

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 944**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 15/00 (2006.01)

G01N 15/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.10.2006 PCT/US2006/041011**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2007 WO07047908**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2006 E 06817200 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 1949310**

54 Título: **Método para llevar a cabo recuentos en una muestra de fluido biológico**

30 Prioridad:

19.10.2005 US 728058 P
25.10.2005 US 257757

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.06.2019

73 Titular/es:

ABBOTT LABORATORIES (100.0%)
100 Abbott Park Road, Dept. 377, AP6A-I
Abbott Park, Illinois 60064-6008, US

72 Inventor/es:

WARDLAW, STEPHEN C.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 716 944 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

Método para llevar a cabo recuentos en una muestra de fluido biológico

5 Antecedentes de la invención

1. Campo técnico

10 La presente invención se refiere a un método para analizar fluidos biológicos en general, permitiendo dicho método enumerar la materia particulada que hay en el interior del fluido biológico en particular. Los métodos de la técnica anterior se describen en los documentos US 5585246, WO 99/45382, WO 99/45384 y US 5547849.

2. Antecedentes

15 El hemograma completo (HC) es el conjunto de pruebas más frecuentemente realizado en la sangre entera e incluye varias pruebas separadas, tales como el recuento de leucocitos (WBC), el recuento de eritrocitos (RBC) y el recuento de plaquetas, entre otros. Los métodos utilizados varían en la exhaustividad del conjunto de analitos, en la complejidad y en el coste del equipo y coste por prueba. Los métodos menos complejos, tales como el método QBC®, descrito en la patente estadounidense n.º 4.156.570, suponen los menores costes de capital y son fáciles de llevar a cabo, pero
20 suelen ser los que tienen mayores costes por prueba. El método QBC® es lo más adecuado para situaciones de pruebas inmediatas en las que la experiencia del operario es mínima y cuando se llevan a cabo pocas pruebas por día. En el otro lado del espectro, los analizadores de sangre de gran volumen que se utilizan en los hospitales o laboratorios de referencia pueden tener un coste de capital veinte veces mayor pero un coste relativamente bajo por prueba cuando se utilizan en gran cantidad, lo que les hace mucho más económicos en dichos entornos.

25 Uno de los métodos más simples y antiguos para realizar un recuento de células supone el uso de un hemocitómetro. En un hemocitómetro, se diluye de forma precisa la sangre. Después, una cantidad aproximada de dicha dilución se coloca en una cámara hemocitométrica con una altura suficiente para que la muestra diluida, cuando fluya hacia la cámara, mantenga la misma uniformidad de las células que se halla en las muestras diluidas. Es decir, la cámara no debe concentrar o diluir selectivamente ninguna de las células u otros elementos porque la muestra fluya hacia y a
30 través de la cámara. Esto se debe a que solo se cuenta una fracción representativa de las células en un área conocida de la cámara. Si la distribución de las células fuera asimétrica, entonces dicho recuento reflejaría incorrectamente el recuento de toda la muestra.

35 Los sistemas modernos mayores, tal como Abbot CellDyn® o Bayer Advia®, se basan en una cierta variación de un citómetro de flujo (CF), donde una cantidad exacta de sangre se diluye de forma precisa y se mezcla con los reactivos en varias etapas. Las válvulas conducen la muestra diluida hacia varias áreas de prueba. Como con el hemocitómetro, la distribución de las células en el diluyente debe quedar relativamente homogénea, de manera que un recuento de una parte representativa de la muestra diluida pueda representar el recuento en la muestra original. Este enfoque
40 requiere una complejidad instrumental sustancial hasta el punto en el que la fiabilidad de estos instrumentos es relativamente baja. De hecho, con estos sistemas más grandes, no es poco común que se lleve a cabo un mantenimiento o reparación preventivos necesarios cada semana, o más a menudo, para lo que son necesarias las habilidades de tecnólogos de laboratorio o técnicos de servicio especialmente expertos, algo que se añade sustancialmente al coste de operación. Otro coste oculto de operación son los procesos de lavado, limpieza y
45 calibración que son necesarios para hacer que el sistema funcione adecuadamente.

