

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 947**

51 Int. Cl.:

G01N 33/49 (2006.01)

G01N 15/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2013 E 13169989 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014 EP 2669678**

54 Título: **Procedimiento y sistema de caracterización de una variación de la velocidad de partículas o de una aglomeración de partículas contenidas en un líquido, tales como unas partículas sanguíneas**

30 Prioridad:

01.06.2012 FR 1255115

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

02.12.2014

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (100.0%)
Bâtiment "Le Ponant D" 25, rue Leblanc
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**POHER, VINCENT;
CUBIZOLLES, MYRIAM-LAURE;
POUTEAU, PATRICK;
ALLIER, CÉDRIC y
SPIACZKA, JOHANNA**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 523 947 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 sistema de caracterización de una variación de la velocidad de partículas o de una aglomeración de partículas contenidas en un líquido, tales como unas partículas sanguíneas.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de caracterización de una variación de la velocidad de partículas o de una aglomeración de partículas, estando las partículas, tales como partículas sanguíneas, contenidas en un líquido, comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:

- 10 - la introducción del líquido en una cámara fluidica;
- la iluminación de la cámara fluidica por medio de un haz luminoso de excitación emitido por una fuente luminosa, extendiéndose el haz luminoso a través de la cámara fluidica según una dirección longitudinal;
- 15 - la adquisición de por lo menos dos imágenes por un fotodetector matricial, siendo las imágenes formadas por una radiación transmitida por la cámara fluidica iluminada; y
- el cálculo, a partir de las imágenes adquiridas de por lo menos un indicador que caracteriza la variación de la velocidad o la aglomeración de las partículas.

20 La invención se refiere asimismo a un sistema de caracterización de la variación de la velocidad de las partículas o de la aglomeración de las partículas contenidas en el líquido, tales como las partículas sanguíneas.

25 La invención se refiere en particular al campo del tratamiento de imagen sin lente de focalización del haz luminoso que ilumina la cámara fluidica, con el fin de caracterizar un líquido, tal como la sangre.

30 La invención se aplica en particular a la determinación de un parámetro que se refiere a la coagulación de la sangre, en particular la medición del tiempo de coagulación. Se aplica también a la determinación de un parámetro que se refiere a la aglutinación de partículas en la sangre, en particular la determinación del grupo sanguíneo caracterizando una agregación celular entre la sangre a ensayar y un anticuerpo.

Kalchenko, V. *et al.*, Journal of Biomedical Optics, 12(5), 052002 (2007) y Piederrière, Y *et al.*, Journal of Biomedical Optics, 9(2), 408-412 (2004) describen el análisis de sangre mediante técnicas ópticas.

35 Se conoce a partir del documento EP 2 233 923 A1 un procedimiento y un sistema de caracterización del tipo citado anteriormente. El procedimiento pretende caracterizar la dinámica de coagulación o de sedimentación de un fluido que contiene sangre. El sistema para la aplicación de este procedimiento comprende una cámara fluidica de recepción del líquido, una fuente de luz espacialmente coherente apropiada para emitir un haz luminoso de iluminación y un espejo de reflexión del haz luminoso en dirección a la cámara. El haz luminoso se extiende según una dirección longitudinal desde el espejo de reflexión hacia la cámara fluidica.

40 El sistema comprende también un sensor de imágenes, tal como un sensor matricial de tipo CCD (del inglés *Charger-Coupled Device*) o CMOS (del inglés *Complementary Metal Oxide Semi-conductor*), dispuesto para permitir la adquisición de una serie temporal de imágenes de un patrón óptico de granularidad generado por la interacción entre las partículas contenidas en la cámara y el haz luminoso. El sistema de caracterización comprende también una unidad de tratamiento de dicha serie temporal de imágenes.

45 La cámara fluidica está dispuesta entre el espejo y el sensor de imágenes según la dirección longitudinal. La distancia entre la cámara fluidica y el sensor de imágenes según la dirección longitudinal es de algunos centímetros o decenas de centímetros. El haz luminoso emitido por la fuente de luz espacialmente coherente presenta una superficie comprendida entre $10 \mu\text{m}^2$ y algunos mm^2 según un plano perpendicular a la dirección longitudinal y que atraviesa la cámara fluidica.

