

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 478**

51 Int. Cl.:

**G01N 15/14** (2006.01)

**G01N 33/49** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2006 E 06720838 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012 EP 1849125**

54 Título: **Procedimiento y aparato para el análisis de fluidos corporales**

30 Prioridad:

**14.02.2006 US 354603**  
**17.02.2005 US 653752 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.04.2013**

73 Titular/es:

**IRIS INTERNATIONAL, INC. (100.0%)**  
**9162 ETON AVENUE**  
**CHATSWORTH CA 91311-5606, US**

72 Inventor/es:

**TURNER, RICHARD H.;**  
**CHAPOULAUD, ERIC y**  
**KASDAN, HARVEY**

74 Agente/Representante:

**DURÁN MOYA, Carlos**

ES 2 400 478 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Procedimiento y aparato para el análisis de fluidos corporales

**5 SECTOR DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere de manera general a procedimientos y sistemas para el análisis de partículas contenidas en una muestra y más particularmente, para identificar y cuantificar las partículas de la muestra.

**10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

Los procedimientos y aparatos para el proceso de imágenes de partículas en una muestra de fluidos son bien conocidos. Por ejemplo, los documentos Patente USA N<sup>os</sup>. 4.338.024, 4.393.466, 4.667.335 y 4.612.614 describen aparatos para analizar partículas biológicas. Estos aparatos de análisis de partículas biológicas pueden determinar automáticamente, es decir, sin intervención humana, características tales como color, dimensiones, y brillo de las partículas en una muestra de fluido. Además, basándose en las características determinadas, estos aparatos pueden clasificar cada partícula en una de muchas clases y pueden calcular la concentración de cada tipo de partícula (es decir, clase de partícula). Este proceso automático de análisis de muestras y determinación de concentración se designa como Auto-Particle Recognition (APR) (Reconocimiento Automático de Partículas).

Los resultados de la clasificación y cálculo se pueden mostrar de la forma que se da a conocer en la Patente USA N<sup>o</sup>. 5.822.447. Es decir, se toma una serie de imágenes ópticas de manera que cada imagen es una representación de una parte de la muestra. Preferentemente, las imágenes representan diferentes partes de la muestra. Una imagen está constituida por uno o varios "fragmentos de imágenes", conteniendo cada fragmento como mínimo una imagen de una partícula. El reconocimiento de los segmentos se puede implementar de acuerdo con la ubicación de la solicitud de Patente USA 2004/0136593. Los segmentos son clasificados en una de una serie de clases basándose en las imágenes que contienen y las clases se caracterizan usualmente por una o varias características visualmente discernibles. En algunas realizaciones, si un segmento contiene más de una imagen de una partícula discernible, las imágenes de partículas se podrían clasificar separadamente. En otras realizaciones, se utiliza la imagen de la partícula más predominante para clasificar el segmento. Se puede utilizar tecnología de red neural en el proceso de clasificación automática, tal como se da a conocer en la publicación de solicitud de Patente USA 2004/0126008. Después de la clasificación, se determinan las concentraciones de cada clase de partículas.

Los segmentos extraídos de las imágenes pueden ser visualizados en una interfaz gráfica de usuario (por ejemplo, un monitor de ordenador), preferentemente en disposición ordenada por clasificación. El número de partículas dentro de cada clase o cualquier parámetro derivado de las mismas (por ejemplo, porcentaje del número total de partículas) puede ser visualizado. El proceso APR determina la concentración (lo que de otro se designa como conteo, que es el número de partículas por unidad de volumen de la muestra) de cada tipo de partículas (es decir, clase de partículas) basándose en esta clasificación. Entonces, un operador puede revisar manualmente los resultados de la clasificación APR y corregir cualesquiera errores. Durante el proceso de revisión manual, el operador puede extraer una partícula mal clasificada de una clase y añadirla a otra.

Una aplicación para APR es el conteo de glóbulos rojos (RBC) y glóbulos blancos (WBC) (conocidos de otro modo como linfocitos) de una muestra de fluido vertebral. El problema es que para algunos sistemas de APR puede ser difícil discriminar con precisión y cuantificar los RBC y los WBC. Existe la necesidad de sistema y procedimiento para mejorar la clasificación de partículas.