En el sistema QBC®, una cantidad aproximada de sangre se coloca en un tubo capilar, se centrifuga y se examina. Este método, aunque no requiere una muestra exacta, no realiza recuentos de células fieles y no puede proporcionar
50 unas estimaciones exactas del número de células cuando solo hay pocas células presentes.

En los documentos de patente estadounidense n.º 6.723.290; 6.866.823; 6.869.570 y 6.929.953 se ha descrito un sistema intermedio, en donde la sangre se coloca para su análisis en un material desechable de un solo uso. Estas patentes describen un método e instrumento fiables, económicos y fáciles de utilizar que pueden proporcionar el mismo
55 abanico de datos analíticos que los sistemas anteriormente descritos de citometría de flujo. En este sistema, una cantidad aproximada de la muestra no diluida se coloca en un material desechable, cuyas características permiten distribuir las células en la muestra para que queden sustancialmente uniformes. Se cuentan las células de un campo visualizado, se determina el volumen de dicho campo y, después, se calcula el recuento de células por volumen. En este sistema, en cuanto al hemocitómetro, solo tiene que contar una parte de la muestra añadida en la cámara, ya que la distribución de las células es sustancialmente uniforme. Este método, sin embargo, requiere un material desechable
60 de un solo uso, que es ventajoso para las pruebas de volumen bajo, pero que no está pensado específicamente para pruebas de gran volumen.

En el documento WO 99/45384, se introduce una muestra en una cámara que tiene un grosor variable a través de su plano. Cualesquiera componentes dimensionados de manera distinta y presentes en la muestra se distribuirán de
65 forma estática en dicha cámara.

Será ventajoso disponer de un método en el que los elementos de una muestra diluida de sangre entera podrían enumerarse en una cámara lo suficientemente delgada, de modo que, a partir de una muestra, podrían obtenerse los recuentos celulares y la morfología celular, y uno en el que podrían mitigarse los efectos de la distribución no uniforme. Un método de este tipo reduciría o eliminaría la manipulación del fluido y la medición o dilución precisa de la muestra, lo que deriva en un método mucho más simple y menos costoso para dichos tipos de análisis.

Divulgación de la invención

En un aspecto, la invención proporciona un método para enumerar uno o más elementos celulares de una muestra de fluido biológico, tal y como se define en la reivindicación 1.

Se proporciona un método para realizar el recuento de los elementos de un medio fluido que es simple, preciso y relativamente barato. El método está particularmente bien adaptado para llevar a cabo los hemogramas (es decir, recuento de leucocitos, recuento de eritrocitos, etc.) en una muestra de sangre entera anticoagulada. En el presente método, se coloca una muestra de una cantidad aproximada en una cámara de una altura muy pequeña, de generalmente menos de 20 micrómetros, y para realizar un hemograma, preferentemente de aproximadamente cuatro micrómetros. Al introducirse en la cámara, la distribución de determinados tipos de elementos dentro de la muestra cambia de forma notable. El cambio en la distribución de determinados elementos de la muestra puede atribuirse al tamaño de los elementos en la muestra con respecto a la altura de la cámara. Por ejemplo, si se introduce una muestra de sangre en la cámara, los eritrocitos de la muestra se concentrarán en la periferia de la cámara y los leucocitos de la muestra se concentrarán cerca de la entrada de la muestra en la cámara. Los eritrocitos normalmente se dispersan en la muestra a más distancia de la entrada que lo que lo hacen los leucocitos, pues los eritrocitos son más pequeños y normalmente tienen unas membranas muy móviles y pueden adaptarse a espacios estrechos, mientras que los leucocitos son mayores y relativamente rígidos en comparación con los eritrocitos. Aunque la altura relativamente fina de la cámara permite visualizar fácilmente los elementos, la distribución de los elementos en la muestra es tal que normalmente no hay una región parcial de la muestra que represente toda la muestra. En consecuencia, no hay una región parcial que represente toda la muestra y de la que pueda hacerse el recuento para obtener un recuento preciso de toda la muestra. En el presente método, al contrario que con todos los otros métodos de enumeración que se conocen, se examina toda la muestra añadida en la cámara y se enumeran todas las células distribuidas de manera no uniforme en la muestra del/los tipo(s) en particular que debe(n) examinarse. Cuando se sabe el número total del tipo de célula distribuida de manera no uniforme que debe examinarse en la muestra, el recuento de la célula distribuida de manera no uniforme de dicho tipo por unidad de volumen de la muestra se puede calcular dividiendo el número de células contadas por el volumen contenido en la cámara. El fenómeno de la distribución de células de manera no uniforme en pequeñas cámaras se conoce muy bien desde los principios del recuento celular, y siempre se ha evitado por ser muy poco deseable debido a la clara imposibilidad de realizar un recuento a mano de todos los elementos de la cámara para obtener un recuento total preciso. Además, el tamaño diminuto de la muestra utilizado en dicha cámara impidió realizar una medición inicial precisa de la cantidad de muestra o calcular posteriormente el volumen de muestra de la muestra esparcida de manera irregular en dicho tipo de cámara. Sin embargo, con la reciente aparición de sistemas de obtención de imágenes digitales precisos y rápidos, que permiten llevar a cabo estos recuentos y calcular el área total de la muestra de la cámara, actualmente se puede utilizar una cámara de película fina de manera ventajosa como método simple y eficaz para obtener hemogramas u otros recuentos.

