre es sangre completa sin diluir que se ha adquirido directamente dentro de la cavidad de medición. La cavidad de medición tiene un grosor fijo predeterminado medido de manera que dicho grosor, cuando el dispositivo está en uso, en combinación con un área de la muestra de la que están obteniéndose imágenes, define un volumen de muestra analizada. El dispositivo de adquisición de muestras comprende además un reactivo, que se dispone en forma seca sobre una superficie que define la cavidad de medición, comprendiendo dicho reactivo un agente hemolizante para lisar glóbulos rojos en la muestra de sangre, y un agente de tinción para teñir selectivamente glóbulos blancos en la muestra de sangre. El dispositivo de adquisición de muestras comprende además una entrada de muestras, que está definida entre paredes opuestas dentro del dispositivo de adquisición de muestras, estando dispuestas dichas paredes tan cerca entre sí que puede crearse una fuerza capilar en la entrada de muestras. La cavidad de medición en el dispositivo de adquisición de muestras está dispuesta en comunicación con la entrada de muestras, y la cavidad de medición está definida por dos superficies planas, en la que las superficies planas están dispuestas a una distancia predeterminada entre sí para determinar un grosor de muestra para una medición óptica, y en la que las superficies planas de dicha cavidad de medición están dispuestas más cerca entre sí que dichas paredes de la entrada de muestras, de manera que una fuerza capilar puede introducir sangre desde la entrada de muestras en la cavidad de medición.

El dispositivo de adquisición de muestras proporciona la posibilidad de obtener directamente una muestra de sangre completa dentro de la cavidad de medición y proporcionarla para su análisis. No hay necesidad de preparación de la muestra. De hecho, la muestra de sangre puede aspirarse dentro de la cavidad de medición directamente de un dedo de un paciente en que se ha realizado una punción. Dotar el dispositivo de adquisición de muestras de un reactivo permite una reacción dentro del dispositivo de adquisición de muestras que hace que la muestra quede lista para el análisis. La reacción se inicia cuando la muestra de sangre entra en contacto con el reactivo. Por tanto, no hay necesidad de preparar manualmente la muestra, lo que hace que el análisis sea especialmente adecuado para realizarse directamente en una sala de reconocimiento mientras que el paciente está esperando.

Puesto que el reactivo se proporciona en forma seca, el dispositivo de adquisición de muestras puede transportarse y almacenarse durante largo tiempo sin afectar a la capacidad de uso del dispositivo de adquisición de muestras. Por tanto, el dispositivo de adquisición de muestras con el reactivo puede fabricarse y prepararse mucho antes de realizar el análisis de una muestra de sangre.

Aunque muchos métodos existentes pueden contar diferentes glóbulos sanguíneos e incluso subgrupos de glóbulos sanguíneos, el dispositivo de adquisición de muestras según la invención está adaptado específicamente para realizar la enumeración volumétrica de glóbulos blancos. El reactivo comprende un agente hemolizante que lisará los glóbulos rojos en la muestra de sangre. Esto destruye la posibilidad de enumerar los glóbulos rojos en la muestra. Por otra parte, el lisado de los glóbulos rojos simplifica la distinción e identificación de los glóbulos blancos dentro de la muestra de sangre.

El agente de tinción proporciona el marcaje de los glóbulos blancos individuales. Esto permite que los glóbulos blancos se visualicen o se detecten individualmente. Por ejemplo, los glóbulos blancos pueden detectarse explorando la cavidad de medición u obteniendo una imagen de la cavidad de medición. El recuento de glóbulos blancos puede obtenerse por tanto sumando el número de glóbulos blancos detectados individualmente en un volumen definido.

La invención también proporciona un método para la enumeración volumétrica de glóbulos blancos en una muestra de sangre. El método comprende adquirir una muestra de sangre dentro de una cavidad de medición de un dispositivo de adquisición de muestras, en el que la muestra de sangre es sangre completa sin diluir que se adquiere directamente dentro de la cavidad (20) de medición, irradiar la muestra, adquirir una imagen digital de una ampliación de la muestra irradiada en la cavidad de medición y analizar digitalmente la imagen digital para identificar los glóbulos blancos y determinar el número de glóbulos blancos en la muestra.

En el método según la invención, el dispositivo de adquisición de muestras tiene una entrada de muestras, que está definida entre paredes opuestas dentro del dispositivo de adquisición de muestras, en el que dichas paredes están dispuestas tan cerca entre sí que puede crearse una fuerza capilar en la entrada de muestras, y la cavidad de medición está dispuesta en comunicación con dicha entrada de muestras. La cavidad de medición está definida por dos superficies planas, en la que dichas superficies planas están dispuestas a una distancia predeterminada entre sí para determinar un grosor de muestra para una medición óptica, y en la que las superficies planas de dicha cavidad de medición están dispuestas más cerca entre sí que dichas paredes de la entrada de muestras, de manera que una fuerza capilar puede introducir sangre desde la entrada de muestras en la cavidad de medición. Además, la cavidad de medición contiene un reactivo, que está dispuesto en forma seca sobre una superficie que define la cavidad de medición, que comprende un agente hemolizante para lisar glóbulos rojos y un agente de tinción para reaccionar con la muestra de manera que los glóbulos blancos se tiñan, en la que los glóbulos blancos se distinguen mediante la tinción selectiva del agente de tinción.

La invención proporciona además un sistema para la enumeración volumétrica de glóbulos blancos en una muestra de sangre. El sistema comprende un dispositivo de adquisición de muestras tal como se describió anteriormente. El sistema comprende además un aparato de medición que comprende un soporte de dispositivo de adquisición de muestras dispuesto para alojar el dispositivo de adquisición de muestras que contiene una muestra de sangre en la cavidad de medición, y una fuente de luz dispuesta para irradiar la muestra de sangre. El aparato de medición comprende además un sistema de obtención de imágenes, que comprende un sistema de ampliación y un medio de adquisición de imágenes digitales para adquirir una imagen digital de una ampliación de la muestra irradiada en la cavidad de medición, en el que los glóbulos blancos se distinguen en la imagen digital mediante la tinción selectiva del agente de tinción. El aparato de medición también comprende un analizador de imágenes dispuesto para analizar la imagen digital adquirida para identificar los glóbulos blancos y determinar el número de glóbulos blancos en la muestra de sangre.

El método y el sistema de la invención proporcionan un análisis muy sencillo de una muestra de sangre para determinar el recuento de glóbulos blancos. El análisis no requiere un aparato de medición complicado ni que un operario realice etapas avanzadas. Por tanto, puede realizarse en conexión directa con el examen de un paciente, sin necesidad de un técnico cualificado. El aparato de medición utiliza las propiedades del dispositivo de adquisición de muestras para realizar un análisis en una muestra de sangre completa sin diluir que se ha adquirido directamente dentro de la cavidad de medición. El aparato de medición se dispone para obtener una imagen de un volumen de la muestra para realizar una enumeración volumétrica de los glóbulos blancos a partir de la imagen.