El documento DE2052010 da a conocer un dispositivo para analizar lavados de fluidos corporales que contienen células. Las células cancerosas son destruidas utilizando ultrasonidos, y las células restantes son contadas utilizando un microscopio.

En el documento WO9221027 se da a conocer un procedimiento de cribado óptico y aparato para identificar y contar células que expresan características o propiedades seleccionadas.

El documento US4599307 da a conocer un procedimiento para identificar subpoblaciones de células de interés sin interferencia de otras células.

El documento US6699680 da a conocer un procedimiento para la determinación de una medición del número de plaquetas en una suspensión de células que contiene plaquetas.

En el documento US3586859 se da a conocer un procedimiento y aparato para determinar automáticamente el número de células muertas en un lote. Las células son contadas, a continuación se vuelven a contar después de que las células han sido sumergidas en un baño de calentamiento.

El documento US2002028517 da a conocer un procedimiento para determinar la activación de plaquetas utilizando conteo numérico de plaquetas antes de que una muestra de plaquetas ha sido activada y después de que las

plaquetas activables son activadas con un agonista de activación de plaquetas.

En el documento US5264369 se prepara una muestra hematológica para clasificar y contar leucocitos con un citómetro de flujo.

En el documento WO02079752 se da a conocer la utilización de una combinación exclusiva de marcadores que identifican células anormales restando falsos positivos que de otro modo se generarían, por ejemplo, por células normalmente proliferantes y restos no celulares.

El documento US5822447 da a conocer un procedimiento y un aparato para analizar partículas en una muestra de fluido por distribución de la muestra sobre un área extensa y tomando una serie de imágenes ópticas fijas de la muestra, representando cada imagen una parte distinta del área.

## CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

Se da a conocer un procedimiento y un sistema para mejorar la precisión del reconocimiento y análisis automático de partículas.

Un procedimiento de análisis de una muestra que contiene partículas incluye la determinación de un primer conteo colectivo de un grupo seleccionado de partículas de una muestra, tratar como mínimo una parte de la muestra para alterar un subgrupo del grupo seleccionado de partículas, determinando un segundo conteo colectivo de cualquier grupo seleccionado de partículas en la parte tratada de la muestra, y sustraer el segundo conteo colectivo del primer conteo colectivo para determinar un conteo de diferenciación para el subgrupo de partículas alteradas por el tratamiento de la muestra.

Un dispositivo para analizar una muestra que contiene partículas que incluye un dispositivo de formación de imágenes para captar imágenes de partes tratadas y no tratadas de una muestra y crear imágenes electrónicas de las imágenes captadas, en el que un subgrupo de un grupo seleccionado de partículas de la muestra es alterado en la parte tratada de la muestra y un procesador. El procesador está adaptado para determinar un primer conteo colectivo del grupo seleccionado de partículas en la parte no tratada de la muestra, determinar un segundo conteo colectivo de cualquiera de las partículas del grupo seleccionado en la parte tratada de la muestra y restar el segundo conteo colectivo del primer conteo colectivo para determinar un conteo de diferenciación para el subgrupo de partículas alteradas en la parte tratada de la muestra.

Otros objetivos y características de la presente invención quedarán evidentes por la siguiente descripción, reivindicaciones y figuras adjuntas.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un diagrama esquemático de un analizador de partículas.

La figura 2 es un diagrama de flujo que muestra las etapas de procedimiento de una realización de análisis de partículas.

La figura 3 es un diagrama de flujo que muestra las etapas de procedimiento de una segunda realización de análisis de partículas.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERENTES

El sistema y procedimiento que se describen mejoran la exactitud de clasificación de partículas que pueden ser difíciles de diferenciar, especialmente en sistemas analizadores automatizados de partículas. El sistema y procedimiento mejorados pueden ser utilizados empleando técnicas de reconocimiento automático de partículas (APR) utilizando un analizador de partículas que tiene un sistema de imagen -2- y un procesador -4-, tal como se ha mostrado esquemáticamente en la figura 1.

