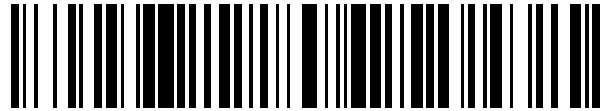


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 884**

51 Int. Cl.:

**G01J 3/51** (2006.01)  
**B01J 19/00** (2006.01)  
**G01N 21/64** (2006.01)  
**G01N 33/543** (2006.01)  
**G01N 21/03** (2006.01)  
**G01N 33/49** (2006.01)  
**G01N 35/00** (2006.01)  
**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.02.2014 PCT/US2014/017145**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014 WO14130542**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2014 E 14754884 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 2959276**

54 Título: **Un método de analizar una muestra de fluido biológico**

30 Prioridad:

**19.02.2013 US 201361766543 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.04.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MEHTA, MANAV y  
HOLT, ROBERT**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 709 884 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**

Un método de analizar una muestra de fluido biológico

5 Antecedentes de la invención

1. Campo técnico

10 La presente invención se refiere a un aparato para análisis de fluidos biológicos en general, y a cartuchos para adquirir, procesar y contener muestras de fluidos biológicos para análisis en particular.

2. Información de antecedentes

15 Históricamente, se han evaluado los contenidos de partículas y celulares de las muestras de fluidos biológicos, tales como sangre entera, orina, líquido cefalorraquídeo, fluidos de la cavidad corporal, etc., frotando una pequeña cantidad de líquido sin diluir en un portaobjetos y evaluando ese frotis bajo el microscopio. Se pueden obtener resultados razonables de este frotis, pero la integridad celular, la precisión y la confiabilidad de los datos dependen en gran medida de la experiencia del técnico y de las técnicas empleadas.

20 En algunos casos, los constituyentes dentro de una muestra de fluido biológico se pueden analizar utilizando la impedancia o la citometría de flujo óptica. Estas técnicas evalúan un flujo de una muestra de fluido diluida pasando el flujo diluido a través de uno o más orificios ubicados en relación con un dispositivo de medición de impedancia o un dispositivo óptico de obtención de imágenes. Una desventaja de estas técnicas es que requieren dilución de la muestra y aparatos de manejo de flujo de fluidos.

25 Algunas técnicas de análisis utilizan una cámara de análisis que incluye perlas; por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.950.455 expedida a Smith. Un problema con tal cámara de análisis ocurre cuando se toma una imagen fotométrica de la muestra. La luz dirigida hacia la muestra puede reflejar y crear resultados no deseados que afectan negativamente el análisis de la imagen de la muestra.

30 Lo que se necesita es un aparato para evaluar una muestra de un fluido biológico que no experimente los problemas asociados con la técnica anterior.

35 El documento WO 00/64492 divulga la monitorización óptica del bioanalito en sangre, mientras que otras disposiciones de la técnica anterior se divulgan en los documentos US 2002/0155618 A1, US 2005/0221276 A1 y US 2012/0021456 A1.

40 El documento US 2012/021456 A1 divulga un método de formación de imágenes ópticas de una muestra de fluido biológico en una cámara de análisis que comprende una placa base y un panel superior, ambos compuestos de un material transparente. La cámara se forma entre las superficies opuestas separadas entre sí por separadores 24, tales como perlas esféricas de poliestireno en contacto tanto con la placa base como con el panel superior.

Divulgación de la invención

45 Según la presente invención, se proporciona un método para analizar una muestra de fluido biológico, de acuerdo con la reivindicación 1.

50 En una realización, la pluralidad de las perlas está configurada para absorber la luz incidente en una cantidad lo suficientemente grande como para que cualquier luz que incida sobre las perlas que no se absorba no interfiera de manera apreciable con un análisis fotométrico del fluido biológico. Como ejemplo de dicha realización, la pluralidad de perlas puede tener un color que absorba la luz.

55 En otra realización o además de otras realizaciones, la pluralidad de las perlas puede comprender uno o más materiales que no son reflectantes de la luz incidente en una cantidad lo suficientemente grande como para que cualquier luz que incida en las perlas que sea reflejada no interfiera apreciablemente con un análisis fotométrico del fluido biológico.

60 En otra realización o además de otras realizaciones, la pluralidad de perlas puede comprender un material que absorbe luz en una cantidad tal que la luz que incide en las perlas no se reflejará en las perlas en una cantidad que interfiera de manera apreciable con un análisis fotométrico del fluido biológico. El mismo material, o un material diferente, también puede extinguir las emisiones fluorescentes del material dispuesto dentro de las perlas o adherido a ellas.

65 La presente invención se describe en el presente documento en términos del método como se define en la reivindicación 1 adjunta, así como en términos de realizaciones de esta invención. Las realizaciones identificadas pueden incluirse con la invención de forma singular o en combinación con cualquiera de las otras realizaciones identificadas con la invención como se describirá a continuación en la Descripción detallada. Las características y

ventajas de la presente invención se harán evidentes a la luz de la descripción detallada de la invención proporcionada a continuación, y como se ilustra en los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

5 La FIG. 1 ilustra esquemáticamente una cámara de análisis.

10 La FIG. 2 es un gráfico de la absorbancia en función de la longitud de onda, que ilustra esquemáticamente la diferencia en la absorción entre las perlas negras y las perlas transparentes dispuestas en isopropanol en función de la longitud de onda de la luz.