Se permite que la muestra de sangre se mezcle con el reactivo en la cavidad de medición. En el plazo de algunos minutos o menos, la reacción de la muestra de sangre con el reactivo habrá hemolizado los glóbulos rojos y teñido los glóbulos blancos de manera que la muestra esté lista para presentarse para la medición óptica. La muestra de sangre puede mezclarse con el reactivo por ejemplo mediante dispersión o difusión del reactivo dentro de la muestra de sangre o haciendo vibrar o moviendo activamente el dispositivo de adquisición de muestras de modo que se produzca una agitación en la cavidad de medición.

El dispositivo de adquisición de muestras comprende un elemento de cuerpo que tiene dos superficies planas para definir dicha cavidad de medición. Las superficies planas están dispuestas a una distancia predeterminada entre sí para determinar un grosor de muestra para una medición óptica. Esto implica que el dispositivo de adquisición de muestras proporciona un grosor bien definido para la medición óptica, que puede usarse para determinar de manera precisa el recuento de glóbulos blancos por unidad volumétrica de la muestra de sangre. Un volumen de una muestra analizada estará bien definido por el grosor de la cavidad de medición y un área de la muestra de la que están obteniéndose imágenes. Por tanto, el volumen bien definido podría usarse para asociar el número de glóbulos blancos con el volumen de la muestra de sangre de manera que se determine el recuento volumétrico de glóbulos blancos.

La cavidad de medición tiene preferiblemente un grosor uniforme de 50-170 micrómetros. Un grosor de al menos 50 micrómetros implica que la cavidad de medición no fuerza a realizar un frotis de la muestra de sangre para dar lugar a una monocapa lo que permite que se analice un volumen mayor a lo largo de una área de sección transversal pequeña. Por tanto, puede analizarse un volumen suficientemente grande de la muestra de sangre con el fin de obtener valores fiables del recuento de glóbulos blancos usando una imagen relativamente pequeña de la muestra de sangre. El grosor es más preferiblemente de al menos 100 micrómetros, lo que permite que se analice un área de sección transversal incluso más pequeña o un volumen de muestra más grande. Además, el grosor de al menos 50 micrómetros y más preferiblemente de 100 micrómetros también simplifica la fabricación de la cavidad de medición

que tiene un grosor bien definido entre dos superficies planas.

Para la mayoría de las muestras dispuestas en una cavidad que tiene un grosor de no más de 170 micrómetros, el recuento de glóbulos blancos es tan bajo que solo habrá desviaciones menores debidas a los glóbulos blancos que se disponen solapándose entre sí. Sin embargo, el efecto de tales desviaciones estará relacionado con el recuento de glóbulos blancos y por tanto, al menos en cierto grado, pueden manejarse por medio de la corrección estadística de los resultados al menos para los valores grandes del recuento de glóbulos blancos. Esta corrección estadística puede basarse en calibraciones del aparato de medición. Las desviaciones serán incluso menores para una cavidad de medición que tenga un grosor de no más de 150 micrómetros, por lo que puede usarse una calibración más sencilla. Este grosor puede incluso no requerir ninguna calibración para los glóbulos sanguíneos solapantes.

Además, el grosor de la cavidad de medición es suficientemente pequeño como para permitir que el aparato de medición obtenga una imagen digital de manera que pueda analizarse simultáneamente toda la profundidad de la cavidad de medición. Puesto que va a usarse un sistema de ampliación en el aparato de medición, no es sencillo obtener una gran profundidad de campo. Por tanto, el grosor de la cavidad de medición preferiblemente no superará los 150 micrómetros con el fin de que se analice simultáneamente todo el grosor en una imagen digital. La profundidad de campo puede disponerse para manejar un grosor de la cavidad de medición de 170 micrómetros.

La imagen digital puede adquirirse con una profundidad de campo correspondiente al menos al grosor de la cavidad de medición. Esto implica que se obtiene un enfoque suficiente de todo el grosor de la muestra de manera que puede analizarse simultáneamente todo el grosor de la cavidad de medición en la imagen digital de la muestra. Por tanto, no hay necesidad de esperar a que los glóbulos blancos sedimenten en la cavidad de medición, por lo que se reduce el tiempo para obtener el análisis. Al elegir no enfocar de manera muy pronunciada sobre una parte específica de la muestra, se obtiene un enfoque suficiente de todo el grosor de la muestra para permitir identificar el número de glóbulos blancos en la muestra. Esto implica que un glóbulo blanco puede estar algo borroso y todavía considerarse que está en enfoque en la profundidad de campo.

El dispositivo de adquisición de muestras puede estar dotado de un reactivo que se ha aplicado a la superficie disuelto en un líquido volátil que se ha evaporado para dejar el reactivo en forma seca.

Se ha conseguido que el reactivo se disuelva ventajosamente en un líquido volátil antes de insertarse dentro de la cavidad de medición. Esto implica que el líquido puede evaporarse de manera eficaz del espacio estrecho de la cavidad de medición durante la fabricación y la preparación del dispositivo de adquisición de muestras.

El reactivo puede disolverse preferiblemente en un disolvente orgánico y más preferiblemente puede disolverse en metanol. Tales disolventes son volátiles y pueden usarse de manera apropiada para secar el reactivo sobre una superficie de la cavidad de medición.

El agente de tinción puede disponerse para teñir selectivamente el núcleo de los glóbulos blancos. Esto implica que los glóbulos blancos pueden identificarse como puntos de color y por tanto pueden contarse fácilmente en una imagen digital.

El agente de tinción puede ser uno cualquiera del grupo de hematoxilina, azul de metileno, verde de metileno, azul de metileno, acetato de violeta de cresilo, azul de toluidina, violeta de genciana, análogos de Sudan, galocianina y análogos de fucsina, o cualquier combinación de los mismos. Sin embargo, debe apreciarse que el agente de tinción no se limita a este grupo, sino que pueden contemplarse muchas otras sustancias.

El agente hemolizante puede ser una sal de amonio cuaternario, una saponina, un ácido biliar, tal como ácido desoxicólico, una digitoxina, un veneno de serpiente, un glucopiranosido o un detergente no iónico de tipo Triton. Sin embargo, debe apreciarse que el agente hemolizante no se limita a este grupo, sino que pueden contemplarse muchas otras sustancias.