La presente invención, al contrario que con todos los otros métodos de la técnica anterior que se conocen, examina la totalidad de una muestra de fluido biológico (por ejemplo, sangre entera no diluida) presente en una película fina introducida en una cámara, definida por dos sustratos relativamente planos, donde puede determinarse el volumen total de la muestra añadida en la cámara. Se enumeran todos los de, al menos, uno de los elementos específicos de la muestra, al contrario que con todos los otros métodos, donde solo se examina una parte de la muestra. La frase "todos los de, al menos, uno de los elementos específicos" está pensada para querer decir "todos los de un tipo particular de los elementos específicos". Si uno del uno o más elementos específicos incluye los elementos A, B y C, por ejemplo, y el "al menos uno de los elementos específicos" se refiere al elemento A, entonces, enumerar "todos los de, al menos, uno de los elementos específicos" significará enumerar todos los elementos A de la muestra.

Se puede utilizar cualquier cámara conformada con al menos una pared transparente. La cámara se puede fabricar mediante técnicas como el micromecanizado, grabado o sedimentación del sustrato. La técnica descrita en la solicitud de patente estadounidense pendiente con números de serie 09/885.193 y 09/366.881, que utiliza una capa de elementos separadores para crear el grosor uniforme de la cámara, es un ejemplo de una técnica aceptable.

El presente método requiere que el volumen de la muestra que se introduce en la cámara pueda conocerse o determinarse sustancialmente de manera precisa. La expresión "sustancialmente de manera precisa" se define como la precisión del volumen que es adecuada para la prueba en cuestión. La determinación del volumen de la muestra se puede llevar a cabo utilizando varias técnicas distintas, incluyendo, pero no limitándose a: 1) calcular el volumen de la muestra cuando se deposite por primera vez mediante la obtención de imágenes interferométricas utilizando técnicas ópticas disponibles gracias a fuentes como Zygo Corporation, de Middlefield, Connecticut; o 2) calcular el volumen de la muestra después de la formación de la película (la película se conforma esparciendo la muestra en la cámara) midiendo el área de la película de muestra y multiplicándola por la altura media de la película de muestra; o 3) utilizar o fabricar una cámara que tenga un volumen preciso conocido (es decir, su grosor y amplitud), donde la muestra de

sangre añadida fluir hacia la cámara hasta que esta no pueda contener más sangre (es decir, ya que el volumen total de la sangre contenida se conoce *a priori*, el número total de los elementos enumerados se divide por el volumen conocido de la cámara para proporcionar el recuento/volumen).

5 Para los fines de esta invención, la función de un instrumento de lectura o enumeración de células puede ser similar a la mostrada en la solicitud de patente estadounidense pendiente con n.º 09/981.581 y 10/023.405.

Estos y otros objetivos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes en vista de la descripción detallada de la invención proporcionada más adelante y como se ilustra en los dibujos adjuntos.