50 Un sistema y un procedimiento de este tipo permiten caracterizar eficazmente la dinámica de coagulación o de sedimentación de la sangre contenida en el líquido.

Sin embargo, dicho sistema es bastante voluminoso. Además, permite observar el fenómeno de coagulación sólo en un volumen relativamente reducido de la cámara fluidica.

60 El objetivo de la invención es por lo tanto proponer un procedimiento y un sistema de caracterización que permita observar un mayor volumen de líquido limitando al mismo tiempo el volumen del sistema de caracterización.

Con este fin, la invención tiene como objeto un procedimiento de caracterización según la reivindicación 1.

65 Según otros aspectos ventajosos de la invención, el procedimiento de caracterización comprende una o varias de las características según las reivindicaciones subordinadas 2 a 16 adjuntas.

La invención tiene también por objeto un sistema de caracterización de la variación de la velocidad de partículas o de la aglomeración de partículas, según la reivindicación 17.

5 Según otro aspecto ventajoso de la invención, el fotodetector matricial comprende la característica según la reivindicación subordinada 18 adjunta.

Estas características y ventajas de la invención aparecerán con la lectura de la descripción siguiente, dada únicamente a título de ejemplo no limitativo, y realizada en referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- 10
- la figura 1 es una representación muy esquemática de un sistema de caracterización según la invención, que comprende una cámara fluídica de recepción del líquido a caracterizar, una fuente de luz apropiada para iluminar la cámara según una dirección longitudinal, un fotodetector matricial de adquisición de imágenes de la radiación transmitida por la cámara iluminada y una unidad de tratamiento de informaciones,
- 15
- la figura 2 es una representación muy esquemática del sistema de caracterización según la invención, según otra disposición de la fuente de luz con respecto al fotodetector matricial,
- 20
- la figura 3 es una vista esquemática de la cámara fluídica según la dirección longitudinal, así como de la disposición del fotodetector matricial de la figura 1 con respecto a la cámara, según una primera variante,
 - la figura 4 es una vista análoga a la de la figura 3 según una segunda variante,
- 25
- la figura 5 es un organigrama de un procedimiento de caracterización según la invención,
 - la figura 6 es una imagen de un canal vacío de la cámara de la figura 1, adquirida por el fotodetector matricial,
- 30
- las figuras 7 y 8 son unas imágenes de la cámara que contiene el líquido, adquiridas por el fotodetector en diferentes momentos temporales,
 - las figuras 9 y 10 son unas imágenes de correlación, calculadas por la unidad de tratamiento de la figura 1, a partir de las imágenes adquiridas en diferentes momentos temporales,
- 35
- la figura 11 es una representación de la evolución temporal de un indicador que caracteriza una variación de la velocidad de las partículas contenidas en el líquido, tal como una ralentización de las partículas,
 - la figura 12 es una tabla que ilustra los casos de agregaciones celulares en función del grupo sanguíneo y del anticuerpo depositado,
- 40
- la figura 13 es una vista análoga a la de las figuras 3 y 4 según un segundo modo de realización, comprendiendo la cámara fluídica dos canales,
 - las figuras 14 y 15 son unas imágenes respectivas de los primer y segundo canales de la cámara de la figura 13, presentando el segundo canal una agregación celular, siendo las imágenes adquiridas por el fotodetector de la figura 1,
- 45
- las figuras 16 y 17 son unos histogramas del nivel de grises de las imágenes adquiridas de las figuras 14 y 15,
- 50
- las figuras 18 a 21 son unas imágenes del líquido a caracterizar, adquiridas por el fotodetector según un segundo ejemplo del segundo modo de realización, conteniendo el líquido a caracterizar sangre, a la que se añade una cantidad variable de anticuerpos, siendo estas imágenes adquiridas para unas cantidades crecientes de anticuerpos,
- 55
- las figuras 22 a 25 son unos histogramas del nivel de grises de las imágenes adquiridas de las figuras 18 a 21 respectivamente,
 - las figuras 26 a 29 son unas imágenes del líquido caracterizado en las figuras 18 a 21 respectivamente, obtenidas, después de la dilución, con la ayuda de un microscopio y que forma unas imágenes de referencia,
- 60
- las figuras 30 a 34 son unas imágenes del líquido a caracterizar, adquiridas por el fotodetector según un tercer ejemplo del segundo modo de realización, conteniendo el líquido a caracterizar sangre, una cantidad variable de proteína A, y una misma cantidad de anticuerpos añadida,
- 65
- las figuras 35 a 39 son unos histogramas del nivel de grises de las imágenes adquiridas de las figuras 30 a 34 respectivamente,