La FIG. 3 es una vista esquemática en planta de un cartucho que puede usarse con la presente cámara de análisis.

15 La FIG. 4 es una vista esquemática de un dispositivo de análisis automático con el que se puede usar la presente cámara de análisis.

La FIG. 5 es una ilustración esquemática de la luz reflejada dentro de una cámara de análisis.

20 La FIG. 6 es una imagen de una muestra que reside en forma inactiva dentro de una cámara de análisis que incluye perlas opacas, cuya imagen se forma utilizando luz incidente a 470 nm.

La FIG. 7 es una imagen de una muestra que reside en forma inactiva dentro de una cámara de análisis que incluye perlas de color negro, cuya imagen se forma utilizando luz incidente a 470 nm.

25 Descripción detallada

30 La presente invención está dirigida hacia un método para el análisis fotométrico de una muestra de fluido biológico dentro de una cámara de análisis. Como se explicará más adelante, la muestra que reside dentro de la cámara de análisis se expone a la luz y se realiza un análisis de la muestra utilizando la luz transmitida a través de la muestra y/o la fluorescencia de la muestra.

35 Con referencia a la FIG. 1, la cámara 10 de análisis está formada por un panel 12 de la base de la cámara, un panel 14 superior de la cámara, y una pluralidad de perlas 16 dispuestas entre ellos. Al menos uno de los paneles 12, 14 de la cámara tiene una región transparente. Preferiblemente, al menos una parte de los paneles 12, 14 de la base y superior de la cámara son transparentes a la luz (por ejemplo, regiones transparentes alineadas entre sí para transmitir la luz a través suyo). Cada panel 12, 14 de la cámara tiene una superficie 18, 20 interior y una superficie 19, 21 exterior. Cuando se ensamblan, las superficies 18, 20 interiores del panel 12 de la base de la cámara y el panel 14 superior de la cámara se enfrentan entre sí, separados uno del otro por una distancia denominada como la "altura 22 de la cámara". En algunas realizaciones, las superficies 18, 20 interiores son paralelas entre sí. Sin embargo, la presente cámara 10 de análisis no está limitada a una configuración paralela; por ejemplo, la altura de la cámara de análisis puede variar en las regiones de la cámara 10, incluyendo una configuración inclinada, una configuración escalonada, etc. En algunas realizaciones, se pueden usar perlas 16 de diferente altura (por ejemplo, diámetro) en diferentes regiones de la cámara 10 de análisis.

45 Las solicitudes de patente de Estados Unidos N° 13/341.618 y 13/594.439 divulgan cámaras 10 de análisis. En las divulgaciones mencionadas anteriormente, la altura de la cámara 22 en al menos una parte de la cámara 10 de análisis se define de manera precisa y uniforme por las propiedades geométricas y físicas de las perlas 16 y los paneles 12, 14 de la cámara y están dimensionadas para permitir que las fuerzas capilares atraigan la muestra a lo largo de la cámara 10. Con la excepción de un pequeño número de perlas 16 que pueden ser sustancialmente de tamaño insuficiente, todas las perlas 16 están en contacto con las superficies 18, 20 interiores de los paneles 12, 14 de la cámara.

50 Los ejemplos de materiales aceptables para el panel de la cámara incluyen una película plástica transparente, tal como acrílico, poliestireno, tereftalato de polietileno (PET), polímero de olefina cíclica (COP), copolímero de olefina cíclica (COC), o similares. En aquellas realizaciones en las que el panel 14 superior de la cámara está diseñado para flexionarse cuando se somete a fuerzas capilares, un panel 14 superior de la cámara hecho de PET, con un espesor de aproximadamente veintitrés micras (23  $\mu\text{m}$ ) proporciona una flexibilidad aceptable.

60 Las perlas 16 son preferiblemente estructuras independientes tanto del panel 12 de la base de la cámara como del panel 14 superior de la cámara. Las perlas 16 se pueden disponer en una distribución aleatoria con la cámara 10 de análisis, o en una disposición predeterminada. En algunas realizaciones, un número aceptable de las perlas 16 se colocan a una densidad espacial entre perlas (es decir, las distancias entre las perlas 16 adyacentes) suficiente para asegurar una altura 22 de la cámara aceptablemente uniforme entre las superficies 18, 20 interiores del panel de la cámara. En realizaciones de la cámara de análisis divulgadas en las solicitudes de patente mencionadas anteriormente, al menos uno de los paneles 12, 14 de la cámara y/o las perlas 16 es suficientemente flexible para permitir que la altura 22 de la cámara se aproxime a la altura media de las perlas 16. La flexibilidad relativa proporciona