10

Breve descripción de los dibujos

Los principios de la invención se aclaran adicionalmente haciendo referencia a las siguientes figuras.

15 La figura 1 es un diagrama de una cámara que tiene dos superficies transparentes separadas por un espacio conocido y relativamente uniforme.

La figura 2 es una sección transversal del diagrama de la cámara de la figura 1 después de haber introducido un volumen de sangre en la cámara.

La figura 3 es una vista en planta superior esquemática que muestra una cámara llena y no llena.

20

La figura 4 es una vista esquemática en aumento de una región central de una cámara.

La figura 5 es una vista esquemática en aumento de una región periférica de una cámara.

Descripción detallada de la invención

25 Haciendo referencia a las figuras 1-5, el presente aparato para analizar fluidos biológicos, que no forma parte de la presente invención, incluye una o más cámaras 2 definidas por un primer miembro plano y un segundo miembro plano, separadas entre sí por una distancia, denominada de aquí en adelante, altura de cámara 16. Al menos, uno del primer miembro plano y del segundo miembro plano es lo suficientemente transparente para poder obtener imágenes de una muestra de fluido biológico dispuesta en el interior de una cámara 2. Para facilitar la descripción de la una o más

30 cámaras 2, los miembros planos se denominan, de aquí en adelante, miembro plano "superior" 4 y miembro plano "inferior" 3. El miembro plano superior 4 también se describe de aquí en adelante como transparente. En ejemplos alternativos, el miembro plano inferior 3 puede ser transparente en lugar del miembro plano superior 4 o además del miembro plano superior 4.

35 Los miembros planos 3, 4 pueden conformarse a partir de varios materiales que tengan propiedades idénticas o distintas. La solicitud de patente del Tratado de cooperación en materia de patentes con número de serie PCT/2005/011602, comúnmente en propiedad con la presente solicitud, divulga ejemplos de miembros planos 3, 4 aceptables. Como ejemplo adicional, el miembro plano superior 4 puede conformarse a partir de una cinta de tereftalato de polietileno (PET) que tenga un grosor y anchura de aproximadamente 25 μ y 2,54 cm (1 pulgada), respectivamente.

40 El miembro plano inferior 3 puede conformarse de manera similar a partir de cinta PET que tenga una anchura similar, y con un grosor similar de aproximadamente 128 μ . Los presentes ejemplos en los que los miembros planos 3, 4 son flexibles, permiten enrollar las cámaras 2 en un carrete.

45 En algunos ejemplos, las cámaras 2 están definidas además por una o más paredes laterales 7. En las realizaciones preferidas, las paredes laterales 7 consisten en material de conexión que se extiende entre el miembro plano superior 4 y el miembro plano inferior 3. Las paredes laterales 7 se pueden colocar para crear diferentes configuraciones de la cámara. Por ejemplo, el material de conexión puede aplicarse para que una o más de las paredes laterales 7 se extiendan sustancialmente por la anchura de los miembros planos 3, 4. En otros ejemplos, las paredes laterales 7 pueden conformarse con una forma que albergue sustancial o completamente la cámara 2. El ejemplo mostrado en la

50 figura 3 muestra un compartimento con una pared lateral 7 con forma elíptica conformada por material de conexión. Las paredes laterales 7 pueden estar hechas con un material distinto al material de conexión.

Para los ejemplos de paredes laterales 7 que utilizan material de conexión, el material de conexión puede consistir en cualquiera de una variedad de materiales distintos que se adhieran a los miembros planos 3, 4 o que interactúen con

55 los miembros planos 3, 4 de manera suficiente para crear un sello adecuado que retenga la muestra en la cámara 2. El material de conexión es un material con propiedades adhesivas que fija los miembros planos 3, 4 entre sí. Son particularmente útiles los materiales de conexión que incluyen adhesivo fotopolimerizable, de los que hay disponibles fácilmente numerosos ejemplos.