El dispositivo de adquisición de muestras comprende además una entrada de muestras que comunica la cavidad de medición con el exterior del dispositivo de adquisición de muestras, estando dispuesta dicha entrada para adquirir una muestra de sangre. La entrada de muestras puede estar dispuesta para introducir una muestra de sangre mediante una fuerza capilar y la cavidad de medición puede introducir además la sangre desde la entrada en la cavidad. Como resultado, la muestra de sangre puede adquirirse fácilmente dentro de la cavidad de medición moviendo simplemente la entrada de muestras en contacto con la sangre. Entonces, las fuerzas capilares de la entrada de muestras y la cavidad de medición introducirán una cantidad bien definida de sangre dentro de la cavidad de medición.

El dispositivo de adquisición de muestras puede ser desechable, es decir está dispuesto para usarse sólo una vez. El dispositivo de adquisición de muestras proporciona un kit para realizar un recuento de glóbulos blancos, puesto que el dispositivo de adquisición de muestras puede alojar una muestra de sangre y contiene todos los reactivos necesarios con el fin de presentar la muestra para el recuento de células. Esto se permite particularmente puesto que el dispositivo de adquisición de muestras está adaptado para usarse solo una vez y puede formarse sin

considerar las posibilidades de limpiar el dispositivo de adquisición de muestras y volver a aplicar un reactivo. Además, el dispositivo de adquisición de muestras puede moldearse en material de plástico y de ese modo fabricarse a un precio bajo. Por tanto, todavía puede ser rentable usar un dispositivo de adquisición de muestras desechable.

5 La muestra puede irradiarse mediante luz de una longitud de onda correspondiente a un pico en la absorbancia del agente de tinción. Por consiguiente, los glóbulos blancos teñidos que contienen una acumulación de agente de tinción se detectarán mediante una baja transmitancia de luz.

10 La irradiación puede realizarse por medio de una fuente de láser. La fuente de láser puede proporcionar luz de una longitud de onda bien definida que ajusta la absorbancia del agente de tinción. Además, la fuente de láser proporciona luz colimada, lo que minimiza las alteraciones de la luz parásita, de manera que se distinguirá claramente un punto de baja transmitancia de luz.

15 La irradiación puede realizarse alternativamente por medio de un diodo emisor de luz. Esta fuente de luz todavía puede proporcionar condiciones de irradiación suficientes para distinguir de manera apropiada los glóbulos blancos de otra materia en la muestra.

20 La imagen digital puede adquirirse usando un poder de ampliación de 3-200x, más preferiblemente de 3-10x. Dentro de estos intervalos de poder de ampliación, los glóbulos blancos se amplían suficientemente con el fin de detectarse, mientras que la profundidad de campo puede disponerse para que cubra el grosor de muestra. Un poder de ampliación bajo implica que puede obtenerse una gran profundidad de campo. Sin embargo, si se usa un poder de ampliación bajo, los glóbulos blancos pueden ser difíciles de detectar. Puede usarse un poder de ampliación menor aumentando el número de píxeles en la imagen adquirida, es decir, mejorando la resolución de la imagen digital. De este modo, se ha hecho posible usar un poder de ampliación de 3-4x, mientras que todavía se permite que se detecten los glóbulos blancos.

30 El análisis comprende identificar áreas de alta absorbancia de luz en la imagen digital. El análisis puede comprender además identificar puntos negros u oscuros en la imagen digital. Puesto que los agentes de tinción pueden acumularse en el núcleo de los glóbulos blancos, la absorbancia de la luz puede tener picos en puntos separados. Estos puntos formarán puntos negros en la imagen digital.

35 El análisis puede comprender además ampliar electrónicamente la imagen digital adquirida. Mientras que la muestra está ampliándose para adquirir una imagen digital ampliada de la muestra, la propia imagen digital adquirida puede ampliarse electrónicamente para distinguir de manera simplificada entre objetos de los que están obteniéndose imágenes muy cerca entre sí en la imagen digital adquirida.

#### **Breve descripción de los dibujos**

40 Ahora se describirá la invención en detalle adicional a modo de ejemplo haciendo referencia a los dibujos adjuntos.

La figura 1 es una vista esquemática de un dispositivo de adquisición de muestras según una realización de la invención.

45 La figura 2 es una vista esquemática de un dispositivo de adquisición de muestras según una realización que no forma parte de la invención.

La figura 3 es una vista esquemática de un aparato de medición según una realización de la invención.

50 La figura 4 es un diagrama de flujo de un método según una realización de la invención.

La figura 5 es una imagen digital de una muestra de sangre que va a usarse para la enumeración volumétrica de glóbulos blancos.

#### **Descripción detallada de una realización preferida**

55 En referencia ahora a la figura 1, se describirá un dispositivo 10 de adquisición de muestras según una realización de la invención. El dispositivo 10 de adquisición de muestras es desechable y va a tirarse tras haberse usado para el análisis. Esto implica que el dispositivo 10 de adquisición de muestras no requiere un manejo complicado. El dispositivo 10 de adquisición de muestras está formado preferiblemente de material de plástico y puede fabricarse mediante moldeo por inyección. Esto hace que la fabricación del dispositivo 10 de adquisición de muestras sea sencilla y económica, mientras que el coste del dispositivo 10 de adquisición de muestras puede mantenerse bajo.

60 El dispositivo 10 de adquisición de muestras comprende un elemento 12 de cuerpo, que tiene una base 14, que un operario puede tocar sin producir ninguna interferencia en los resultados del análisis. La base 14 también puede tener salientes 16 que pueden ajustar un soporte en el aparato de análisis. Los salientes 16 pueden disponerse de

manera que el dispositivo 10 de adquisición de muestras se coloque correctamente en el aparato de análisis.

El dispositivo 10 de adquisición de muestras comprende además una entrada 18 de muestras. La entrada 18 de muestras está definida entre paredes opuestas dentro del dispositivo 10 de adquisición de muestras, estando dispuestas las paredes tan cerca entre sí que puede crearse una fuerza capilar en la entrada 18 de muestras. La entrada 18 de muestras se comunica con el exterior del dispositivo 10 de adquisición de muestras para permitir que la sangre entre en el dispositivo 10 de adquisición de muestras. El dispositivo 10 de adquisición de muestras comprende además una cámara para contar glóbulos blancos en forma de una cavidad 20 de medición dispuesta entre paredes opuestas dentro del dispositivo 10 de adquisición de muestras. La cavidad 20 de medición está dispuesta en comunicación con la entrada 18 de muestras. Las paredes que definen la cavidad 20 de medición están dispuestas más cerca entre sí que las paredes de la entrada 18 de muestras, de manera que una fuerza capilar puede introducir sangre desde la entrada 18 de muestras en la cavidad 20 de medición.