una cámara 10 de análisis que tiene una altura sustancialmente uniforme a pesar de la posibilidad de variaciones geométricas menores en las perlas 16 debido a las tolerancias de fabricación de las perlas 16. Por ejemplo, en aquellas realizaciones en las que las perlas 16 son relativamente flexibles, las perlas 16 más grandes se comprimen (como resultado del fluido de la muestra, ejerciendo fuerzas capilares en los paneles de la cámara) para permitir que la mayoría de las perlas 16 entren en contacto con las superficies interiores de ambos paneles, lo que hace que la altura 22 de la cámara sea sustancialmente igual al diámetro medio de las perlas. Alternativamente, al menos uno de los paneles de la cámara (por ejemplo, el panel 14 superior de la cámara) puede estar formado para ser tal como o más flexible que las perlas 16. Por ejemplo, en una realización en la que el panel 14 superior de la cámara es más flexible que las perlas 16, el panel 14 superior de la cámara cubrirá las perlas 16 y en la medida en que una perla 16 particular sea más grande que las perlas 16 circundantes, el panel 14 superior de la cámara se flexionará alrededor de la perla 16 más grande en forma de tienda de campaña; por ejemplo, curvarse alrededor de la cuenta 16 más grande. De esta manera, aunque las áreas locales pequeñas de la cámara 10 se desviarán de la altura 22 media de la cámara, la altura media de las regiones de la cámara (incluidas las áreas en forma de tienda de campaña) igualará colectivamente a la del diámetro medio de la perla con un alto grado de precisión. Como se indicó anteriormente, las fuerzas capilares ejercidas por la muestra proporcionan la fuerza necesaria para comprimir las perlas 16, o uno o ambos paneles 12, 14 de la cámara, o alguna combinación de los mismos. En las realizaciones mencionadas anteriormente, cuando se usan para el análisis de sangre completa sustancialmente sin diluir, las perlas 16 pueden ser perlas 16 esféricas poliméricas que tienen un diámetro de aproximadamente cuatro micrómetros (4  $\mu\text{m}$ ). La presente invención no está limitada al uso con perlas 16 esféricas.

De acuerdo con la presente invención, las perlas 16 dispuestas dentro de la cámara 10 están configuradas para no reflejar la luz incidente a las perlas (a través de la transmitancia o emisión fluorescente) a longitudes de onda predeterminadas en una cantidad que interfiere apreciablemente con un análisis fotométrico del fluido biológico. Tal como se usa en el presente documento, el término "apreciablemente" significa que, en la medida en que haya un reflejo de la luz incidente de una perla 16, si existe, la cantidad de esa luz reflejada es tal que la perla 16 es fácilmente distinguible de los constituyentes dentro de la muestra (por ejemplo, plaquetas, etc.). En algunas realizaciones, la configuración de las perlas 16 es tal que las perlas pueden comprender un material, o incluir un material en su superficie exterior (por ejemplo, un recubrimiento), que absorbe la luz incidente a las longitudes de onda predeterminadas en una cantidad lo suficientemente grande como para cualquier luz incidente que no se absorba (por ejemplo, la luz reflejada de la perla) no interfiere de manera apreciable con un análisis fotométrico del fluido biológico. Por ejemplo, las realizaciones de la presente invención pueden usar perlas 16 que tienen un color (por ejemplo, negro) que absorbe la luz incidente en ciertas longitudes de onda en un grado mucho mayor que las perlas 16 transparentes u opacas, o perlas 16 que tienen colores con mayor probabilidad de reflejar la luz (por ejemplo, blanco). La FIG. 2 es un gráfico de la absorbancia en función de la longitud de onda, que ilustra esquemáticamente la diferencia en la absorción entre las perlas negras (línea 23) y las perlas transparentes (línea 25) dispuestas en isopropanol en función de la longitud de onda de la luz. Como ejemplo específico, las perlas 16 negras absorberán la luz en el intervalo de longitud de onda de aproximadamente 400-700 nm. El negro es el color que absorbe la mayor cantidad de luz, pero dependiendo de la aplicación del análisis fotométrico, se pueden usar uno o más colores alternativos que puedan absorber la luz incidente a las longitudes de onda predeterminadas en una cantidad lo suficientemente grande como para que cualquier luz incidente que no sea absorbida no interfiera apreciablemente con un análisis fotométrico del fluido biológico. Además, los colores que absorben luz de la manera descrita anteriormente pueden estar disponibles en diferentes intensidades (es decir, tonos, matices) que se crean al oscurecer o aclarar el tono puro del color. El "tono puro" de un color es el color base en toda su intensidad. En consecuencia, puede ser posible usar diferentes intensidades de un color, las cuales pueden ser operadas para absorber la luz incidente a las longitudes de onda predeterminadas en una cantidad lo suficientemente grande como para que cualquier luz incidente que no sea absorbida no interfiera de manera apreciable con un análisis fotométrico del fluido biológico. El material de las perlas 16 puede colorearse uniformemente con el color que absorbe la luz, o el exterior de las perlas 16 puede tener el color que absorbe la luz.

En algunas realizaciones, las perlas 16 pueden configurarse con un material de extinción de fluorescencia para crear perlas conjugadas extintoras. Un ejemplo de un material que se puede usar para crear perlas conjugadas extintoras es QSY®7, que es un colorante aceptor no fluorescente disponible a través de Molecular Probes, Inc. de Oregon, EE. UU. Sin embargo, la presente invención no se limita a este colorante aceptor no fluorescente particular. Cabe señalar que algunos materiales extintores de fluorescencia también pueden utilizarse para absorber también la luz incidente.

En algunas realizaciones, las perlas 16 pueden comprender un material, o incluir un material en su superficie exterior (por ejemplo, un recubrimiento), que las hace lo suficientemente no reflectantes para la luz incidente a las longitudes de onda predeterminadas (lo que a veces se denomina como "antirreflectante" o "AR"), de modo que cualquier luz incidente que pueda reflejarse de la perla 16 no interfiera de manera apreciable con un análisis fotométrico del fluido biológico. La presente invención también puede incluir realizaciones con la perla 16 que usan alguna combinación de materiales absorbentes de luz y no reflectantes, cuyos materiales en combinación son tales que cualquier luz incidente que pueda reflejarse desde una perla no interfiera de manera apreciable con un análisis fotométrico del fluido biológico.