60 En algunos ejemplos, la cámara 2 incluye uno o más elementos separadores 5 dispuestos en el interior de la cámara. Los ejemplos de elementos separadores 5 aceptables se divulgan en la solicitud de patente estadounidense pendiente con n.º 09/885.193 y 09/366.881, y en la solicitud de patente PCT n.º PCT/2005/011602. Un ejemplo de un elemento separador 5 aceptable es una perla esférica hecha de poliestireno, con un diámetro conocido y controlado de manera exacta. En los ejemplos en los que los miembros planos 3, 4 están conformados a partir de material sustancialmente

65 rígido, no tiene por qué existir la necesidad de que haya elementos separadores 5, dependiendo de la configuración real de la cámara.

En algunos ejemplos, el miembro plano 4 superior incluye uno o más de un orificio de entrada 8 y de una abertura de descarga 10. El orificio de entrada 8 hace que la muestra biológica pueda acceder a la cámara. La abertura de descarga 10 proporciona un canal a través del que puede escapar el aire a medida que la muestra biológica se introduce en la cámara 2. En los ejemplos en los que hay abierta al menos una parte de la cámara 2 (por ejemplo, en donde las paredes laterales de la cámara 2 no conforman un compartimento completo), el orificio de entrada 8 y la abertura de descarga 10 se pueden omitir.

Para ilustrar la utilidad del presente aparato, se proporcionan los siguientes ejemplos de los métodos para utilizar el aparato. El método de la presente invención, sin embargo, no se limita a estos ejemplos en particular.

Haciendo referencia a la figura 2, se muestra una cámara 2 después de haber introducido a través del orificio de llenado 8 una muestra 6 de sangre entera anticoagulada y no diluida. En algunas aplicaciones, no es necesario que la muestra 6 rellene totalmente la cámara 2. En aquellas realizaciones en las que uno o ambos de entre el miembro plano 4 superior y el miembro plano 3 inferior son relativamente flexibles, es preferible que la cámara 2 no se llene completamente y que queden pequeñas áreas 9 sin rellenar. Las áreas 9 sin rellenar son ventajosas en este tipo de ejemplos de cámara 2, pues la fuerza capilar de las áreas sin rellenar ejerce una fuerza descendente potente sobre los miembros planos 3, 4 de la cámara 2, fuerza que es útil para mantener uniforme la altura 16 de la cámara 2.

En una segunda realización, la figura 3 ilustra un par de cámaras 2', 2" adyacentes entre sí. La cámara 2', dispuesta a la izquierda, muestra una cámara no rellena definida en parte por un compartimento 7 de pared lateral. El miembro plano 4 superior de la cámara 2' incluye un orificio de entrada 8 y un par de aberturas de descarga 10. Una muestra de fluido biológico 6 (por ejemplo, sangre) se ha introducido en la cámara 2" dispuesta a la derecha, a través del orificio de entrada 8. La muestra 6 se ha esparcido desde el orificio de entrada 8 para rellenar la mayor parte de la cámara, dejando pequeños espacios de aire 9 que son adyacentes a las aberturas de descarga 10. Debido a las magnitudes relativas de la altura 16 de la cámara y del "grosor" promedio (por ejemplo, diámetro) de uno o más elementos específicos (por ejemplo, los leucocitos, los eritrocitos) presentes en la muestra, la distribución de los elementos en la muestra suele volverse muy poco uniforme. Una distribución muy poco uniforme se diferencia claramente de los métodos de la técnica anterior, que se basan en una distribución uniforme de los elementos para garantizar la precisión.

Un ejemplo de una distribución no uniforme de los elementos en una cámara 2 se ilustra en la figura 4, que muestra una representación esquemática del campo del microscopio cerca del orificio de entrada. En esta representación, el plasma 11 es más abundante que los eritrocitos 12. Debido a su tamaño, los leucocitos 13 también se concentran en esta área. En esta figura también se observan las partículas separadoras 5 y las plaquetas 14. En este ejemplo, los elementos específicos que se deben enumerar, por ejemplo, podrían ser uno o más de los leucocitos 13 o de los eritrocitos 12. Los elementos que deben enumerarse también podrían ser conjuntos secundarios de los elementos identificados; por ejemplo, tipos específicos de leucocitos, o leucocitos que tienen epítomos de superficie que se tiñen de forma selectiva para poder identificarlos y enumerarlos de manera separada, etc.