### Sistema de imagen y procesador

El sistema de imagen -2- es utilizado para producir imágenes de campos de visión de una muestra que contiene las partículas de interés. El sistema de formación de imágenes -2- es preferentemente un microscopio de flujo de tipo bien conocido tal como los que se describen en las Patentes USA 4.338.024, 4.393.466, 4.538.299 y 4.612.614. Este sistema incluye una célula de flujo -10-, un microscopio -12-, y una cámara -14-, tal como se ha mostrado en la figura 1. Fluido de muestra que contiene las partículas de interés se hace pasar por un área de examen de la célula de flujo -10-, de manera que imágenes de las partículas son visibles a través del microscopio de flujo -12-. La cámara -14- (que es preferentemente una cámara CCD) capta imágenes de sucesivos campos de visión de partículas mediante el microscopio -12-, dado que las partículas fluyen a través de la célula de flujo -10-, y las convierte en imágenes de partículas digitales. Cada una de las imágenes de partículas digitales tomada por la

cámara -14- comprende miles e incluso millones de píxeles individuales. Una fuente de luz -16- (por ejemplo, un estroboscopio) es utilizado preferentemente para iluminar (por la parte frontal y/o por retroiluminación) el área del examen de la célula de flujo -10-. Se debe observar que el procedimiento y el sistema descritos también se pueden aplicar a un procedimiento y sistema de formación de imágenes que analiza un fluido de muestra sin flujo (por ejemplo, fluido de muestra situado sobre una placa de análisis).

El procesador -4- puede ser cualquier microprocesador y/o sistema de ordenador, o una serie de microprocesadores y/o sistemas de ordenador capaces de procesar las imágenes digitales de partículas tal como se describen más adelante. Se incluyen entre los ejemplos de dichos procesadores, si bien ello no es limitativo, procesadores de datos, DSP (digital signal processors) (procesadores digitales de señales), microcontroladores, y procesadores de sistemas de ordenador, cada uno de los cuales puede ser de tipo CISC y/o RISC. El procesador -4- procesa las imágenes digitales de partículas para detectar, clasificar, cuantificar, y/o visualizar imágenes de las partículas, preferentemente utilizando algunas o todas las técnicas dadas a conocer en las Patentes USA 4.338.024, 4.393.466, 4.667.335 y 4.612.614, y 5.822.44, y en las publicaciones de solicitudes de Patentes USA 2004/0136593 y 2004/0126008.

#### Detección mejorada de partículas

El procesador -4- que se ha descrito comprende además características funcionales para llevar a cabo el procedimiento que se describe más adelante y en la figura 2, que mejora la exactitud del conteo de partículas que son difíciles de distinguir entre sí. Tal como se utiliza en esta descripción, los términos "conteo" o "contaje" significarán la determinación del número de partículas de interés en un volumen conocido de fluido de muestra o en un volumen unidad del fluido de muestra. El procedimiento se describe con respecto a glóbulos rojos (RBC) y glóbulos blancos (WBC) en una muestra tal como fluido vertebral, solamente como ejemplo. No obstante, otras partículas difíciles de distinguir se pueden clasificar y contar de manera similar en otras muestras de fluido, y las reivindicaciones no quedarán necesariamente limitadas en modo alguno a muestras de fluido vertebral para cuantificar RBC y WBC basándose en este ejemplo.

En la etapa 1, un grupo seleccionado de partículas (por ejemplo, RBC y WBC) de la muestra son identificadas colectivamente y contadas sometiendo una fracción de la muestra a técnicas convencionales APR, resultando en un primer valor de conteo FC. Este primer conteo FC representa el conteo total de partículas de todas las partículas del grupo seleccionado presentes en la muestra (por ejemplo, conteo total de glóbulos rojos y glóbulos blancos en la muestra). En esta etapa, no hay necesidad de intentar la diferenciación entre los diferentes tipos de partículas del grupo seleccionado de partículas (por ejemplo, no hay necesidad de intentar separar los conteos de RBC y de WBC en este momento).

En la etapa 2, se trata una fracción de la muestra de manera que se altera un subgrupo de uno o varios tipos de partículas del grupo seleccionado de partículas (por ejemplo, se cambian, desintegran, destruyen, o se retiran de otro modo de la muestra), de manera que la técnica APR utilizada para identificar el grupo de partículas seleccionadas ya no reconoce ni cuenta el subgrupo de partículas. En el caso de una muestra con RBC y WBC, la muestra es tratada con un agente de lisado, que destruye los RBC de la muestra, dejando solamente los WBC del grupo seleccionado de partículas. La técnica APR para el conteo colectivamente de RBC y WBC ya no reconoce ni cuenta las RBC destruidas.