- las figuras 40 a 44 son unas imágenes del líquido caracterizado en las figuras 30 a 34 respectivamente, obtenidas después de la dilución con la ayuda de un microscopio y que forman unas imágenes de referencia, y
- la figura 45 es una representación muy esquemática de la aglutinación de los glóbulos rojos y de las proteínas A con la ayuda de los anticuerpos.

En la figura 1, un sistema de caracterización 10 está destinado a caracterizar una variación de la velocidad de partículas o la aglomeración de partículas, estando las partículas, tales como las partículas sanguíneas, contenidas en un líquido 12, por medio la adquisición de imágenes formadas por una radiación transmitida por el líquido 12 iluminado, y después el tratamiento de estas imágenes. La variación de la velocidad de partículas es, por ejemplo, una ralentización de las partículas, tal como se describirá más en detalle a continuación. El experto en la materia comprenderá que el sistema de caracterización 10 según la invención es de manera análoga apropiado para caracterizar una aceleración de las partículas.

Así, de manera general, el sistema de caracterización 10 está destinado a caracterizar un parámetro de un líquido que comprende unas partículas, siendo este líquido en particular sangre. Este parámetro es, por ejemplo, una coagulación o también una aglomeración de partículas que constituye el líquido. Como variante, se trata de un recuento de partículas o de una observación de la morfología de las partículas.

Por partícula, se entiende por ejemplo, una partícula biológica, es decir una célula (por ejemplo un glóbulo rojo, un glóbulo blanco, o una plaqueta), una bacteria, un virus o cualquier otra molécula (por ejemplo una proteína).

Por aglutinación (o aglomeración), se entiende la formación de un edificio tridimensional de partículas unidas entre sí, bajo el efecto de un reactivo introducido.

Por estado de aglutinación (o de aglomeración) se entiende una estimación, relativa o absoluta, del tamaño de los aglutinados o relativa a la cantidad de partículas presentes en los aglutinados.

El sistema de caracterización 10 comprende una cámara fluídica 14 destinada a recibir el líquido 12, una fuente de luz 16 apropiada para emitir un haz luminoso de excitación 18 para iluminar la cámara fluídica 14, el haz luminoso 18 dirigido según una dirección longitudinal X a través de la cámara fluídica 14, y un fotodetector matricial 20 apropiado para adquirir unas imágenes de la radiación transmitida por la cámara fluídica 14 iluminada por el haz luminoso 18. Por radiación transmitida, se entiende la radiación que atraviesa la cámara fluídica, de tal manera que el fotodetector matricial 20 y la fuente de luz 16 están situados a uno y otro lado de la cámara fluídica 14.

El sistema de caracterización 10 comprende una unidad de tratamiento de informaciones 21 y una pantalla 22 de visualización de una imagen de la cámara 14.

En el modo de realización descrito, el sistema de caracterización 10 es apropiado para caracterizar la coagulación de la sangre o la aglutinación de partículas sanguíneas, permitiendo la aglutinación de partículas sanguíneas determinar el grupo sanguíneo asociado. El líquido 12 contiene entonces sangre. El líquido 12 es, por ejemplo, sangre entera, una fracción de sangre, o también un plasma sanguíneo. Como variante, el líquido 12 es otro líquido corporal, tal como orina, sudor, etc.

La cámara fluídica 14 está dispuesta entre la fuente de luz 16 y el fotodetector matricial 20 según la dirección longitudinal X. La cámara fluídica 14 comprende una zona 26 de depósito del líquido y uno o varios canales 28 de circulación del líquido 12, como se representa en la figura 3.