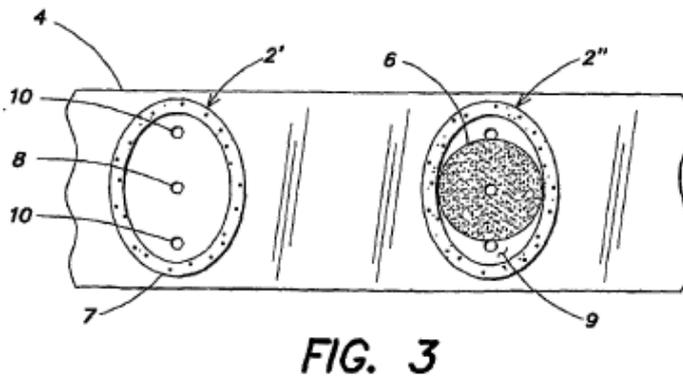
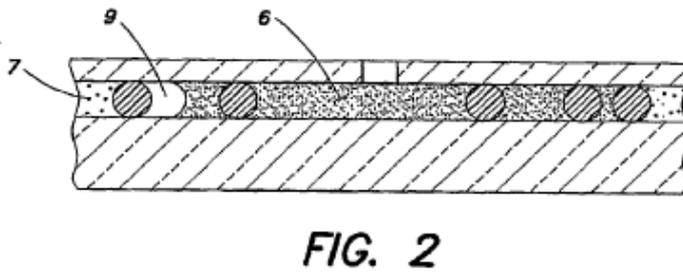
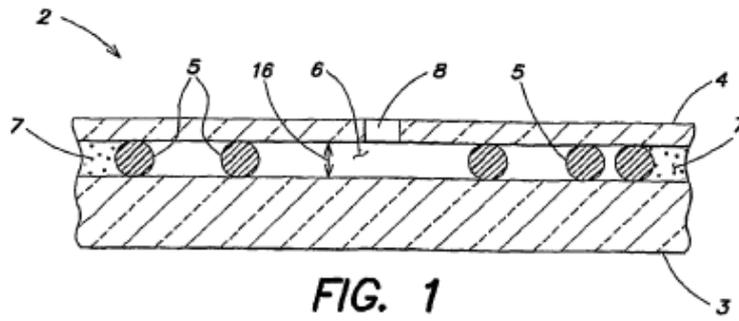
Por el contrario, en la figura 5 se ilustra esquemáticamente el campo del microscopio, que representa una parte de la cámara 2 dispuesta cerca de la pared lateral 7 de la cámara. En dicho campo, las masas de eritrocitos 12 se disponen adyacentes a la pared lateral 7 y representan la mayor parte del campo.

A partir de estos ejemplos, está claro que en la práctica no es posible una enumeración precisa utilizando los métodos de la técnica anterior, que solo tienen en cuenta una fracción de la muestra. Por el contrario, el método de la presente invención puede proporcionar una enumeración precisa en las aplicaciones en las que los elementos que deben enumerarse no se distribuyan de manera uniforme. Al mismo tiempo, se puede obtener información específica relativa a determinados elementos específicos (por ejemplo, la morfología de los leucocitos). Para obtener una enumeración precisa utilizando el presente método, se obtienen imágenes de toda la muestra utilizando una cámara digital, y la imagen se somete a un análisis que detecta y enumera cada uno de los elementos que hay en la cámara, dispersados de manera no uniforme y que son la diana específica. Dependiendo del área de la muestra, este análisis puede obtener fotogramas de imagen de uno en uno, a medida que se obtienen imágenes de todo el área de la muestra, o pueden "unirse" una serie de imágenes entre sí para crear una imagen más grande que se analice de una vez. En la patente estadounidense n.º 6.866.823; 6.869.570 y 6.929.953 se describen un instrumento adecuado y un *software* para este. Después, el mismo análisis de imagen determina el volumen real de la muestra en la cámara. Cuando se ha completado el recuento y se ha determinado el volumen, se calcula el recuento por unidad de volumen.