Las paredes de la cavidad 20 de medición están dispuestas a una distancia entre sí de 50-170 micrómetros. La cavidad 20 de medición tiene más preferiblemente al menos 100 micrómetros de grosor. Además, la cavidad 20 de medición tiene más preferiblemente no más de 150 micrómetros de grosor. La distancia es uniforme a lo largo de toda la cavidad 20 de medición. El grosor de la cavidad 20 de medición define el volumen de sangre que está examinándose. Puesto que el resultado del análisis va a compararse con el volumen de la muestra de sangre que está examinándose, es necesario que el grosor de la cavidad 20 de medición sea muy preciso, es decir sólo se permiten variaciones muy pequeñas en el grosor dentro de la cavidad 20 de medición y entre las cavidades 20 de medición de diferentes dispositivos 10 de adquisición de muestras. El grosor permite que se analice un volumen de muestra relativamente grande en un área pequeña de la cavidad. El grosor permite teóricamente que los glóbulos blancos se dispongan unos encima de otros dentro de la cavidad 20 de medición. Sin embargo, la cantidad de glóbulos blancos dentro de la sangre es tan baja que la probabilidad de que esto ocurra es muy pequeña.

El dispositivo 10 de adquisición de muestras normalmente está adaptado para medir recuentos de glóbulos blancos por encima de  $0,5 \times 10^9$  células/litro de sangre. A recuentos de glóbulos blancos menores, el volumen de muestra será demasiado pequeño como para permitir que se cuenten cantidades estadísticamente significativas de glóbulos blancos. Además, cuando el recuento de glóbulos blancos supera  $12 \times 10^9$  células/litro de sangre, el efecto de los glóbulos sanguíneos que se disponen solapándose entre sí comenzará a ser significativo en el recuento de glóbulos blancos medido. A este recuento de glóbulos blancos, los glóbulos blancos cubrirán aproximadamente el 8% de la sección transversal de la muestra que está irradiándose, si el grosor de la cavidad de medición es de 140 micrómetros. Por tanto, con el fin de obtener recuentos de glóbulos blancos corregidos, será necesario tener en cuenta este efecto. Por tanto, puede usarse una corrección estadística de valores del recuento de glóbulos blancos por encima de  $12 \times 10^9$  células/litro de sangre. Esta corrección estadística aumentará para recuentos de glóbulos blancos crecientes, puesto que el efecto de los glóbulos sanguíneos solapantes será mayor para recuentos de glóbulos blancos mayores. La corrección estadística puede determinarse por medio de la calibración de un aparato de medición. Como alternativa, la corrección estadística puede determinarse a nivel general para configurar los aparatos de medición que van a usarse en relación con el dispositivo 10 de adquisición de muestras. Esta corrección estadística es de magnitud similar a las correcciones estadísticas que se realizan actualmente en los aparatos de análisis que usan el principio de Coulter. Se contempla que el dispositivo 10 de adquisición de muestras pueda usarse para analizar recuentos de glóbulos blancos de hasta  $50 \times 10^9$  células/litro de sangre.

La superficie de una pared de la cavidad 20 de medición se recubre al menos parcialmente con un reactivo 22. El reactivo 22 puede estar liofilizado, secado por calor o secado al vacío y puede aplicarse a la superficie de la cavidad 20 de medición. Cuando se adquiere una muestra de sangre dentro de la cavidad 20 de medición, la sangre entrará en contacto con el reactivo 22 seco e iniciará una reacción entre el reactivo 22 y la sangre.

El reactivo 22 se aplica insertando el reactivo 22 dentro de la cavidad 20 de medición usando una pipeta o dispensador. El reactivo 22 se disuelve en un líquido volátil, por ejemplo un disolvente orgánico tal como metanol, cuando se inserta dentro de la cavidad 20 de medición. El disolvente con el reactivo 22 puede llenar la cavidad 20 de medición. Entonces, se realiza el secado de manera que el disolvente se evaporará y el reactivo 22 se unirá a las superficies de la cavidad 20 de medición.

Puesto que el reactivo va a secarse sobre una superficie de un espacio estrecho, el líquido tendrá una superficie muy pequeña en contacto con la atmósfera ambiental, por lo que la evaporación del líquido se hace más difícil. Por tanto, resulta ventajoso usar un líquido volátil, tal como metanol, lo que permite que el líquido se evapore de manera eficaz del espacio estrecho de la cavidad de medición.

Según un método de fabricación alternativo, el dispositivo 10 de adquisición de muestras puede formarse uniendo dos piezas entre sí, por lo que una pieza forma la pared inferior de la cavidad 20 de medición y la otra pieza forma la pared superior de la cavidad 20 de medición. Esto permite que un reactivo 22 se seque sobre una superficie abierta antes de que las dos piezas se unan entre sí. Por tanto, el reactivo 22 puede disolverse en agua, puesto que no es necesario que el disolvente sea volátil.

El reactivo 22 comprende un agente hemolizante y un agente de tinción. El agente hemolizante puede ser una sal de

amonio cuaternario, una saponina, un ácido biliar, tal como ácido desoxicólico, una digitoxina, un veneno de serpiente, un glucopiranosido o un detergente no iónico de tipo Triton. El agente de tinción puede ser hematoxilina, azul de metileno, verde de metileno, azur de metileno, acetato de violeta de cresilo, azul de toluidina, violeta de genciana, un análogo de Sudan, galocianina o un análogo de fucsina, o cualquier combinación de los mismos.

5 Cuando una muestra de sangre entra en contacto con el reactivo 22, el agente hemolizante actuará para lisar los glóbulos rojos de manera que los glóbulos rojos lisados se mezclan con el plasma sanguíneo. Además, el agente de tinción se acumulará en los núcleos de los glóbulos blancos. El reactivo 22 debe contener cantidades suficientes de agente de tinción para teñir claramente todos los núcleos de los glóbulos blancos. Por tanto, a menudo habrá un exceso de agente de tinción, que se entremezclará en el plasma sanguíneo. El exceso de agente de tinción dará un nivel de agente de tinción de fondo bajo, homogéneo en el plasma sanguíneo. El agente de tinción acumulado en los glóbulos blancos podrá distinguirse del nivel de fondo de agente de tinción.

El reactivo 22 también puede comprender otros constituyentes, que pueden ser activos, es decir, que toman parte en la reacción química con la muestra de sangre, o no activos, es decir que no toman parte en la reacción química con la muestra de sangre. Los constituyentes activos pueden disponerse por ejemplo para catalizar la acción de hemólisis o tinción. Los constituyentes no activos pueden disponerse por ejemplo para mejorar la unión del reactivo 22 a la superficie de una pared de la cavidad 20 de medición.

En el plazo de algunos minutos, la muestra de sangre habrá reaccionado con el reactivo 22, de manera que los glóbulos rojos se habrán lisado y el agente de tinción se habrá acumulado en los núcleos de los glóbulos blancos.