En la etapa 3, se lleva a cabo un segundo conteo en la fracción de muestra tratada utilizando técnicas APR convencionales para identificar y contar las partículas en el grupo seleccionado de partículas restantes en la muestra tratada (por ejemplo, las WBC), resultando en un segundo valor de conteo SC. Este segundo conteo SC representa el conteo total de partículas de solamente aquellas partículas del grupo original seleccionado de partículas que permanecen en la muestra después de la etapa 2 de tratamiento (por ejemplo, conteo total de solamente las WBC de la muestra). En el caso de un grupo seleccionado de RBC y WBC, no hay RBC que queden en la muestra que pudieran ser erróneamente identificadas como WBC y ser incluidas en el conteo de estas últimas. De este modo, el segundo conteo SC representa de manera más precisa el conteo real de WBC en la muestra original. En muchos casos este conteo WBC es mucho más preciso que las técnicas APR que intentan distinguir estos dos tipos de partículas existentes conjuntamente en la muestra analizada.

En la etapa 4, el segundo conteo SC se sustrae del primer conteo FC, resultando en un conteo DC de diferenciación que representa de manera exacta el conteo de partículas que fueron alteradas en la muestra por la etapa 2. En el caso de un grupo seleccionado de RBC y WBC, el conteo de diferenciación DC representa de manera precisa el conteo de RBC en la muestra original.

La técnica anterior de contar de manera colectiva un grupo de partículas seleccionadas tratando la muestra para alterar un subgrupo de estas partículas, contando las partículas restantes del grupo de partículas seleccionado, y sustrayendo los dos resultados de conteo proporciona conteos de partículas mucho más exactos tanto para las partículas alteradas por tratamiento de la muestra como también para las partículas que permanecieron en la muestra después del tratamiento de la misma. Además, las técnicas APR utilizadas necesitan solamente ser capaces de identificar y contar exactamente y colectivamente partículas en un grupo de partículas seleccionadas, sin

tener que utilizar técnicas que intentan distinguir partículas dentro del grupo de partículas seleccionadas. En el caso de una muestra con RBC y WBC, un conteo preciso de estos dos tipos de partículas se puede llevar a cabo sin utilizar ninguna técnica APR que intente distinguir entre estos dos tipos de partículas que coexisten en la muestra. En realidad, el mismo proceso APR puede ser utilizado en ambas etapas 1 y 3, ninguna de las cuales requiere distinguir entre glóbulos rojos o glóbulos blancos. Por lo tanto, el método antes mencionado es ideal para distinguir y contar partículas que son más fácilmente diferenciadas por tratamiento de muestra que por técnicas de identificación APR.

El procedimiento anterior se ha descrito con respecto a un grupo seleccionado de partículas que tienen dos miembros: RBC y WBC. No obstante, otras partículas difíciles de distinguir pueden ser clasificadas y contadas de manera similar. Además, no solamente pueden variar los tipos de partículas asimismo en cuanto al número de tipos de partículas en el grupo seleccionado, sino que el número de etapas de conteo y de tratamiento puede variar para proporcionar información adicional con respecto a muestras más complejas. Por ejemplo, si el grupo seleccionado de partículas tiene 5 miembros, podrían haber múltiples etapas de tratamiento (por ejemplo, etapa 2) afectando a diferentes miembros de partículas de forma diferente, seguido de etapas múltiples de identificación/conteo (por ejemplo, etapa 3). Además, se pueden utilizar diferentes fracciones de la misma muestra original para diferentes etapas del procedimiento (por ejemplo, fracción de muestra utilizada para las etapas 2 y 3 distinta de la fracción de muestra utilizada para la etapa 1), o la misma fracción se puede utilizar repetidamente para múltiples etapas (por ejemplo, fracción de muestra utilizada para etapas 2 y 3 igual que la fracción utilizada para etapa 1).

