

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 841**

51 Int. Cl.:

G01N 33/49 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2010 E 10803550 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 2519820**

54 Título: **Método y aparato para determinar el volumen celular medio de los glóbulos rojos en la sangre**

30 Prioridad:

31.12.2009 US 291441 P

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

20.01.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WANG, ZHIZHOU;
XIE, MIN;
PATIL, ANIL;
CHEN, CHONG;
WANG, SHAOHONG y
MUELLER, CORD**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 438 841 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 y aparato para determinar el volumen celular medio de los glóbulos rojos en la sangre

Antecedentes de la invención

Ámbito técnico

- 5 La presente invención está relacionada con aparatos y métodos para el análisis de muestras de sangre en general, y para la determinación del volumen celular y el volumen celular medio de los glóbulos rojos dentro de una muestra en particular.

Información de antecedentes

- 10 Los médicos, los veterinarios y los científicos examinan los fluidos biológicos de animales y humanos, especialmente la sangre, con el fin de determinar las cantidades de partículas constituyentes, así como para identificar la presencia de partículas inusuales que no se ven en sujetos sanos. Las partículas medidas, cuantificadas e identificadas generalmente incluyen los glóbulos rojos (GR), glóbulos blancos (GB) y plaquetas. Los análisis de GR pueden incluir la determinación del número, volumen, tamaño, forma, contenido de hemoglobina y concentración de GR y el hematocrito (también conocido como la fracción de volumen de hematíes).

- 15 Las técnicas conocidas de examen sanguíneo, que se describen con detalle en textos médicos tales como Wintrobe's Clinical Hematology 12th Edition, generalmente dividen los métodos de examen en métodos de tipo manual, centrífugo y de impedancia. Los métodos manuales para la enumeración celular implican típicamente la creación de un volumen determinado con precisión de una muestra de sangre o de líquido que se diluye cuantitativamente y se cuenta visualmente en una cámara de conteo. Los métodos de examen manual incluyen el examen de un frotis periférico en el que las cantidades relativas de los tipos de partículas se determinan mediante una inspección visual. Los métodos centrífugos de examen implican el centrifugado de la muestra, lo que hace que la muestra se separe en las capas constituyentes según la densidad relativa de los constituyentes. Los métodos de impedancia implican el examen de un volumen preciso de sangre que se trata según las partículas que se miden, por ejemplo, lisis de glóbulos rojos para la enumeración de las células nucleadas y dilución volumétrica de la muestra en un fluido conductivo. El proceso típicamente implica la monitorización de la corriente o el voltaje aplicados a la muestra que pasa a través de un paso estrecho para determinar el efecto que tienen las partículas en la tensión/corriente a medida que las partículas pasan a través de una sola fila.

- 20 Todos los susodichos métodos, aparte del frotis periférico o la separación centrífuga, requieren la dispensación de un volumen preciso de la muestra. Las imprecisiones en el volumen de la muestra tienen como resultado errores cuantitativos de la misma magnitud en los análisis asociados. Con la excepción de los métodos centrífugos, todos los susodichos métodos requieren también que la muestra sea mezclada con uno o más agentes reactivos líquidos o diluyentes, y también requieren la calibración del instrumento para obtener resultados precisos. En el caso de frotis periférico, se necesita un alto grado de formación para examinar apropiadamente los frotis. Varios de los susodichos métodos generan un gran volumen de residuos contaminados que es muy costoso de manejar. Un método y aparato conocidos se describen en el documento WO2009/117664.

Compendio de la invención

- 40 Según la presente invención, se proporciona un método y un aparato para determinar el volumen celular de glóbulos rojos en una muestra de sangre. Incluye las etapas de: a) depositar la muestra en una cámara de análisis adaptada para contener de manera quiescente la muestra para el análisis, la cámara está definida por una superficie interior de un primer panel y una superficie interior de un segundo panel, en donde ambos paneles son transparentes, y la cámara tiene una altura conocida o determinable que se extiende entre las superficies interiores de los paneles, dicha altura es de tal manera que por lo menos un glóbulo rojo, sometido a un agente isovolumétrico que da forma de esfera, asume una forma esférica parcialmente comprimida en contacto con las superficies interiores; b) tomar imágenes de por lo menos un glóbulo rojo esférico comprimido parcialmente que contacta con las superficies interiores, y producir señales de imagen; c) determinar el radio del glóbulo rojo esférico parcialmente comprimido que contacta con las superficies interiores a partir de las señales de imagen; y d) determinar el volumen de la imagen de glóbulo rojo utilizando el radio determinado.

- 50 La etapa de toma de imágenes incluye tomar imágenes de una pluralidad de glóbulos rojos esféricos parcialmente comprimidos dentro de la muestra, dichos glóbulos rojos están en contacto con las superficies interiores, y producir señales de imagen que reflejan la densidad óptica de los glóbulos rojos que contactan con las superficies interiores; en donde el método comprende además: determinar un valor umbral de densidad para una zona predeterminada que rodea a cada uno de los glóbulos rojos en imágenes, y seleccionar por lo menos algunos de los glóbulos rojos en imágenes que tienen similares valores umbral de densidad; determinar un radio de cada uno de los glóbulos rojos seleccionados que tienen valores umbral sustancialmente similares de densidad a partir de la imagen; determinar el volumen de cada uno de los glóbulos rojos seleccionados con su respectivo radio determinado; y determinar un volumen medio de glóbulos rojos utilizando los volúmenes determinados de los glóbulos rojos seleccionados.