Se puede apreciar que esta invención también puede llevar a cabo la mayoría de las funciones de un citómetro de flujo añadiendo un fluorescente u otros marcadores en los ligandos específicos de células y examinando la cámara para enumerar qué células tienen el marcador de ligando adherido a sus superficies.

REIVINDICACIONES

1. Un método para enumerar uno o más elementos celulares (12, 13, 14) en una muestra de fluido biológico (6), que comprende las etapas de:
- 5 proporcionar una cámara (2), formada entre un primer miembro plano (3) que es transparente y un segundo miembro plano (4), cuyos miembros (3, 4) están separados entre sí por una altura (16) sustancialmente uniforme; introducir la muestra de fluido biológico (6) en la cámara (2), en donde la muestra de fluido biológico incluye una pluralidad de elementos celulares (12, 13, 14) distintos, teniendo la altura (16) de la cámara unas dimensiones para que la muestra (6) se extienda entre el primer y el segundo miembros (3, 4) al menos por una parte de la cámara (2);
- 10 dar unas dimensiones a la altura (16) de la cámara con respecto al grosor del uno o más elementos celulares (12, 13, 14), de modo que los elementos celulares (12, 13, 14) se distribuyan de manera no uniforme en la muestra (6) al introducirla en la cámara (2), en donde el cambio de la distribución de determinados elementos celulares (12, 13, 14) en la muestra (6) puede atribuirse al tamaño de los elementos celulares (12, 13, 14) de la muestra (6) con respecto a la altura (16) de la cámara (2);
- 15 examinar sustancialmente toda la muestra (6) que está dentro de la cámara (2) y enumerar todos del menos uno de los elementos celulares (12, 13, 14);
- 20 determinar el volumen de la muestra (6) contenida en la cámara (2); y
- determinar el número de al menos uno de los elementos celulares (12, 13, 14) por unidad de volumen.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la altura (16) de la cámara tiene unas dimensiones para que la muestra (6) se extienda entre el primer y el segundo miembros (3, 4) sustancialmente por toda la extensión de la cámara (6).
- 25 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la muestra de fluido biológico (6) es sangre entera anticoagulada.
4. El método de la reivindicación 1, 2 o 3, en donde las etapas de examinación, determinación del volumen y determinación del número utilizan análisis de imágenes digitales.
- 30 5. El método de la reivindicación 4, en donde el al menos uno de los elementos celulares (12, 13, 14) enumerados o los elementos celulares (12, 13, 14) enumerados incluyen leucocitos (13).
- 35 6. El método de la reivindicación 5, en donde el al menos uno de los elementos celulares (12, 13, 14) o los elementos celulares (12, 13, 14) son conjuntos secundarios de leucocitos (13) que tienen epítomos de superficie que se tiñen de manera selectiva para poder identificarlos y enumerarlos de manera separada.
7. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde se enumeran todos los elementos celulares (12, 13, 14) no distribuidos de manera uniforme en la muestra (6).



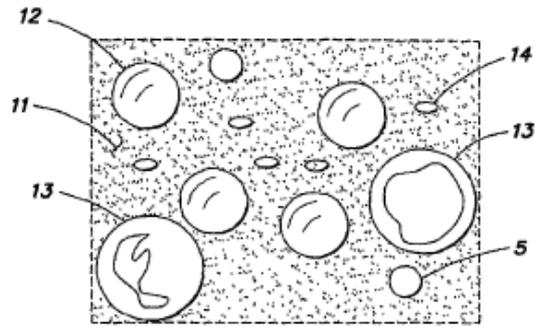


FIG. 4

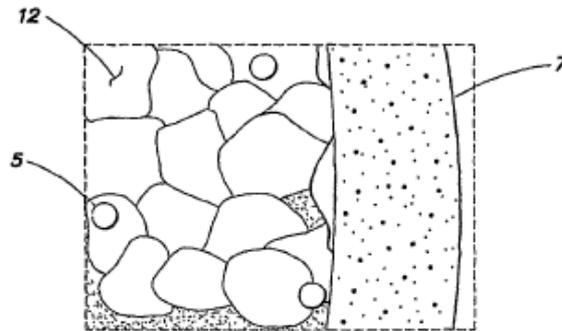


FIG. 5