La figura 3 muestra una realización alternativa del procedimiento anteriormente descrito, de manera que el segundo conteo SC puede ser modificado teniendo en cuenta el efecto que la etapa de tratamiento tiene sobre la muestra. Utilizando el ejemplo de RBC y WBC, puede ocurrir para algunas muestras que el agente de lisado utilizado para destruir las RBC cause daños o altere de alguna manera algunas de las WBC, provocando de esta manera un subconteo de las WBC en la etapa 3 de la figura 2. Para solucionar esta situación, la etapa 3A se añade al proceso de la figura 2, tal como se ha mostrado en la figura 3. La etapa 3A comporta el examen de la forma en la que el tratamiento de la muestra afecta a las partículas destinadas a permanecer en la muestra después de tratamiento, y ajustando de acuerdo con ello el segundo conteo SC en el caso de una muestra con RBC y WBC. La etapa 3A comportaría el análisis de la muestra tanto antes como después del tratamiento de lisado de la etapa 2, y la cuantificación de cuántas WBC se han comprometido hasta el punto de que la técnica de conteo APR de la etapa 3 no identificaría de manera apropiada ni las contaría como presentes. La etapa 3A terminaría entonces añadiendo este valor (de las WBC comprometidas) al segundo valor de conteo SC. El análisis de la etapa 3 puede ser llevado a cabo manualmente por un operador y/o por otras técnicas una vez, siendo extrapolado a todas las otras muestras del mismo tipo que serían afectadas igualmente por el tratamiento involucrado.

Si bien se han descrito realizaciones en detalle en lo anterior, se debe comprender claramente que muchas variaciones y/o modificaciones de los conceptos básicos de la invención que se han indicado, se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, las técnicas APR de las etapas 1 y 3 de la figura 1 pueden ser idénticas, o pueden ser diferentes. Adicionalmente, la muestra no es necesario que sea siempre, o nunca, necesariamente en forma de fluido.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el análisis de una muestra que contiene partículas, que comprende:
  - 5 determinar un primer conteo selectivo de un grupo seleccionado de partículas de la muestra;  
tratamiento como mínimo de una parte de la muestra para alterar un subgrupo del grupo seleccionado de partículas:  
determinar un segundo conteo colectivo de cualquiera del grupo de partículas seleccionado en la parte tratada de la muestra; y
  - 10 restar el segundo conteo colectivo del primer conteo colectivo para determinar un conteo de diferenciación para el subgrupo de partículas alterado por el tratamiento de la muestra,  
caracterizado por
  - 15 la determinación de efectos del tratamiento de la muestra sobre partículas del grupo seleccionado de partículas distinto del subgrupo del grupo seleccionado de partículas; y por ajustar el segundo conteo colectivo para compensar el efecto determinado de tratamiento de la muestra.
- 20 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la determinación del primer conteo colectivo comprende:  
crear primeras imágenes electrónicas de la muestra; e  
identificar colectivamente y contar imágenes del grupo seleccionado de partículas en las primeras imágenes electrónicas.
- 25 3. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que la determinación del segundo conteo colectivo comprende:  
la creación de segundas imágenes electrónicas de la parte tratada de la muestra; e  
30 identificar colectivamente y contar imágenes de cualquiera del grupo seleccionado de partículas en las segundas imágenes electrónicas.
4. Procedimiento, según la reivindicación 3, en el que la determinación del primer conteo colectivo comprende además:  
35 hacer pasar como mínimo una parte de la muestra a través de una célula de flujo (10); y  
captar imágenes de la muestra en la célula de flujo (10) utilizando una cámara (14).
- 40 5. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que la determinación del segundo conteo colectivo comprende además:  
hacer pasar la parte tratada de la muestra a través de la célula de flujo (10); y captar imágenes de la parte tratada de la muestra en la célula de flujo (10) utilizando la cámara (14).
- 45 6. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que:  
el grupo seleccionado de partículas comprende glóbulos rojos y glóbulos blancos de la sangre: y  
50 el subgrupo del grupo seleccionado de partículas comprende glóbulos rojos de la sangre.
7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que el tratamiento de como mínimo una parte de la muestra comprende el tratamiento de la muestra con un agente de lisado.
- 55 8. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que la muestra es fluido vertebral.
9. Dispositivo para el análisis de una muestra que contiene partículas, que comprende:  
60 un dispositivo de toma de imágenes (2) para la captación de imágenes de partes tratadas y no tratadas de una muestra y creación de imágenes electrónicas a partir de las imágenes captadas, en el que un subgrupo de un grupo seleccionado de partículas de la muestra es alterado en la parte tratada de la muestra; un procesador adaptado para:  
65 determinar un primer conteo colectivo del grupo seleccionado de partículas en la parte no tratada de la muestra,

determinar un segundo conteo colectivo de cualquiera del grupo seleccionado de partículas en la parte tratada de la muestra.