Según la presente invención, se proporciona un aparato para determinar el volumen celular de por lo menos un glóbulo rojo dentro de una muestra de sangre sustancialmente sin diluir. El aparato incluye una cámara de análisis, una unidad de toma de imágenes y un analizador programable. La cámara de análisis se adapta para contener de manera quiescente la muestra para el análisis. La cámara se define por una superficie interior de un primer panel y una superficie interior de un segundo panel. Ambos paneles son transparentes. La cámara tiene una altura conocida o determinable que se extiende entre las superficies interiores de los paneles. La altura es de tal manera que por lo menos un glóbulo rojo dentro de la muestra asumirá una forma esférica parcialmente comprimida. La unidad de toma de imágenes incluye un iluminador y un disector de imagen. La unidad puede funcionar para tomar imágenes del por lo menos un glóbulo rojo que contacta con las superficies interiores y produce señales de imagen representativas de esas imágenes de glóbulos rojos. El analizador programable está adaptado para determinar, utilizando las señales de imagen, un radio del glóbulo rojo esférico comprimido parcialmente que está en contacto con las superficies interiores a partir de las señales de imagen. El analizador está adaptado además para determinar el volumen del glóbulo rojo en imagen utilizando el radio determinado.

El presente método y aparato, y las ventajas asociados con los mismos, se hace más evidente a la vista de la descripción detallada que se proporciona a continuación, incluidos los dibujos acompañantes.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una representación esquemática en sección transversal de una cámara de análisis.

La FIG. 2 es una vista ampliada de una parte de la cámara de análisis mostrada en la FIG. 1.

La FIG. 3 es un diagrama esquemático de un dispositivo de análisis que se puede utilizar con el método actual.

La FIG. 4A es una representación geométrica lateral de un GR comprimido dentro de una cámara de análisis.

La FIG. 4B es una representación geométrica superior del GR mostrado en la FIG. 4A.

La FIG. 5 es una imagen de varios GR isovolumétricamente esféricos dispuestos dentro de una muestra.

La FIG. 6A es un gráfico de densidad óptica frente a distancia de la imagen de los glóbulos rojos que se muestran en la FIG. 6B.

La FIG. 6B es una imagen de un par de GR isovolumétricamente esféricos dispuestos dentro de una muestra.

La FIG. 7A es un gráfico de densidad óptica frente a distancia de la imagen de los glóbulos rojos que se muestran en la FIG. 7B.

La FIG. 7B es una imagen de un par de GR isovolumétricamente esféricos dispuestos dentro de una muestra.

La FIG. 8 A es un gráfico de densidad óptica frente a distancia de la imagen de los glóbulos rojos que se muestran en la FIG. 8B.

La FIG. 8B es una imagen de un par de GR isovolumétricamente esféricos dispuestos dentro de una muestra.

Descripción detallada de realizaciones de la invención

El presente método y aparato para analizar una muestra de sangre entera sustancialmente sin diluir permite la determinación de un volumen de glóbulos rojos (GR) dentro de la muestra, y la determinación del volumen celular medio (VMC) dentro de la muestra, sin la adición de diluyentes, colorantes o agentes reactivos, aparte de uno o más anticoagulantes y uno o más agentes isovolumétricos que dan forma de esfera.

El presente método utiliza una cámara de análisis que puede funcionar para mantener de manera quiescente una muestra de sangre entera anticoagulada sustancialmente sin diluir para su análisis. La cámara tiene típicamente un tamaño para contener aproximadamente de 0,2 a 1,0 μ l de muestra, pero la cámara no se limita a una capacidad volumétrica en particular. La frase "sustancialmente sin diluir", tal como se emplea en esta memoria, describe una muestra de sangre que no se diluye en absoluto o no ha sido diluida para esa finalidad, pero incluye algunos reactivos para efectos del análisis. Si la adición del reactivo diluye la muestra, tal dilución no tiene impacto clínico significativo en el análisis realizado. Típicamente, los únicos reactivos utilizados para realizar el método actual son anticoagulantes (p. ej., EDTA, heparina) y un agente isovolumétrico que da forma de esfera (por ej., un detergente de zwitterión o reactivo de funcionamiento similar). Estos reactivos se añaden generalmente en forma seca. En determinadas circunstancias (p. ej., análisis muy rápidos), es posible que no sea necesario agregar el agente anticoagulante, pero es preferible hacerlo en la mayoría de los casos para asegurar que la muestra está en forma aceptable para el análisis. El término "quiescente" describe que cuando la muestra se deposita dentro de la cámara para el análisis, la muestra no se mueve deliberadamente con respecto a la cámara durante el análisis, es decir, la muestra reside de manera quiescente dentro de la cámara. En la medida que hay movimiento dentro de la muestra

de sangre, predominantemente debido al movimiento Browniano de los constituyentes formados dentro de la muestra, dicho movimiento no inhabilita el uso del dispositivo de la esta invención.

Haciendo referencia ahora a las FIGS. 1-2, la cámara de análisis 10 está definida por un primer panel 12 que tiene una superficie interior 14, y un segundo panel 16 que tiene una superficie interior 18. Los paneles 12, 16 son suficientemente transparentes para permitir la transmisión de la luz a longitudes de onda predeterminadas a través en una cantidad suficiente para realizar el análisis de densidad óptica descrito a continuación. Por lo menos una parte de los paneles 12, 16 se encuentran paralelos entre sí y dentro de esa parte las superficies interiores 14, 18 están separadas entre sí una altura 20, de tal manera que por lo menos algunos GR individuales 22 dentro de una muestra contactan individualmente con ambas superficies interiores 14, 18, y una o más zonas vacías de GR (p. ej., lagunas) 24 dentro de la muestra quiescente se extienden entre las superficies interiores. El presente método puede utilizar una variedad de diferentes tipos de cámaras de análisis que tienen las susodichas características, y por lo tanto no se limita a un tipo particular de cámara de análisis. Una cámara de análisis que tiene unos paneles paralelos 12, 16 simplifica el análisis y, por lo tanto, es preferible, pero no es necesario para la presente invención; p. ej., se podría utilizar una cámara que tiene un panel dispuesto con un ángulo conocido no paralelo con respecto al otro panel. En realizaciones preferidas, la cámara incluye por lo menos tres separadores 26 dispuestos entre los paneles 12 y 16. Los separadores 26 pueden ser cualquier estructura que se pueda disponer entre los paneles 12, 16, que funciona para espaciar los paneles 12, 16 entre sí. La dimensión de un separador 26 que se extiende entre los paneles 12, 16 se denominará en esta memoria como la altura del separador 26. Las alturas de los separadores 26 típicamente no son exactamente iguales entre sí (p. ej., tolerancias de fabricación), pero están en una tolerancia comercialmente aceptable para que los medios de separación sean utilizados en aparatos similares de análisis. Unas cuentas esféricas son un ejemplo de un separador aceptable 26, y un ejemplo específico de una cuenta esférica aceptable es una cuenta de poliestireno que está comercialmente disponible, por ejemplo, de Thermo Scientific de Fremont, California, EE.UU., catálogo n°. 4204A, en cuatro micrómetros (4 μm) de diámetro. Una cámara de análisis aceptable se describe con mayor detalle en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n^{os} 2007/0243117, 2007/0087442.