En referencia a la figura 2, se describirá una realización de un dispositivo de adquisición de muestras que no forma parte de la presente invención. El dispositivo 110 de adquisición de muestras comprende una cámara 120 que forma la cavidad de medición. El dispositivo 110 de adquisición de muestras tiene una entrada 118 hacia el interior de la cámara 120 para transportar sangre dentro de la cámara 120. La cámara 120 está conectada a una bomba (no mostrada) a través de un tubo 121 de succión. La bomba puede aplicar una fuerza de succión en la cámara 120 a través del tubo 121 de succión de manera que puede succionarse sangre dentro de la cámara 120 a través de la entrada 118. El dispositivo 110 de adquisición de muestras puede desconectarse de la bomba antes de que se realice la medición. Al igual que la cavidad 20 de medición del dispositivo 10 de adquisición de muestras según la primera realización, la cámara 120 tiene un grosor bien definido que define el grosor de la muestra que va a examinarse. Además, se aplica un reactivo 122 a las paredes de la cámara 120 para que reaccione con la muestra de sangre.

En referencia ahora a la figura 3, se describirá un aparato 30 para la enumeración volumétrica de glóbulos blancos. El aparato 30 comprende un soporte 32 de muestras para alojar un dispositivo 10 de adquisición de muestras con una muestra de sangre. El soporte 32 de muestras está dispuesto para alojar el dispositivo 10 de adquisición de muestras de manera que la cavidad 20 de medición del dispositivo 10 de adquisición de muestras se coloque correctamente dentro del aparato 30. El aparato 30 comprende una fuente 34 de luz para iluminar la muestra de sangre dentro del dispositivo 10 de adquisición de muestras. La fuente 34 de luz puede ser una lámpara incandescente, que irradia luz en todo el espectro visible. El agente de tinción que se acumula en los núcleos de los glóbulos blancos absorberá luz de longitudes de onda específicas, de manera que los núcleos de los glóbulos blancos aparecerán en una imagen digital de la muestra. Si se adquiere una imagen de color, los glóbulos blancos aparecerán como puntos de color específicamente. Si se adquiere una imagen en blanco y negro, los glóbulos blancos aparecerán como puntos negros contra un fondo más claro.

La fuente 34 de luz puede ser alternativamente un láser o un diodo emisor de luz. Esto puede usarse para aumentar el contraste en la imagen de manera que los glóbulos blancos puedan detectarse más fácilmente. En este caso, la fuente 34 de luz se dispone para irradiar radiación electromagnética de una longitud de onda que corresponde a un pico de absorción del agente de tinción. La longitud de onda debe escogerse además de manera que la absorción de los compuestos sanguíneos sea relativamente baja. Además, las paredes del dispositivo 10 de adquisición de muestras deben ser esencialmente transparentes a la longitud de onda. Por ejemplo, cuando se usa azul de metileno como agente de tinción, la fuente 34 de luz puede disponerse para irradiar luz que tiene una longitud de onda de 667 nm.

El aparato 30 comprende además un sistema 36 de obtención de imágenes, que está dispuesto en el lado opuesto del soporte 32 de muestras en relación con la fuente 34 de luz. Por tanto, el sistema 36 de obtención de imágenes está dispuesto para recibir la radiación que se ha transmitido a través de la muestra de sangre. El sistema 36 de obtención de imágenes comprende un sistema 38 de ampliación y un medio 40 de adquisición de imágenes. El sistema 38 de ampliación está dispuesto para proporcionar un poder de ampliación de 3-200x, más preferiblemente de 3-100x, y lo más preferiblemente de 3-4x. Dentro de estos intervalos de poder de ampliación, es posible distinguir los glóbulos blancos. La imagen puede adquirirse con una resolución mejorada con el fin de permitir que se use un poder de ampliación menor. Además, la profundidad de campo del sistema 38 de ampliación todavía se dispone para que corresponda al menos al grosor de la cavidad 20 de medición.

El sistema 38 de ampliación comprende una lente o sistema 42 de lentes de objetivo, que se dispone cerca del soporte 32 de muestras, y una lente o sistema 44 de lentes oculares, que se dispone a una distancia de la lente 42



de objetivo. La lente 42 de objetivo proporciona una primera ampliación de la muestra, que se amplía adicionalmente por la lente 44 ocular. El sistema 38 de ampliación puede comprender lentes adicionales para lograr una ampliación y obtención de imágenes apropiada de la muestra. El sistema 38 de ampliación se dispone de manera que la muestra en la cavidad 20 de medición cuando se coloca en el soporte 32 de muestras se enfocará sobre un plano de imagen en el medio 40 de adquisición de imágenes.

El medio 40 de adquisición de imágenes se dispone para adquirir una imagen digital de la muestra. El medio 40 de adquisición de imágenes puede ser cualquier tipo de cámara digital, tal como una cámara CCD. El tamaño de píxel de la cámara digital establece una restricción en el sistema 36 de obtención de imágenes de manera que el círculo de confusión en el plano de imagen puede no superar el tamaño de píxel dentro de la profundidad de campo. Sin embargo, los glóbulos blancos todavía pueden detectarse aunque estén algo borrosos y, por tanto, puede permitirse que el círculo de confusión supere el tamaño de píxel aunque se considera que está dentro de la profundidad de campo. La cámara 40 digital adquirirá una imagen digital de la muestra en la cavidad 20 de medición, en la que todo el grosor de la muestra está enfocado suficientemente en la imagen digital para contar los glóbulos blancos. El sistema 36 de obtención de imágenes definirá un área de la cavidad 20 de medición, de la que se obtendrán imágenes en la imagen digital. El área de la que están obteniéndose imágenes junto con el grosor de la cavidad 20 de medición definen el volumen de la muestra de la que están obteniéndose imágenes. El sistema 36 de obtención de imágenes se configura para ajustar la obtención de imágenes de muestras de sangre en los dispositivos 10 de adquisición de muestras. No hay necesidad de cambiar la configuración del sistema 36 de obtención de imágenes. Preferiblemente, el sistema 36 de obtención de imágenes se dispone dentro de un alojamiento de manera que la configuración no se cambie accidentalmente.

El aparato 30 comprende además un analizador 46 de imágenes. El analizador 46 de imágenes está conectado a la cámara 40 digital para recibir imágenes digitales adquiridas por la cámara 40 digital. El analizador 46 de imágenes se dispone para identificar patrones en la imagen digital que corresponden a un glóbulo blanco para el recuento del número de glóbulos blancos que están presentes en la imagen digital. Por tanto, el analizador 46 de imágenes puede disponerse para identificar puntos negros en un fondo más claro. El analizador 46 de imágenes puede disponerse para ampliar electrónicamente primero la imagen digital antes de analizar la imagen digital. Esto implica que el analizador 46 de imágenes puede distinguir más fácilmente glóbulos blancos de los que están obteniéndose imágenes que están cerca entre sí, aún cuando la ampliación electrónica de la imagen digital hará que la imagen digital sea algo borrosa.