En algunas realizaciones, la superficie 19, 21 exterior de uno o ambos paneles 12, 14 de la cámara puede recubrirse con un recubrimiento antirreflectante. Un ejemplo no limitante de un recubrimiento antirreflectante aceptable es el

recubrimiento FluoroPel<sup>MR</sup> 601A, que se encuentra disponible comercialmente a través de Cytonix LLC de Maryland, EE. UU.

Según otro aspecto de la presente invención, las perlas 16 pueden configurarse para inhibir el material que se adhiere a su superficie exterior, material que emite luz fluorescente cuando se ilumina con luz de excitación. Por ejemplo, en aplicaciones de análisis que usan colorantes fluorescentes, ciertos colorantes pueden tener una afinidad por las perlas 16, lo que hace que se adhieran a las perlas 16. Como resultado, la luz incidente a ciertas longitudes de onda puede hacer que el colorante vuelva a fluorescer, y por lo tanto haga que las perlas 16 parezcan de colores brillantes. Como ejemplo específico, el naranja de acridina (AcO) es un colorante catiónico fluorescente selectivo de ácido nucleico. Las perlas 16 hechas de poliestireno están típicamente cargadas negativamente. Como resultado, las partículas de AcO pueden tener una afinidad por la superficie exterior de las perlas 16 de poliestireno, y en presencia de luz a ciertas longitudes de onda de excitación pueden producir una emisión fluorescente. Para disminuir o eliminar la afinidad entre las perlas 16 y el colorante, las perlas 16 pueden fabricarse y/o modificarse para tener una carga superficial positiva, teniendo dicha carga positiva una menor o ninguna afinidad por las partículas de AcO cargadas positivamente. En algunas realizaciones de la presente invención, las perlas 16 pueden estar configuradas para inhibir el material que emite luz fluorescente cuando se iluminan por la unión a sus superficies exteriores, y configurarse para no reflejar la luz (por ejemplo, incluidos materiales que absorben luz).

Las cámaras 10 de análisis descritas anteriormente se dimensionan típicamente para contener aproximadamente 0,2 a 1,0  $\mu$ L de muestra, pero la cámara 10 no está limitada a ninguna capacidad de volumen particular, y la capacidad puede variarse para adaptarse a la aplicación de análisis. En algunas realizaciones, la cámara 10 puede ser operada para contener en reposo una muestra líquida. El término "reposo" se usa para describir que la muestra se deposita dentro de la cámara 10 para su análisis y no se mueve a propósito durante el análisis. En la medida en que el movimiento esté presente dentro de la muestra de sangre que reside dentro de la cámara 10 de análisis de estas realizaciones, se deberá principalmente al movimiento browniano de los constituyentes que conforman la muestra de sangre, cuyo movimiento no impide el uso de esta invención. Como se indicó anteriormente, sin embargo, la presente invención no está limitada a estas realizaciones.

La presente cámara 10 de análisis descrita anteriormente se puede usar en una variedad de diferentes cartuchos de análisis y dispositivos de análisis. Para ilustrar la utilidad de la presente cámara 10 de análisis y facilitar la descripción del presente método, a continuación se proporciona una descripción de un cartucho y dispositivo de análisis aceptables. Sin embargo, la presente cámara 10 de análisis no está limitada a este tipo específico de cartucho y/o dispositivo de análisis.

La presente cámara 10 de análisis puede proporcionarse como parte de, o con, un cartucho 24 que está configurado para su uso en un dispositivo 26 de análisis automatizado, en el que una muestra dispuesta dentro de la cámara 10 de análisis se puede visualizar y analizar posteriormente. Un ejemplo de un cartucho 24 se muestra en la FIG. 3. Las solicitudes de patente de Estados Unidos Nos. 13/341.618 y 13/594.439, identificadas anteriormente, divulgan ejemplos de dichos cartuchos 24. El cartucho 24 incluye un puerto 28 de recolección, uno o más canales 30 internos y la cámara 10 de análisis. En la FIG. 3, la cámara 10 de análisis está dispuesta internamente dentro del cartucho y, por lo tanto, puede no ser visible. El puerto 28 de recolección está configurado para recibir una muestra de fluido biológico (por ejemplo, sangre entera sustancialmente sin diluir) y está en comunicación fluida con los canales 30. Los canales 30, a su vez, están en comunicación fluida selectiva con la cámara 10 de análisis. La muestra de fluido depositada en el puerto 28 de recolección puede moverse a través de los canales 30 y dentro de la cámara 10 de análisis mediante una combinación de acción capilar y fuerza motriz producida por un sistema de movimiento de la muestra; por ejemplo, un accionador del fluido. Un ejemplo de un dispositivo 26 de análisis con un sistema 32 de movimiento de la muestra se describe en la solicitud de patente estadounidense No. 13/077.476. Sin embargo, la presente invención no se limita a usar un sistema de este tipo.