Una altura aceptable de cámara se define como la que por lo menos algunos de los GR dentro de la muestra contactan individualmente con ambas superficies interiores de los paneles de la cámara. Una altura de cámara de aproximadamente dos a seis micrómetros (2-6 μm) es aceptable para GR individuales para la mayoría de las especies animales en tamaños típicos de GR y el hecho de que los GR se puedan deformar en cierto grado (p. ej., la esfera parcialmente comprimida mencionada más arriba).

Un agente isovolumétrico que da forma de esfera (p. ej., un detergente zwitterionico o reactivo de funcionamiento similar) se mezcla con por lo menos una parte de la muestra para hacer que por lo menos algunos de los GR asuman una geometría esférica. Los GR 22, en su forma natural a menudo tienen forma de discos bioconcavos en lugar de forma esférica. Como resultado, en ausencia del efecto del agente isovolumétrico que da forma de esfera, un gran porcentaje de los GR con forma de disco 22 no contactan con ambos paneles 12, 16 de la cámara. El aumento del número de GR 22 que tienen una geometría substancialmente esférica aumentará el número de GR 22 en contacto con ambos paneles 12, 16, incluidas algunas células 42 que están restringidas por los paneles de la cámara, pero de otro modo serán esféricas. El término "esférico" tal como se emplea en esta memoria se refiere a la geometría de un GR que ha sido sometido a una cantidad adecuada de agente isovolumétrico que da forma de esfera. Tal como indica el nombre, el agente "isovolumétrico" que da forma de esfera provoca que el GR se expanda hacia fuera en todas las direcciones, asumiendo de ese modo una forma substancialmente esférica. En algunos casos, la estructura del GR no permitirá que el GR asuma una forma esférica perfecta cuando se le somete al agente. A efectos de describir la presente invención, el término "esférico" tal como se emplea en esta memoria incluye aquellas formas que son perfectamente esféricas y también aquellas formas que son sustancialmente esféricas como resultado del agente que da forma de esfera.

Haciendo referencia a la FIG. 3, el análisis de la muestra dispuesta de manera quiescente en la cámara 10 se realiza utilizando un dispositivo de análisis 44 que puede funcionar para tomar imágenes de por lo menos una parte de la muestra y realizar un análisis de la imagen. La imagen se produce de una manera que permita determinar la densidad óptica de la muestra de manera unitaria. El término "por unidad" o "unidad de imagen" significa una unidad definida de manera gradual en la que se puede diseccionar la imagen de la muestra. Un píxel que se define generalmente como el elemento más pequeño de una imagen que se puede procesar individualmente dentro de un sistema particular de toma de imágenes es un ejemplo de una unidad de imagen, y una unidad imagen también puede incluir un pequeño número de píxeles de una unidad colectora. La ampliación de un dispositivo de toma de imágenes también puede describirse en términos lineales (p. ej., micrómetros por píxel en el plano focal), en el que la dimensión lineal es a lo largo de un eje particular de una cuadrícula ortogonal aplicada a la imagen. El área real de la muestra captada por los píxeles (o en otras unidades de imagen) del sensor en el plano focal es, por lo tanto, una función del factor de ampliación aplicado por el dispositivo de toma de imágenes. Por tanto, la ampliación del dispositivo de toma de imágenes debe conocerse o ser determinable. El volumen asociado a un píxel es por lo tanto el área de la imagen por píxel el número de veces la altura conocida de cámara, ya que el punto de la cámara que se ha detectado es uno en el que el GR se extiende por toda la cámara. Si la ampliación fue de 0,5 micrómetros por píxel, por ejemplo, una imagen que ocupa 200 píxeles tendría un área de 50 micrómetros cuadrados y un volumen de 50 micrómetros cuadrados el número de veces la altura de cámara. La densidad óptica ("DO") es una medida de

la cantidad de luz absorbida con relación a la cantidad de luz transmitida a través de un medio; por ejemplo, cuanto más alto es el valor de "DO" mayor es la cantidad de luz absorbida durante la transmisión. DO se puede describir cuantitativamente en unidades de densidad óptica ("DO") o en fracciones de la misma.