El analizador 46 de imágenes puede calcular el número de glóbulos blancos por volumen de sangre dividiendo el número de glóbulos blancos que están identificados en la imagen digital entre el volumen de la muestra de sangre, que está bien definido tal como se describió anteriormente. El recuento volumétrico de glóbulos blancos puede presentarse en una pantalla del aparato 30.

El analizador 46 de imágenes puede realizarse como una unidad de procesamiento, que comprende códigos para realizar el análisis de la imagen.

En referencia a la figura 4, se describirá un método para la enumeración volumétrica de glóbulos blancos. El método comprende adquirir una muestra de sangre en un dispositivo de adquisición de muestras, etapa 102. Se adquiere una muestra de sangre completa sin diluir en el dispositivo de adquisición de muestras. La muestra puede adquirirse de sangre capilar o de sangre venosa. Puede introducirse una muestra de sangre capilar dentro de la cavidad de medición directamente de un dedo de un paciente en que se ha realizado una punción. La muestra de sangre entra en contacto con un reactivo en el dispositivo de adquisición de muestras que inicia una reacción. Los glóbulos rojos pueden lisarse y un agente de tinción se acumula en los núcleos de los glóbulos blancos. En el plazo de algunos minutos de la adquisición de la muestra de sangre, la muestra está lista para analizarse. El dispositivo de adquisición de muestras se coloca en un aparato de análisis, etapa 104. Puede iniciarse un análisis apretando un botón del aparato de análisis. Alternativamente, el aparato inicia automáticamente el análisis detectando la presencia del dispositivo de adquisición de muestras.

Se irradia la muestra, etapa 106, y se adquiere una imagen digital de una ampliación de la muestra, etapa 108. La muestra está irradiándose con radiación electromagnética de una longitud de onda correspondiente a un pico de absorción del agente de tinción. Esto implica que la imagen digital contendrá puntos negros o más oscuros en las posiciones de los núcleos de los glóbulos blancos.

La imagen digital adquirida se transfiere a un analizador de imágenes, que realiza el análisis de las imágenes, etapa 110, con el fin de contar el número de puntos negros en la imagen digital.

En la figura 5, se muestra un ejemplo de una imagen digital para indicar la posibilidad de identificar glóbulos blancos en una muestra de sangre que se hemoliza y se tiñe. Esta imagen digital se obtuvo de un dispositivo de adquisición de muestras que tenía un grosor de cavidad de 140  $\mu\text{m}$  y usando una ampliación de 50 veces. La fuente de luz irradia luz blanca, lo que indica que los glóbulos blancos pueden identificarse aun cuando la irradiación no está adaptada específicamente a un pico de absorción del agente de tinción. El agente de tinción usado fue azul de metileno. En la figura aparecen distintos puntos negros indicando glóbulos blancos. La imagen mostrada en la figura

5 es una versión en blanco y negro de una imagen en color. El contraste entre los glóbulos blancos y el fondo aparece más claro en la imagen de color que en la imagen en blanco y negro reproducida en este caso. Los puntos negros pueden contarse fácilmente por un analizador de imágenes.

5 En los métodos manuales de recuento de glóbulos blancos, normalmente se cuentan aproximadamente 200 células para determinar el recuento de glóbulos blancos de la muestra de sangre. El método y el aparato presentados en este caso pueden disponerse por ejemplo para contar aproximadamente 2000 células, lo que da una mejor certeza estadística de los resultados obtenidos. Un adulto sano normal tiene un recuento de glóbulos blancos de  $4-5 \times 10^9$  células/litro de sangre. Esto implica que se encuentran 2000 células en muestras que tienen un volumen de 0,4-  
10 0,5  $\mu\text{l}$ . Por ejemplo, si se obtiene una imagen de un área de 1,5 x 1,5 mm en la cavidad de medición que tiene un grosor de 140 mm, el volumen de la que están obteniéndose imágenes es 0,315  $\mu\text{l}$ . Puede seleccionarse una parte de la imagen adquirida para su análisis. Por tanto, la imagen adquirida puede analizarse toscamente de manera que no se permitan anomalías en la parte que está usándose para determinar el recuento de glóbulos blancos. Puede seleccionarse que la parte de la imagen adquirida seleccionada para el análisis tenga un tamaño apropiado de modo  
15 que se analice un volumen suficiente volumen de la muestra de sangre.

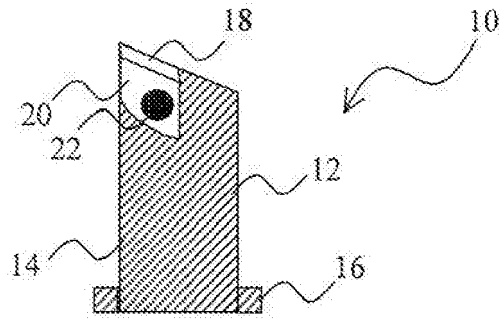
Debe hacerse hincapié en que las realizaciones preferidas descritas en el presente documento en modo alguno son limitativas y que son posibles muchas realizaciones alternativas dentro del alcance de protección definido por las reivindicaciones adjuntas.  
20