Ahora con referencia a la FIG. 4, el dispositivo 26 de análisis incluye una lente 34 objetivo para la muestra, una pluralidad de iluminadores 36 de la muestra, al menos un analizador 38 de imágenes, el sistema 32 de movimiento de la muestra y un analizador 40 programable. Los iluminadores 36 de la muestra producen luz incidente dirigida a la muestra (por ejemplo, en una dirección perpendicular al plano de una superficie 18, 20 interior del panel de cámara, de al menos uno de los paneles 12, 14 de la cámara) a lo largo de longitudes de onda predeterminadas. La luz incidente transmitida a través de la muestra, o luz fluorescente de la muestra, se captura usando uno o más analizadores 38 de imágenes, y se envía una señal representativa de la luz capturada al analizador 40 programable, en el que se procesa en forma de una imagen. Un ejemplo de un analizador 38 de imágenes aceptable es un sensor de imágenes del tipo de un dispositivo acoplado de carga (CCD) que convierte la luz que pasa a través de (o desde) la muestra en una imagen en formato electrónico de datos. Los sensores complementarios de imágenes del tipo de semiconductores de óxido metálico ("CMOS") son otro ejemplo de un analizador 38 de imágenes que se puede usar.

El analizador 40 programable incluye una unidad central de procesamiento u otro dispositivo puede ser operado para llevar a cabo funciones que incluyen: 1) ejecutar las instrucciones de un programa de ordenador; 2) ejecutar funciones aritméticas y/o lógicas básicas; y, 3) ejecutar las operaciones de entrada/salida del analizador, etc. El analizador 40 está en comunicación con los iluminadores 36 de la muestra, el analizador o analizadores 38 de imágenes y el sistema 32 de movimiento de la muestra. El analizador 40 está adaptado (por ejemplo, programado) para recibir las señales y

ejecutar selectivamente las funciones necesarias para operar el iluminador o iluminadores 36 de la muestra, los analizadores 38 de imágenes y el sistema 32 de movimiento de la muestra.

Una muestra de fluido biológico (por ejemplo, una muestra de sangre completa) se deposita directamente en una cámara 10 de análisis, o en un cartucho 24 y se mueve selectivamente a través del cartucho 24 (por ejemplo, a través de un sistema 32 de movimiento de la muestra y/o de acción capilar) y dentro de una cámara 10 de análisis. Uno o más reactivos (por ejemplo, heparina, EDTA, colorante) se pueden mezclar con la muestra. En un análisis de una muestra de sangre completa, la adición de uno o más reactivos en relación con el volumen de la muestra es tal que la muestra de sangre completa no se diluirá sustancialmente.

Ahora con referencia a la FIG. 4, el dispositivo 26 de análisis puede ser operado para fotométricamente formar imágenes de la muestra que reside dentro de la cámara 10 de análisis, y posteriormente analizar la muestra usando la imagen. Durante la formación de imágenes, uno o más de los iluminadores 36 de la muestra pueden ser operados para producir luz incidente dirigida a la muestra a longitudes de onda predeterminadas. La luz incidente puede transmitirse a través de la muestra, momento en el cual es capturada por un analizador 38 de imágenes. La luz transmitida en el intervalo de aproximadamente 515-700 nm (por ejemplo, luz roja y verde) es útil para el análisis de sangre entera. La luz incidente también puede ser una longitud de onda de excitación que causa la emisión de luz fluorescente de un colorante mezclado con la muestra, cuya luz fluorescente emitida es capturada por un analizador 38 de imágenes. La luz de excitación fluorescente en el intervalo de aproximadamente 450-490 nm puede ser producida por una fuente de luz epifluorescente. En ambos casos, una señal representativa de la luz capturada se envía al analizador 40 programable, en el que se procesa en forma de una imagen.

Con referencia a la FIG. 6, se muestra una imagen de una muestra que reside en reposo dentro de una cámara 10 de análisis, cuya cámara 10 incluye una pluralidad de perlas 16 opacas dispuestas entre un par de paneles 12, 14 paralelos de la cámara. Esta imagen representa una imagen de luz fluorescente creada usando luz de excitación a aproximadamente 470 nm. Las perlas 16 opacas se pueden observar dentro de la imagen, cada una con un anillo 42 distintivo de luz relativamente brillante causada por la luz que se refleja de la perla 16. La FIG. 5 es una representación esquemática de la luz 27 incidente que se refleja en las distintas superficies de los paneles 12, 14 de la cámara, que ilustra lo que se cree que es al menos una parte de la fuente de luz que se refleja en las perlas y crea el anillo 42 distintivo mencionado anteriormente. Este anillo 42 distintivo puede interferir negativamente con otros análisis de la muestra basados en esta imagen. Por ejemplo, las plaquetas 44 dentro de la imagen fluorescente aparecen como pequeñas regiones de luz brillante. El anillo 42 distintivo de luz brillante asociado con una perla 16 opaca (u otro tipo de perla que refleja la luz de manera similar) puede interpretarse como una o más plaquetas 44, o puede ocultar las plaquetas 44 muy cerca de la perla 16. Por consiguiente, el uso de dichas perlas 16 en este tipo de análisis fotométrico pueden interferir con el análisis de ciertos constituyentes dentro de la muestra.