El dispositivo de análisis 44 incluye un iluminador 46 de muestras, un disector 48 de imagen y un analizador programable 50. El iluminador 46 de muestras incluye una fuente de luz que produce luz selectivamente en todo un espectro de longitudes de onda suficientemente amplio como para ser útil para un análisis de volumen celular de GR (p. ej., aproximadamente 400 - 670 nm; la luz a aproximadamente 413 nm y 540 nm es particularmente efectiva para la determinación de la densidad óptica de los GR), y típicamente incluye una óptica para manipular la luz. El iluminador 46 de muestras utiliza la transmitancia para producir una imagen. Las propiedades de transmisión de luz de la muestra se pueden medir, por ejemplo, colocando una fuente de luz en un lado de la muestra que reside dentro de la cámara 10, dirigir la luz a través de la muestra dispuesta de manera quiescente entre los paneles de la cámara, y a partir de ese momento capturar la luz utilizando el disector de imagen. Un ejemplo de un disector aceptable 48 de imagen es un sensor de imagen de tipo dispositivo de carga acoplada (CCD, *charge couple device*) que convierte una imagen de la luz que pasa a través de la muestra en un formato electrónico de datos. Los sensores de imagen de tipo semiconductor complementario de óxido metálico ("CMOS", *complementary metal oxide semiconductor*) son otro ejemplo de sensor de imagen que se puede utilizar. Sin embargo, la presente invención no se limita a ninguno de estos ejemplos. El analizador programable 50 incluye una unidad de procesamiento central (CPU) y se conecta al iluminador 46 de muestras y al disector 48 de imagen. La CPU está adaptada (p. ej., se programa) para realizar de forma selectiva las funciones necesarias para llevar a cabo el presente método. Cabe señalar que la funcionalidad del analizador programable 50 puede implementarse utilizando hardware, software, firmware o una combinación de los mismos. Un experto en la técnica sería capaz de programar la unidad de procesamiento para llevar a cabo la funcionalidad descrita en esta memoria sin experimentación indebida. La patente de EE.UU. n° 6.866.823 titulada "Apparatus for Analyzing Biologic Fluids" y publicada el 15 de agosto de 2005, describe un dispositivo de análisis que podría ser programado para ser utilizado con la presente invención.

El dispositivo de análisis 44 está adaptado para determinar un valor de DO asociado con la señal de luz detectada, dicho valor de DO se determina según una unidad de imagen para una parte en imagen de la muestra. El DO de un GR 22 es determinado por la concentración de hemoglobina dentro de la célula, el coeficiente de extinción molar (también se conoce como absortividad molar) para la hemoglobina a una determinada longitud de onda, y la distancia de la trayectoria de la luz recorrida a través de la hemoglobina y puede ser representado por la siguiente relación:

$$DO = \epsilon cL \quad \text{Ec. 1}$$

donde ϵ = coeficiente de extinción molar de la hemoglobina, c = concentración de hemoglobina, y L = distancia recorrida a través del GR 22 (es decir, la distancia recorrida a través de la hemoglobina dispuesta dentro de la célula). El coeficiente de extinción molar es una propiedad intrínseca de la hemoglobina que se puede derivar por experimentación, o mediante datos empíricos disponibles en la actualidad. En unas realizaciones del dispositivo de análisis que utilizan fuentes de luz que tienen un margen de error (por ejemplo, un LED que tiene un diseño de longitud de onda nominal, más o menos alguna cantidad), es de utilidad, para fines de precisión, calibrar inicialmente el dispositivo y determinar el coeficiente de extinción molar de la hemoglobina, dicho coeficiente se puede usar luego con ese dispositivo en particular hasta que se sustituye la fuente de luz, y en ese momento el dispositivo se puede recalibrar,

Los GR 22 que entran en contacto con las superficies interiores de la cámara 10 tienen un perfil de DO similar al de una esfera parcialmente comprimida (véase las FIGS. 2 y 4A-4B). Una esfera parcialmente comprimida puede ser modelizada geoméricamente como se muestra en la FIG. 4A en el plano X-Z y en la FIG. 4B en el plano X-Y, incluida una parte interior de cilindro 25 que tiene un radio de r_1 y una parte exterior de envoltura 27 que tiene un radio r_2 . La parte de eje X de r_2 (es decir, r') varía como una función de la posición del eje Z. La parte r' del eje X se extiende desde la superficie exterior de la parte interior de cilindro 25 hacia la superficie exterior de la parte exterior

de envoltura 27 y se puede expresar como una función de Z y r_2 : $r' = \sqrt{r_2^2 - z^2}$, que se deriva de una ecuación de círculo ($x^2 + z^2 = r^2$; o en términos de las variables actuales: $r'^2 + z^2 = r_2^2$). En su máximo, $r' = r_2$ es igual a la mitad de la altura 20 de cámara. En términos de distancia a lo largo del eje X, la distancia desde el centro de la parte interior de cilindro 25 a la superficie exterior de la parte exterior de envoltura 27 en una determinada posición del eje Z puede describirse como "r", donde "r" es:

$$r = r_1 + \sqrt{r_2^2 - z^2} \quad \text{Ec. 2}$$

El volumen de la esfera parcialmente comprimida (Vol_{GR} , en inglés Vol_{RBC}) se podrá determinar entonces mediante la integración del área sobre el eje Z:

$$Vol_{RBC} = \int_{-r_2}^{r_2} \pi \left(r_1 + \sqrt{r_2^2 - z^2} \right)^2 dz \quad \text{Ec. 3}$$

$$Vol_{RBC} = \pi \left(\frac{4r_2^3}{3} + 2r_1^2 r_2 + \pi r_1 r_2^2 \right) \quad \text{Ec. 4}$$

5 Según un aspecto de la presente invención, por lo tanto, se utiliza una metodología en donde (por ejemplo, un procesador se adapta de tal manera que) se supone un modelo geométrico para los GR esféricos parcialmente comprimidos en contacto con las superficies interiores de la cámara.

10 En la mayoría de los casos, el perímetro de un GR en imagen de densidad óptica parece bastante "borroso" porque el "grosor" del GR (p. ej., la distancia a lo largo del eje Z; y, por lo tanto la cantidad de hemoglobina) disminuye cerca de la orilla del GR. En algunos casos, el perímetro de un GR en imagen puede ser oscurecido aún más debido a factores como la influencia de otros GR en estrecha proximidad, y fluctuaciones del fondo. De hecho, en la mayoría de los análisis de una muestra quiescente sustancialmente sin diluir toda la sangre (1 µl de ella típicamente contiene aproximadamente 4,5 x 10⁶ GR), un considerable número de los GR dentro de la cámara de análisis están próximos entre sí. La imagen mostrada en la FIG. 5, que muestra los GR 22 sometidos a un agente isovolumétrico que da forma de esfera, ilustra una imagen típica de una muestra de sangre entera quiescente substancialmente sin diluir dispuesta dentro de una cámara, que muestra claramente muchos de los GR 22 en estrecha proximidad entre sí.