**REIVINDICACIONES**

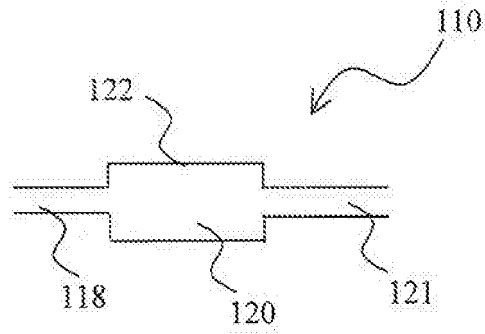
1. Dispositivo (10) de adquisición de muestras para la enumeración volumétrica de glóbulos blancos en una muestra de sangre, comprendiendo dicho dispositivo (10) de adquisición de muestras:
  - una cavidad (20) de medición para alojar una muestra de sangre en el que la muestra de sangre es sangre completa sin diluir que se ha adquirido directamente dentro de la cavidad de medición, teniendo dicha cavidad (20) de medición un grosor fijo predeterminado, medido de manera que dicho grosor, cuando el dispositivo está en uso, en combinación con un área de la muestra de la que están obteniéndose imágenes, define un volumen de muestra analizada; en el que el dispositivo (10) de adquisición de muestras comprende además:
    - un reactivo (22), que se dispone en forma seca sobre una superficie que define la cavidad (20) de medición, comprendiendo dicho reactivo (22) un agente hemolizante para lisar glóbulos rojos en la muestra de sangre, y un agente de tinción para teñir selectivamente glóbulos blancos en la muestra de sangre;
    - una entrada (18) de muestras, que está definida entre paredes opuestas dentro del dispositivo (10) de adquisición de muestras, estando dispuestas dichas paredes tan cerca entre sí que puede crearse una fuerza capilar en la entrada (18) de muestras; estando dispuesta dicha cavidad (20) de medición en comunicación con dicha entrada (18) de muestras; y
    - un elemento (12) de cuerpo que tiene dos superficies planas para definir dicha cavidad (20) de medición, en el que las superficies planas están dispuestas a una distancia predeterminada entre sí para determinar un grosor de muestra para una medición óptica, y en el que las superficies planas de dicha cavidad (20) de medición están dispuestas más cerca entre sí que dichas paredes de la entrada (18) de muestras, de manera que una fuerza capilar puede introducir sangre desde la entrada (18) de muestras en la cavidad (20) de medición.
2. Dispositivo (10) de adquisición de muestras según la reivindicación 1, en el que las superficies planas están dispuestas a una distancia entre sí para determinar un grosor uniforme de 50-170 micrómetros para una medición óptica.
3. Dispositivo (10) de adquisición de muestras según la reivindicación 2, en el que las superficies planas están dispuestas a una distancia entre sí para determinar un grosor uniforme de al menos 100 micrómetros para una medición óptica.
4. Dispositivo (10) de adquisición de muestras según la reivindicación 2 ó 3, en el que las superficies planas están dispuestas a una distancia entre sí para determinar un grosor uniforme de no más de 150 micrómetros para una medición óptica.
5. Dispositivo (10) de adquisición de muestras según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el reactivo (22) se ha aplicado a la superficie disuelto en un líquido volátil que se ha evaporado para dejar el reactivo (22) en forma seca.
6. Dispositivo (10) de adquisición de muestras según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente de tinción se dispone para teñir selectivamente el núcleo de los glóbulos blancos.
7. Dispositivo (10) de adquisición de muestras según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente de tinción es uno cualquiera del grupo de hematoxilina, azul de metileno, verde de metileno, azul de metileno, acetato de violeta de cresilo, azul de toluidina, violeta de genciana, análogos de Sudan, galocianina y análogos de fucsina, o cualquier combinación de los mismos.
8. Dispositivo (10) de adquisición de muestras según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente hemolizante es una sal de amonio cuaternario, una saponina, un ácido biliar, una digitoxina, un veneno de serpiente, un glucopiranosido o un detergente no iónico de tipo Triton.
9. Dispositivo (10) de adquisición de muestras según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha entrada (18) de muestras está dispuesta para adquirir una muestra de sangre.
10. Dispositivo (10) de adquisición de muestras según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dispositivo (10) de adquisición de muestras es desechable.
11. Método para la enumeración volumétrica de glóbulos blancos en una muestra de sangre, comprendiendo dicho método:

- 5 adquirir una muestra de sangre dentro de una cavidad (20) de medición de un dispositivo (10) de adquisición de muestras, en el que la muestra de sangre es sangre completa sin diluir que se adquiere directamente dentro de la cavidad (20) de medición, irradiar la muestra,
- 10 adquirir una imagen digital de una ampliación de la muestra irradiada en la cavidad (20) de medición, y analizar digitalmente la imagen digital para identificar los glóbulos blancos y determinar el número de glóbulos blancos en la muestra;
- 15 teniendo dicho dispositivo de adquisición de muestras una entrada (18) de muestras, que está definida entre paredes opuestas dentro del dispositivo (10) de adquisición de muestras, en el que dichas paredes están dispuestas tan cerca entre sí que puede crearse una fuerza capilar en la entrada (18) de muestras; estando dispuesta dicha cavidad (20) de medición en comunicación con dicha entrada (18) de muestras;
- 20 estando definida dicha cavidad (20) de medición por dos superficies planas, en el que dichas superficies planas están dispuestas a una distancia predeterminada entre sí para determinar un grosor de muestra para una medición óptica, y en el que las superficies planas de dicha cavidad (20) de medición están dispuestas más cerca entre sí que dichas paredes de la entrada (18) de muestras, de manera que una fuerza capilar puede introducir sangre desde la entrada (18) de muestras en la cavidad (20) de medición; y dicha cavidad (20) de medición contiene un reactivo (22), que está dispuesto en forma seca sobre una superficie que define la cavidad (20) de medición, que comprende un agente hemolizante para lisar glóbulos rojos y un agente de tinción para reaccionar con la muestra de manera que los glóbulos blancos se tiñan, en el que los glóbulos blancos se distinguen mediante la tinción selectiva del agente de tinción.
- 25
12. Método según la reivindicación 11, en el que la muestra de sangre se mezcla con el reactivo (22) en la cavidad (20) de medición.
- 30 13. Método según la reivindicación 11 ó 12, en el que la cavidad (20) de medición tiene un grosor de 50-170 micrómetros, y dicha imagen digital se adquiere con una profundidad de campo correspondiente al menos al grosor de la cavidad (20) de medición.
- 35 14. Método según la reivindicación 13, en el que un volumen de una muestra analizada está bien definido por el grosor de la cavidad (20) de medición y un área de la muestra de la que están obteniéndose imágenes.
- 40 15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en el que la muestra se irradia por luz de una longitud de onda correspondiente a un pico en la absorbancia del agente de tinción.
- 45 16. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en el que dicha irradiación se realiza por medio de una fuente de láser.
- 50 17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en el que dicha irradiación se realiza por medio de un diodo emisor de luz.
18. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11-17, en el que la imagen digital se adquiere usando un poder de ampliación de 3-200x, más preferiblemente de 3-10x.
19. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11-18, en el que dicho análisis comprende identificar áreas de alta absorbancia de luz en la imagen digital.
20. Método según la reivindicación 19, en el que dicho análisis comprende identificar puntos negros en la imagen digital.
- 55 21. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11-20, en el que dicho análisis comprende ampliar electrónicamente la imagen digital adquirida.
22. Sistema para la enumeración volumétrica de glóbulos blancos en una muestra de sangre, comprendiendo dicho sistema:
- 60 un dispositivo (10) de adquisición de muestras, y un aparato (30) de medición que comprende:
- 65 un soporte (32) de dispositivo de adquisición de muestras dispuesto para alojar el dispositivo (10) de adquisición de muestras que contiene una muestra de sangre en una