Las realizaciones de la presente invención evitan la interferencia fotométrica asociada con la formación de imágenes de perlas 16 opacas o claras (u otras perlas 16 que reflejan la luz emitida a longitudes de onda predeterminadas, a través de la transmitancia o la fluorescencia, en una cantidad que interfiere apreciablemente con un análisis fotométrico del fluido biológico) utilizando perlas 16 que minimizan o eliminan la luz reflejada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente invención incluye el uso de perlas 16 que comprenden un material, o que incluyen un material en su superficie exterior (por ejemplo, un recubrimiento), que las hace absorber luz a las longitudes de onda predeterminadas en una cantidad lo suficientemente grande como para que cualquier luz incidente en las perlas que no se absorbe (por ejemplo, la luz reflejada de la perla 16) no interfiera apreciablemente con un análisis fotométrico del fluido biológico. Como ejemplo específico, algunas realizaciones de la presente invención usan perlas 16 de color negro que absorben una cantidad de luz incidente suficiente para evitar el reflejo de la luz en una cantidad que interferirá de manera apreciable con un análisis fotométrico del fluido biológico. La FIG. 7 ilustra una pluralidad de perlas 16 de color negro dispuestas en una cámara 10 de análisis. La imagen en la FIG. 7 se crea utilizando una fuente de luz de excitación fluorescente a aproximadamente 463 nm (la presente invención no se limita a la misma usando luz a esta longitud de onda particular). Los anillos 42 distintivos de luz brillante causados por la luz incidente que se refleja en las perlas 16, como se muestra en la FIG. 6, no están presentes en relación con las perlas 16 negras usadas en la cámara mostrada en la FIG. 7. De hecho, debido a que las perlas 16 negras tienen un brillo distintivo mucho menos pronunciado, la FIG. 7 los muestra rodeados de un óvalo negro para facilitar su reconocimiento. Por lo tanto, las perlas 16 son fácilmente distinguibles de los constituyentes dentro de la muestra (por ejemplo, las plaquetas 44) y, por lo tanto, no interfieren apreciablemente con el análisis fotométrico de la muestra. En otras realizaciones, la presente invención puede utilizar perlas 16 que comprenden un material, o incluyen un material en su superficie exterior (por ejemplo, un recubrimiento), que las vuelve suficientemente no reflectantes a la luz incidente a longitudes de onda predeterminadas, de modo que cualquier luz incidente que puede reflejarse a partir de la perla 16 no interfiere apreciablemente con un análisis fotométrico del fluido biológico.

Las perlas usadas en la presente invención son particularmente útiles en casos en los que el análisis implica una muestra de sangre entera que contiene glóbulos blancos (WBC) teñidos con un colorante fluorescente. Según nuestra experiencia, los glóbulos blancos, que son sustancialmente más grandes que las plaquetas y típicamente más grandes que las perlas, pueden contener una cantidad relativamente grande del colorante fluorescente. Cuando la muestra se somete a una fuente de luz epifluorescente, el colorante dentro del glóbulo blanco emite luz. Debido al tamaño del glóbulo blanco y la cantidad de colorante que contiene, la cantidad de luz emitida por el glóbulo blanco puede ser

5 sustancial en relación con el resto de la muestra; es decir, los WBC aparecen brillantes en la imagen. Si una perla opaca o transparente está cerca del WBC, la luz emitida por el colorante e incidente a la perla adyacente puede crear un brillo significativo alrededor de la perla como resultado de la luz incidente que se refleja de la perla, cuyo brillo puede interferir negativamente con el análisis fotométrico. Sin embargo, el uso de perlas de acuerdo con la presente invención minimiza o elimina la reflexión de la luz incidente y, en consecuencia, la posibilidad de que la luz reflejada interfiera negativamente con el análisis fotométrico.

10 Si bien la invención se ha descrito con referencia a un ejemplo de una realización, los expertos en la materia entenderán que pueden realizarse diversos cambios y pueden sustituirse los elementos equivalentes por los mismos sin apartarse del alcance de la invención. Además, pueden realizarse muchas modificaciones para adaptar una situación o material particular a las enseñanzas de la invención sin apartarse del alcance esencial de la misma. Por lo tanto, se pretende que la invención no se limite a la realización o realizaciones particulares divulgadas en el presente documento como el mejor modo contemplado para llevar a cabo esta invención. Por ejemplo, la presente invención se describió anteriormente utilizando el ejemplo de una cámara 10 de análisis formada por un par de paneles 12, 14 de la cámara con perlas 16 dispuestas entre y en contacto con las superficies 18, 20 interiores de los paneles 12, 14 de la cámara. Como se indicó anteriormente, la presente invención no se limita a esta realización particular de la cámara. Las perlas 16 pueden, por ejemplo, estar dispuestas entre los paneles 12, 14 de la cámara pero no en contacto con las superficies 18, 20 interiores de los paneles 12, 14 de la cámara.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para analizar una muestra de fluido biológico, que comprende las etapas de:

- 5 proporcionar una cámara (10) de análisis definida por un primer panel (12) de la cámara que tiene una primera superficie (18) interior, y un segundo panel (14) de la cámara que tiene una segunda superficie (20) interior;
- 10 disponer la muestra de fluido biológico en la cámara (10) de análisis y mantener en reposo la muestra de fluido en la cámara (10) de análisis;
- 15 disponer una pluralidad de perlas (16) entre la superficie (18) interior del primer panel (12) de la cámara y la superficie (20) interior del segundo panel (14) de la cámara;
- 20 crear una o más imágenes de la muestra de fluido, incluido el direccionamiento de una o más longitudes de onda de la luz incidente a la muestra de fluido, mientras que la muestra de fluido reside en reposo con las perlas (16) dentro de la cámara (10) de análisis, en donde las perlas (16) están configuradas para no reflejar una o más longitudes de onda de la luz incidente en la muestra de fluido en una cantidad que interfiera apreciablemente con un análisis fotométrico del fluido de la muestra; y
- 25 analizar la muestra de fluido que permanece en reposo usando al menos una porción de una o más imágenes de la muestra.
- 30 2. El método de la reivindicación 1, en el que la pluralidad de las perlas (16) absorben una o más longitudes de onda de la luz incidente en una cantidad lo suficientemente grande como para que cualquiera de las una o más longitudes de onda de la luz que inciden en las perlas (16) que no se absorben no interfieran apreciablemente con un análisis fotométrico del fluido biológico.
- 35 3. El método de la reivindicación 2, en el que la pluralidad de perlas (16) tiene un color que absorbe la luz.
- 40 4. El método de la reivindicación 3, en el que el color de la pluralidad de perlas (16) es negro.
- 45 5. El método de la reivindicación 2, 3 o 4, en el que la pluralidad de las perlas (16) comprende además uno o más materiales que no son reflectantes a las una o más longitudes de onda de la luz incidente en una cantidad lo suficientemente grande como para que cualquiera de las una o más longitudes de onda de la luz que inciden en las perlas (16) que se reflejan no interfieran de manera apreciable con un análisis fotométrico del fluido biológico.
6. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que las perlas (16) están configuradas para inhibir que el material se adhiera a su superficie exterior, ya que dicho material emite luz fluorescente cuando se ilumina con luz de excitación.
7. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la pluralidad de perlas (16) comprende un material de extinción de fluorescencia en una cantidad tal que las una o más longitudes de onda de la luz incidente en las perlas (16) no se reflejarán en las perlas en una cantidad que interfiera apreciablemente con un análisis fotométrico del fluido biológico.
8. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que un recubrimiento antirreflectante está dispuesto sobre la superficie exterior del primer panel (12) de la cámara, o sobre la superficie exterior del segundo panel (14) de la cámara, o en ambas.