15 El gráfico de densidad óptica versus la distancia como se muestra en la FIG. 6A, por ejemplo, se basa en la imagen de dos GR 22 como se muestra en la FIG. 6B. El gráfico y la imagen muestran dos GR que están suficientemente separados entre sí y de los que se tomaron imágenes con bajo nivel de ruido de fondo. Como resultado, cada GR 22 se distingue fácilmente de los demás y las características de tamaño de cada uno son comprobables. El gráfico mostrado en la FIG. 7A (basada en la imagen mostrada en la FIG. 7B), por el contrario, muestra que la densidad óptica en la región entre los GR 22 es atribuible menos claramente a cualquier GR 22. Esta característica "borrosa" de la densidad óptica es probablemente el resultado del hecho de que los GR 22 están un poco más juntos. El gráfico mostrado en la FIG. 8A (basada en la imagen de la FIG. 8B), ilustra un ejemplo en el que la densidad óptica en la región entre los GR 22 es atribuible incluso menos claramente a cualquier GR 22. En esos casos en los que el perímetro exterior de un GR 22 no se pueda determinar con facilidad a partir de una imagen del GR, es difícil determinar con precisión el volumen (y/u otros parámetros evaluativos) de ese GR particular debido a la interferencia. Un perímetro "borroso" puede ser abordado mediante la evaluación sólo de los GR que están suficientemente separados de otros GR (es decir, GR "independientes"). La distribución típica de los GR en una muestra sin diluir (véase la FIG. 5), sin embargo, dificulta la evaluación solo de los GR independientes. La presente invención proporciona técnicas para abordar los GR en estrecha proximidad entre sí.

20 Según un aspecto de la presente invención, los GR en estrecha proximidad entre sí se pueden evaluar mediante técnicas de segmentación (u otras técnicas de filtrado) en donde en la imagen sólo se proporcionan los píxeles que tienen un valor de densidad óptica en o por encima de un cierto umbral (o el más alto x% de píxeles de densidad óptica). Limitar la imagen a los píxeles que están en un umbral de valor de densidad óptica o por encima reducirá el tamaño de la imagen de densidad óptica del GR y eliminará (o minimizará, dependiendo del valor particular usado de DO) las regiones periféricas del GR que probablemente serían influenciadas por los GR adyacentes. Al utilizar los gráficos de densidad óptica mostrados en las FIGS. 6A-8A como ejemplo, un valor de umbral de densidad óptica de aproximadamente 600 unidades (por ejemplo, el 25% superior de la máxima densidad óptica) permite que los GR en las imágenes se distingan entre sí. El valor de umbral de densidad óptica que permite determinaciones de volumen de GR con suficiente precisión puede elegirse arbitrariamente para la aplicación de que se trate y la presente invención no se limita a un valor en particular. El volumen real de un GR puede ser determinado posteriormente como una función de la cantidad de área cubierta por los píxeles en el umbral de densidad óptica o por encima.

25 La relación entre el área cubierta por los píxeles en el umbral de densidad óptica o por encima (es decir, el "imagen umbral") y el volumen real del GR puede expresarse de varias formas diferentes. Por ejemplo, como se describe más arriba, se puede asignar el modelo al GR y la diferencia de volumen entre una imagen umbral de un GR y su volumen real se puede determinar sobre la base de un supuesto modelo geométrico; p. ej., el radio de la imagen umbral se puede suponer que es $r = r_1 + \alpha r_2$, donde "α" es un valor porcentual conocido entre cero y uno asociado con el tamaño de la imagen umbral. El volumen real del GR se determina utilizando $r = r_1 + r_2$, que se puede utilizar posteriormente en la Ecs. 2-4. Como alternativa, la relación entre el área cubierta por los píxeles en el valor de umbral o por encima y el volumen real del GR se puede basar en datos empíricos clínicamente significativos (p. ej., en forma de tabla) que proporcionan un alto grado de fiabilidad; por ejemplo, una tabla que relaciona los valores umbral de radio de densidad óptica del GR con valores realmente medios de volumen de GR estadísticamente precisos.

30 En la imagen de una muestra tal como la que se muestra en la FIG. 5, hay un amplio intervalo de distancias de separación entre los GR adyacentes; por ejemplo, la separación entre los GR es aleatoria. Como se ha indicado

5 anteriormente, los valores de densidad óptica de los píxeles asociados con un GR en particular están influenciados por los GR adyacentes y la cantidad de esa influencia es una función de la distancia de separación entre el GR particular y los GR adyacentes. A efectos de precisión y para aumentar la uniformidad, es útil analizar los GR que se encuentran situados similarmente con respecto a los GR de alrededor. Una técnica para seleccionar GR situados similarmente consiste en seleccionar un área que rodea a un GR y evaluar los valores de densidad óptica por píxel en esa zona. El número de píxeles que tienen un valor de densidad óptica en valor umbral particular o por encima dividido por el número total de píxeles en la zona se puede utilizar como una medida de la densidad de GR que rodean el GR de interés; es decir, un “valor umbral de densidad”:

$$\text{Valor_umbral_de_densidad} = \frac{\#_de_píxeles:con_varor_DO_>_UMBRAL}{\#_total_de_píxeles_en_la_zona}$$

10 Los análisis que utilizan valores medios (p. ej., MCV, MCHV, MCH, etc.) se pueden realizar en un número estadísticamente significativo de GR dispuestos en las zonas que tienen valores umbral de densidad dentro de un intervalo aceptable, por ejemplo, GR situados similarmente. La metodología descrita para GR seleccionados situados similarmente es un ejemplo de una metodología aceptable, y la presente invención no se limita a la misma.

Una vez que se eligen los GR situados similarmente, se pueden realizar los análisis para el parámetro deseado (p. ej., CV, CHC, etc.) en cada GR elegido.