5 y restar el segundo conteo colectivo del primer conteo colectivo para determinar un conteo de diferenciación para el subgrupo de partículas alterado en la parte tratada de la muestra,

10 caracterizado porque el procesador está adaptado también para determinar efectos del tratamiento de la muestra sobre partículas del grupo seleccionado de partículas distintas del subgrupo del grupo seleccionado de partículas y para ajustar el segundo conteo colectivo para compensar el efecto determinado del tratamiento de la muestra.

10. Dispositivo, según la reivindicación 9, en el que el dispositivo de toma de imágenes comprende:

una célula de flujo (10) a través de la que puede pasar la muestra; y

15 cámara (14) para captar las imágenes de las partes tratadas y no tratadas de la muestra.

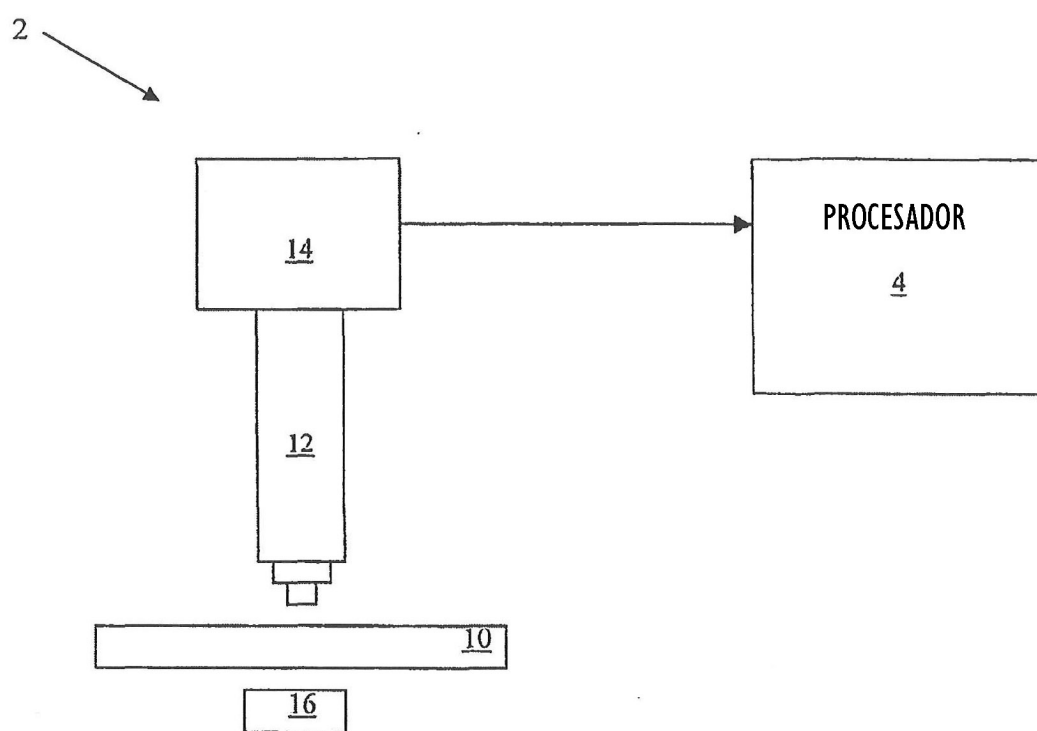


FIG. 1



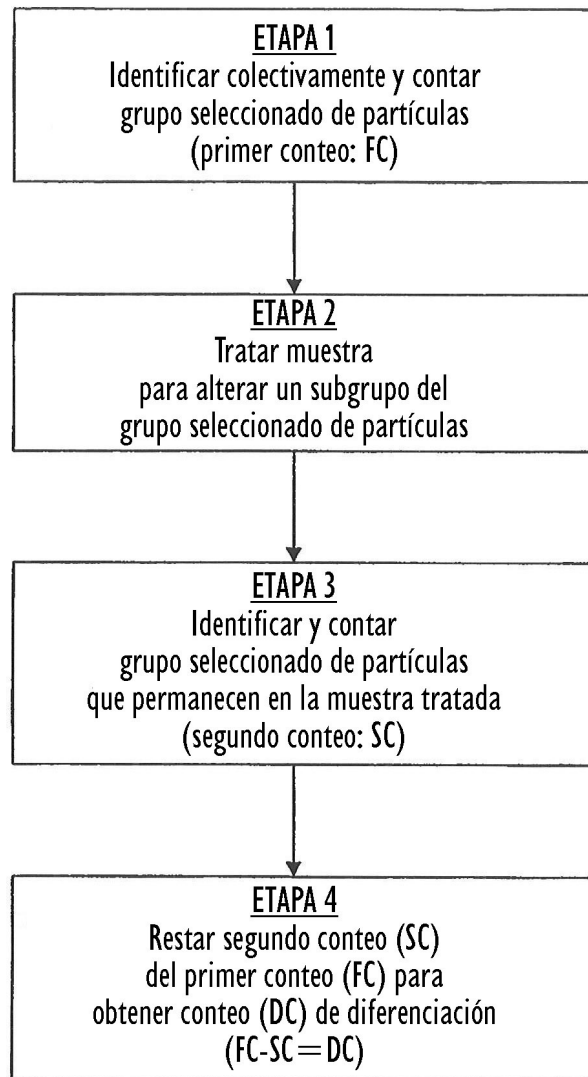


FIGURA 2

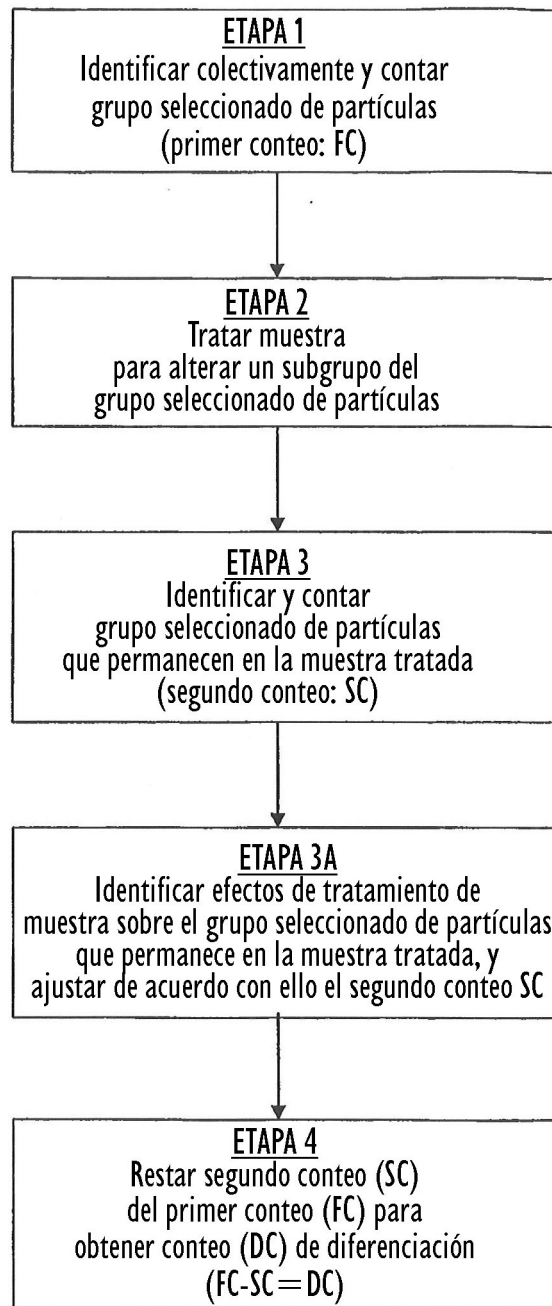


FIGURA 3