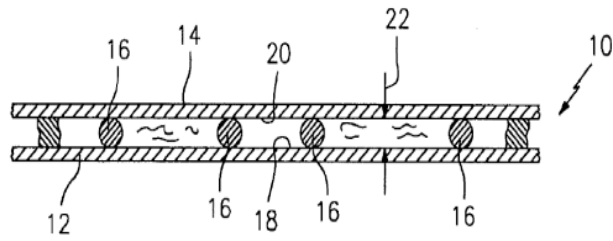


FIG. 1

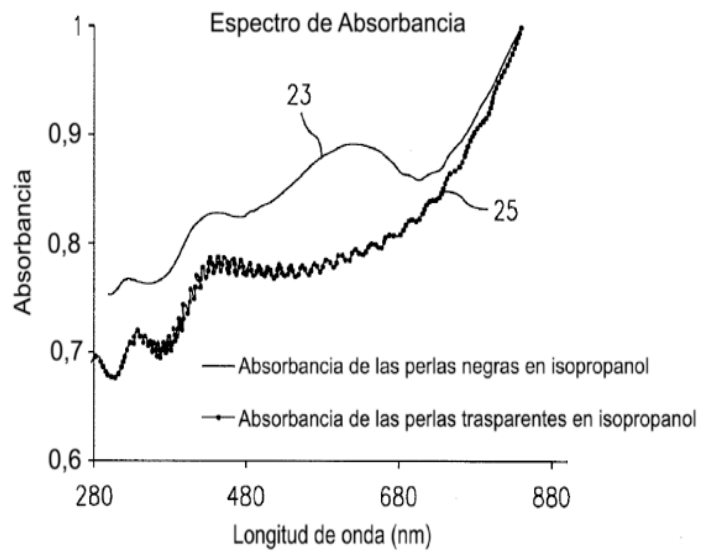


FIG. 2

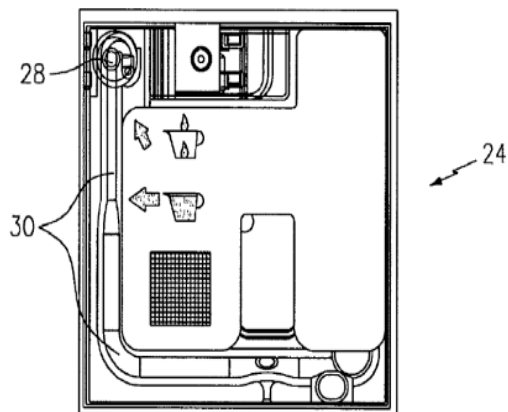


FIG. 3

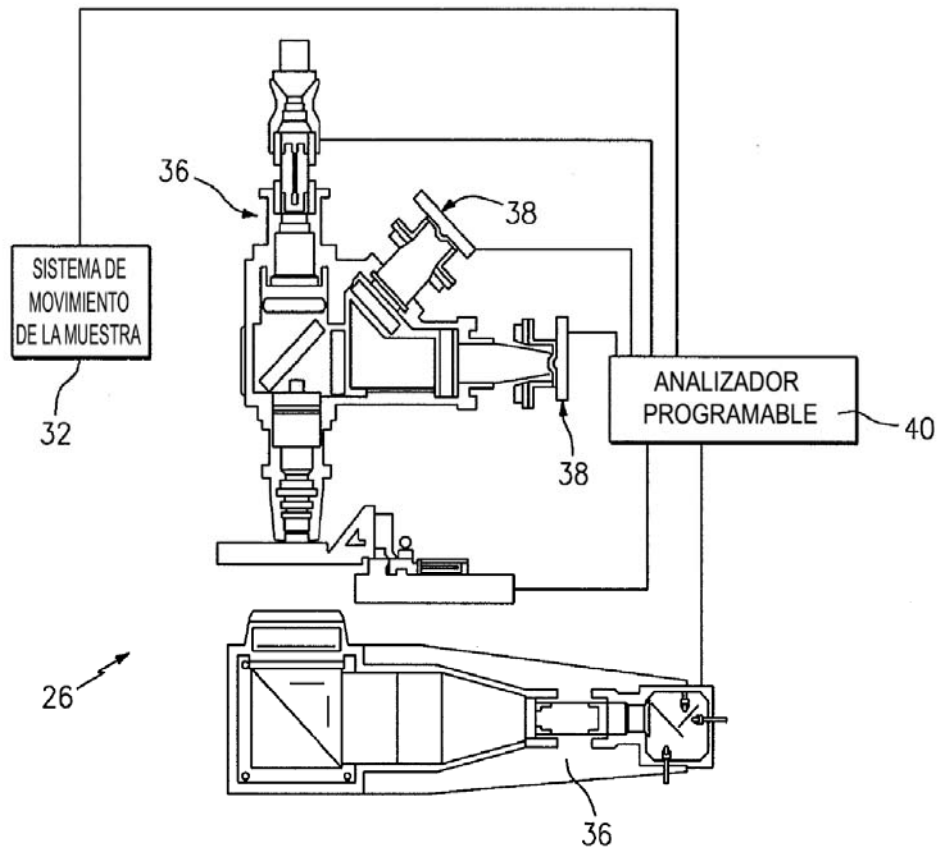


FIG. 4

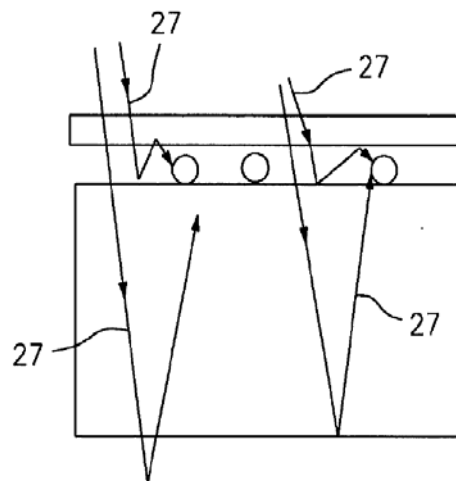
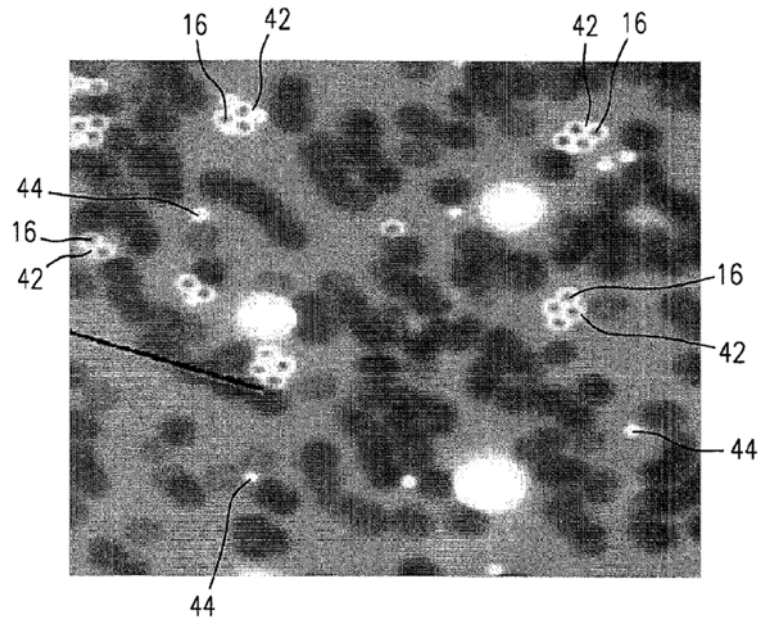
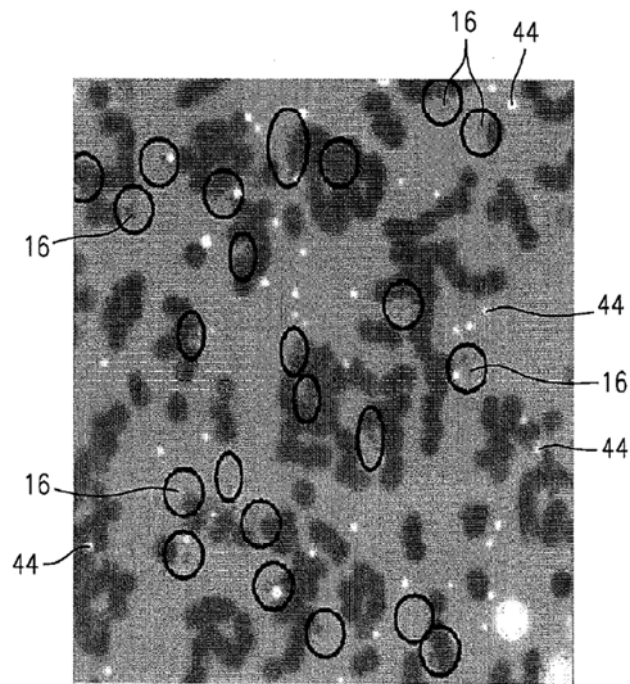


FIG. 5



*FIG. 6*



*FIG. 7*