15 La precisión de la zona medida de un GR también puede verse afectada por el sistema de lentes del dispositivo de análisis. Algunos sistemas de lentes realizan la circunvolución de una función de dispersión de puntos (“PSF”, *point spread function*) con el perfil de GR. En estos sistemas, la imagen resultante puede emborronarse y ser ampliada artificialmente. Para corregir el error asociado con la función de dispersión de puntos, se puede deshacer la circunvolución de la PSF y la imagen se puede hacer más nítida. Como alternativa, el área a una altura determinada en el eje Z de un objeto con una geometría conocida puede determinarse a partir de una imagen de densidad óptica. La zona determinada se puede comparar entonces con la zona conocida del objeto a la misma altura en el eje Z y los valores se comparan para calibrar el dispositivo de análisis. Por ejemplo, la zona de la cuenta esférica de diámetro conocido se puede medir a una altura particular dentro de la cámara a partir de la imagen. La zona medida se puede comparar luego con la zona conocida de la cuenta en la altura del eje Z para evaluar la precisión de la zona medida. Si es necesario, el aparato puede calibrarse para reducir la diferencia entre la zona medida y la teórica y, de ese modo, aumentar la precisión de la determinación de la zona (y el volumen).

20 Para determinar el volumen medio de las células (VMC, en inglés MCV, *mean cell volume*) de los GR en la muestra, el proceso descrito antes se repite para un número estadísticamente significativo de GR dentro de la población de GR de la muestra. Se determina estadísticamente un VMC a partir de los datos recogidos de GR individuales. En algunas realizaciones, la precisión de la determinación de VMC puede ser mejorada basando la determinación en datos de volumen celular determinados a partir de los GR que cumplen criterios previamente definidos en relación con la proximidad de los GR vecinos, el ruido de fondo, etc.; es decir, los GR que están sometidos a menos ruido. Si la muestra contiene un número suficiente de GR que cumplen los criterios, entonces pueden indicarse los restantes GR (es decir, aquellos que pueden ser problemáticos para determinar individualmente el volumen celular por las razones establecidas) y el VMC se puede asignar a esos GR.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar el volumen celular de glóbulos rojos dentro de una muestra de sangre, que comprende las etapas de:
- 5 depositar la muestra en una cámara de análisis (10) adaptada para contener de manera quiescente la muestra para el análisis, la cámara (10), definida por una superficie interior (14) de un primer panel (12) y una superficie interior (18) de un segundo panel (16), en donde ambos paneles son transparentes, y la cámara (10) tiene una altura conocida o determinable que se extiende entre las superficies interiores (14, 18) de los paneles (12, 16), dicha altura es de tal manera que por lo menos un glóbulo rojo (22), sometido a un agente isovolumétrico que da forma de esfera, asume una forma esférica parcialmente comprimida en contacto con las superficies interiores (14, 18);
- 10 tomar imágenes de por lo menos un glóbulo rojo esférico comprimido parcialmente (22) que contacta con las superficies interiores (14, 18), y producir señales de imagen;
- determinar el radio del glóbulo rojo esférico parcialmente comprimido (22) que contacta con las superficies interiores (14, 18) a partir de las señales de imagen; y
- determinar el volumen de la imagen de glóbulo rojo (22) utilizando el radio determinado.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en donde el radio del glóbulo rojo esférico parcialmente comprimido (22) que contacta con las superficies interiores (14, 18) se determina utilizando un procesador adaptado para determinar el radio a partir de las señales de imagen.
3. El método de la reivindicación 2, en donde el radio determinado del glóbulo rojo esférico parcialmente comprimido (22) se basa en una geometría predeterminada.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en donde la geometría predeterminada incluye una parte interior de cilindro (25) en contacto con las superficies interiores y una parte de envoltura exterior (27) que no está en contacto con las superficies interiores (14, 18).
5. El método de la reivindicación 4, en donde el radio determinado del glóbulo rojo esférico parcialmente comprimido (22) incluye una primera parte r_1 que se extiende entre el centro del glóbulo rojo esférico parcialmente comprimido (22) y un límite exterior de la parte interior de cilindro (25), y una segunda parte r_2 que se extiende entre el límite exterior de la parte interior de cilindro (25) y la superficie exterior del glóbulo rojo esférico parcialmente comprimido (22).
- 25 6. El método de la reivindicación 5, en donde la geometría predeterminada del glóbulo rojo esférico comprimido parcialmente (22) comprende la geometría parcial esférica en la parte de envoltura exterior (27).
- 30 7. El método de la reivindicación 2, en donde las señales de imagen reflejan una imagen de densidad óptica del glóbulo rojo esférico parcialmente comprimido (22).
8. El método de la reivindicación 7, en donde la imagen de densidad óptica se forma a partir de imágenes unitarias, cada una tiene un valor de densidad óptica igual o superior a un umbral predeterminado,
9. El método de la reivindicación 8, en donde cada unidad de imagen es un píxel.
- 35 10. El método de la reivindicación 9, en donde el radio determinado del glóbulo rojo esférico comprimido parcialmente (22) se basa en píxeles que tienen un valor de densidad óptica igual o superior al umbral predeterminado.
11. El método de la reivindicación 10, en donde la etapa para determinar el volumen de las imágenes de glóbulos rojos (22) incluye determinar el volumen de los glóbulos rojos en imágenes sobre la base del radio determinado, e incrementar el volumen determinado para que incluya el volumen atribuible a por lo menos una cantidad de una parte de envoltura externa (27) del glóbulo rojo que no está en contacto con las superficies interiores.
- 40 12. El método de la reivindicación 11, en donde el volumen atribuible a una cantidad de la parte exterior de envoltura (27) se basa en un modelo geométrico predeterminado.
13. El método de la reivindicación 11, en donde el volumen atribuible a una cantidad de la parte exterior de envoltura (27) se basa en datos empíricos almacenados en el procesador o accesibles para éste.
- 45 14. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de toma de imágenes incluye tomar imágenes de una pluralidad de glóbulos rojos esféricos parcialmente comprimidos (22) dentro de la muestra, dichos glóbulos rojos están en contacto con las superficies interiores (14, 18), y producir señales de imagen que reflejan la densidad óptica de los glóbulos rojos (22) que contactan con las superficies interiores (14, 18);
- 50 en donde el método comprende además:

- determinar un valor umbral de densidad para una zona predeterminada que rodea a cada uno de los glóbulos rojos (22) en imágenes, y seleccionar por lo menos algunos de los glóbulos rojos (22) en imágenes que tienen similares valores umbral de densidad;
- 5 determinar un radio de cada uno de los glóbulos rojos seleccionados (22) que tienen valores umbral sustancialmente similares de densidad a partir de la imagen;
- determinar el volumen de cada uno de los glóbulos rojos seleccionados (22) con su respectivo radio determinado; y
- determinar un volumen medio de glóbulos rojos utilizando los volúmenes determinados de los glóbulos rojos seleccionados (22).
- 10 15. Un aparato para determinar el volumen celular de por lo menos un glóbulo rojo dentro de una muestra de sangre sustancialmente sin diluir, que comprende:
- 15 una cámara de análisis (10) adaptada para contener de manera quiescente la muestra para el análisis, la cámara (10) está definida por una superficie interior (14) de un primer panel (12) y una superficie interior (18) de un segundo panel (16), en donde ambos paneles (12, 16) son transparentes, y la cámara (10) tiene una altura conocida o determinable que se extiende entre las superficies interiores (14, 18) de los paneles (12, 16), dicha altura es de tal manera que por lo menos un glóbulo rojo (22) dentro de la muestra asume una forma esférica parcialmente comprimida;
- una unidad de toma de imágenes que incluye un iluminador (46) y un disector (48) de imagen, dicha unidad puede funcionar para tomar imágenes del por lo menos un glóbulo rojo (22) que está en contacto con las superficies interiores y producir señales de imagen representativas de tal glóbulo rojo (22) en imagen; y
- 20 un analizador programable (50) adaptado para determinar, utilizando las señales de imagen, un radio del glóbulo rojo esférico comprimido parcialmente (22) que está en contacto con las superficies interiores (14, 18) a partir de las señales de imagen, y un volumen del glóbulo rojo (22) en imagen utilizando el radio determinado.