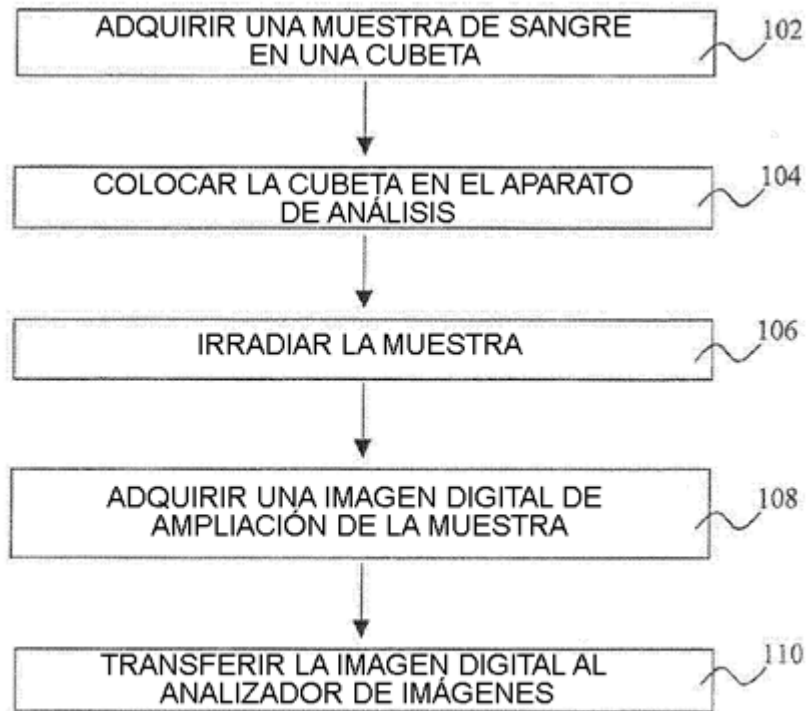
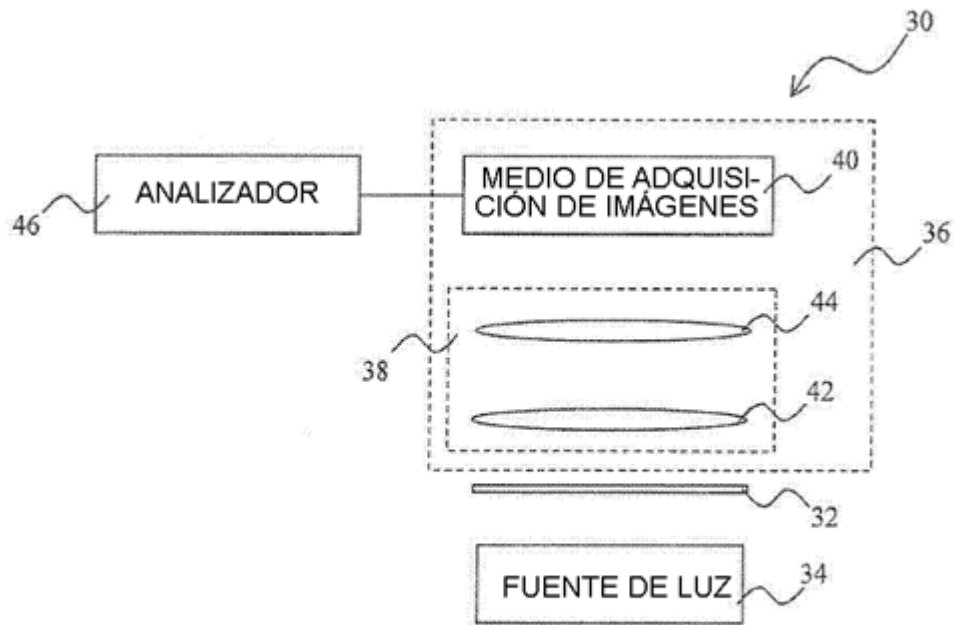
- 5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40
- cavidad (20) de medición,  
una fuente (34) de luz dispuesta para irradiar la muestra de sangre,  
un sistema (36) de obtención de imágenes, que comprende un sistema (38) de ampliación  
y un medio (40) de adquisición de imágenes digitales para adquirir una imagen digital de  
una ampliación de la muestra irradiada en la cavidad (20) de medición, en el que los  
glóbulos blancos se distinguen en la imagen digital mediante la tinción selectiva de un  
agente de tinción, y  
un analizador (46) de imágenes dispuesto para analizar la imagen digital adquirida para  
identificar los glóbulos blancos y determinar el número de glóbulos blancos en la muestra  
de sangre;  
en el que dicho dispositivo (10) de adquisición de muestras es un dispositivo según una  
cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
23. Sistema según la reivindicación 22, en el que el sistema de ampliación se dispone con una profundidad de campo de al menos el grosor de la cavidad (20) de medición del dispositivo (10) de adquisición de muestras.
24. Sistema según la reivindicación 22 ó 23, en el que un volumen de una muestra analizada está bien definido por el grosor de la cavidad (20) de medición y un área de la muestra de la que están obteniéndose imágenes.
25. Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 22-24, en el que la fuente de luz está dispuesta para irradiar luz de una longitud de onda correspondiente a un pico en la absorbancia del agente de tinción.
26. Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 22-25, en el que dicha fuente de luz comprende una fuente de láser.
27. Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 22-25, en el que dicha fuente de luz comprende un diodo emisor de luz.
28. Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 22-27, en el que el sistema de ampliación tiene un poder de ampliación de 3-200x, más preferiblemente de 3-10x.
29. Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 22-28, en el que el analizador de imágenes está dispuesto para identificar áreas de alta absorbancia de luz en la imagen digital.
30. Sistema según la reivindicación 29, en el que el analizador de imágenes está dispuesto para identificar puntos negros en la imagen digital.
31. Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 22-30, en el que el analizador de imágenes está dispuesto para ampliar electrónicamente la imagen digital adquirida.

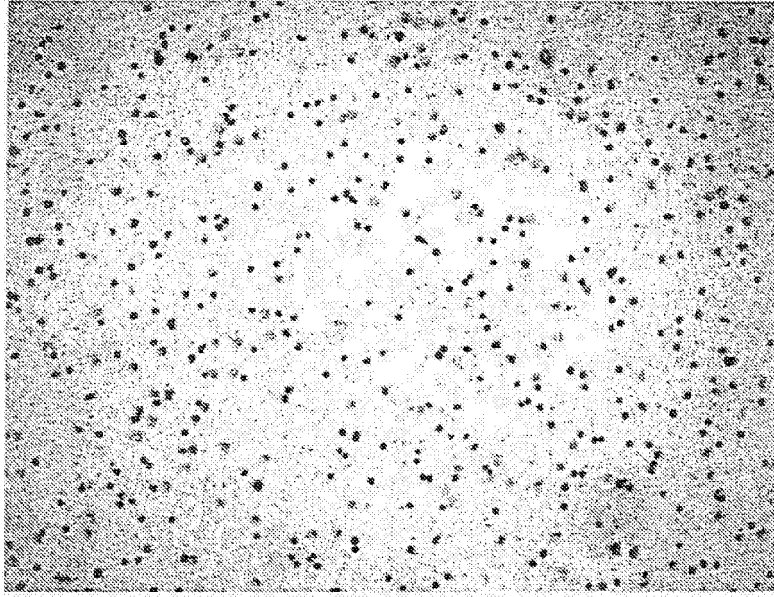


**Fig. 1**



**Fig. 2**





**Fig. 5**