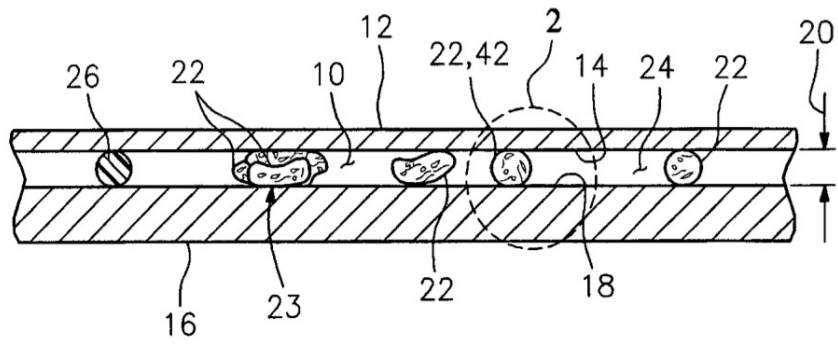


FIG. 1

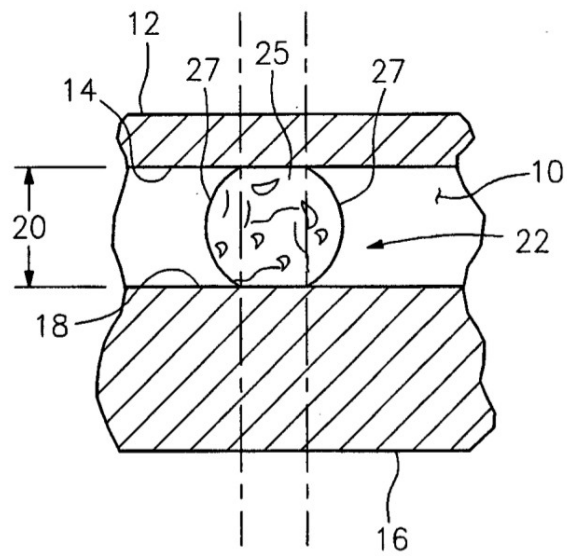


FIG. 2

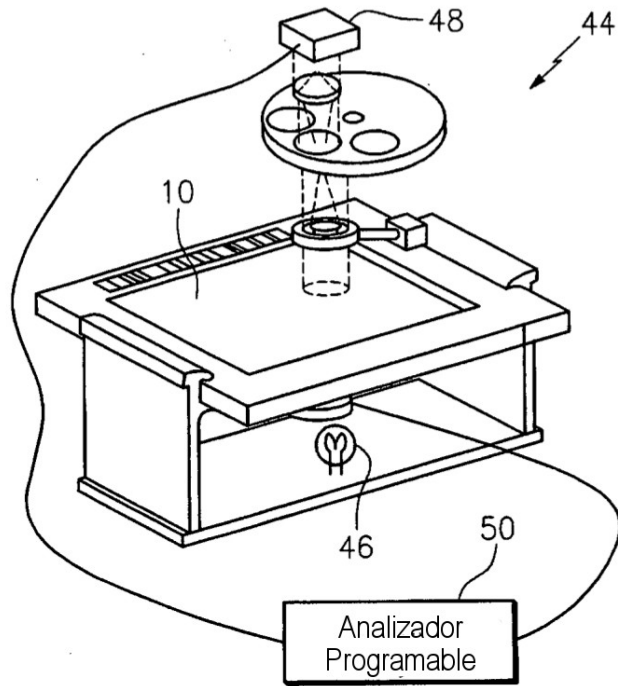


FIG. 3

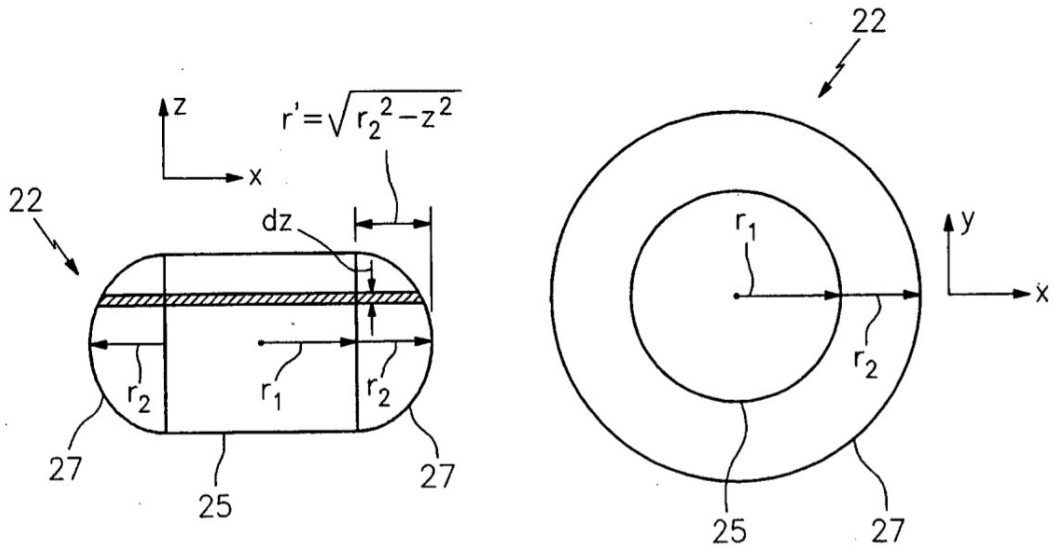


FIG. 4A

FIG. 4B

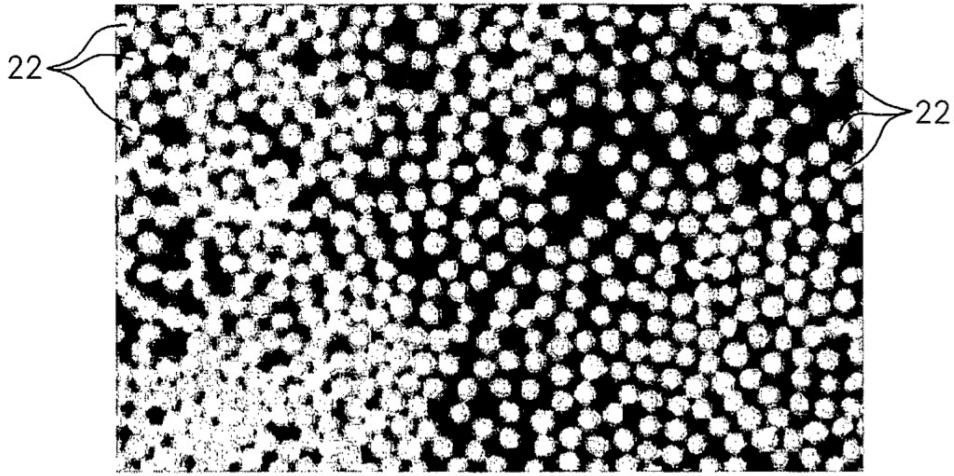


FIG. 5

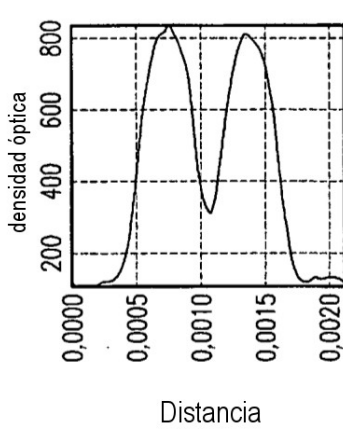


FIG. 6A

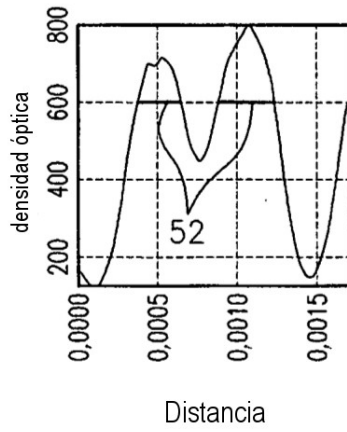


FIG. 7A

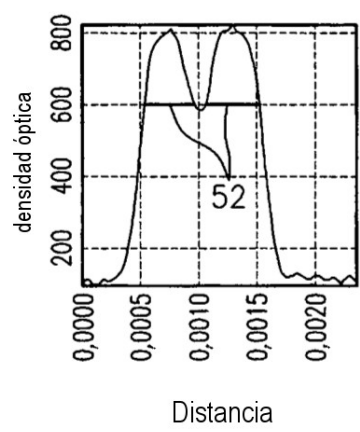


FIG. 8A

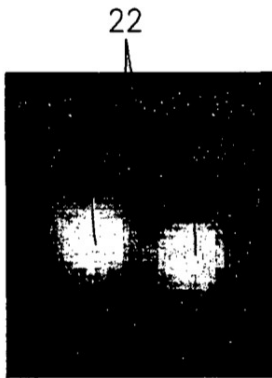


FIG. 6B

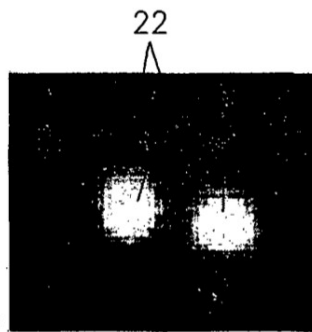


FIG. 7B

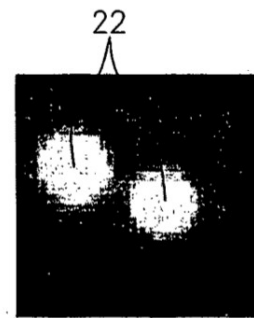


FIG. 8B