La cámara fluídica 14 comprende por lo menos un canal fluídico, delimitado según la dirección X por una placa superior y una placa inferior, no representadas. Estas placas son por lo menos parcialmente translúcidas con el fin de permitir la iluminación del líquido 12 por la fuente de luz 16, así como la detección de la radiación transmitida por el detector matricial 20.

Las placas inferior y superior son, por ejemplo, dos láminas de vidrio, no representadas y separadas por unos espaciadores no representados, de manera que las láminas de vidrio están separadas aproximadamente 160 μm según la dirección longitudinal X.

La cámara fluídica 14 presenta un grosor E según la dirección longitudinal X. El grosor E es, por ejemplo, de valor comprendido entre 20 μm y 1000 μm , preferentemente comprendido entre 30 μm y 300 μm .

La fuente de luz 16 es apropiada para emitir el haz luminoso 18 según la dirección longitudinal X.

La fuente de luz 16 está dispuesta a una primera distancia D1 de la cámara fluídica 14 según la dirección longitudinal X. La primera distancia D1 presenta, preferentemente, un valor comprendido entre 1 cm y 30 cm, por

ejemplo igual a 20 cm.

En el modo de realización descrito, la fuente de luz 16 es una fuente espacial y temporalmente coherente. La fuente de luz 16 es, por ejemplo, un láser. Como variante, la fuente de luz 16 es un diodo láser (DL) o también un diodo láser de tipo VCSEL (del inglés *Vertical Cavity Surface Emitting Laser*).

También como variante, la fuente de luz 16 es un diodo electroluminiscente, también denominado LED (del inglés *Light-Emitting Diode*), monocromático y que presenta unas dimensiones suficientemente reducidas para ser considerada como espacialmente coherente, siendo el diámetro del LED inferior a la décima parte de la primera distancia D1 que separa este LED de la cámara.

El haz luminoso 18, orientado según la dirección longitudinal X, presenta a nivel de la cámara fluidica, una superficie comprendida entre 5 mm² y 200 mm², preferentemente igual a 25 mm², según un plano P perpendicular a la dirección longitudinal X, como se representa en la figura 1. El plano P está dispuesto en contacto con la cámara fluidica 14. Así, la superficie de fluido iluminada es más importante que en el estado de la técnica. Esto permite librarse de fluctuaciones locales del parámetro que se desea determinar.

El haz luminoso 18 es apropiado para iluminar directamente la cámara fluidica 14, preferentemente en ausencia de una óptica de aumento dispuesta entre la fuente de luz 16 y la cámara fluidica 14.

El fotodetector matricial 20 es un sensor de imágenes pixeladas, que comprende una pluralidad de píxeles, no representados. Cada píxel del fotodetector 20 presenta unas dimensiones inferiores o iguales a 10 μm, incluso a 4 μm. Cada píxel tiene, por ejemplo, la forma de un cuadrado cuyo lado es de valor inferior o igual a 10 μm, incluso a 4 μm. En el modo de realización descrito, cada píxel tiene la forma de un cuadrado de 4 μm de lado. Como variante, cada píxel tiene la forma de un cuadrado de 2,2 μm de lado.

El fotodetector matricial 20 está dispuesto a una segunda distancia D2 de la cámara fluidica 14 según la dirección longitudinal X. La segunda distancia D2 presenta un valor inferior a 1 cm, y preferentemente comprendida entre 100 μm y 2 mm. El hecho de preferir una distancia corta entre el detector y la cámara, permite limitar los fenómenos de interferencia entre las diferentes figuras de difracción. En efecto, cuando esta distancia aumenta, estas interferencias son susceptibles de hacer la imagen inexplorable, en particular cuando el número de partículas difractantes aumenta. Esto se debe al hecho de que el volumen de fluido iluminado es más importante que en el dispositivo descrito en la solicitud EP 2 233 923 A1 del estado de la técnica. Colocando el detector a una distancia superior a 1 cm, la imagen obtenida sobre el detector sería difícilmente explotable.

Las imágenes adquiridas por el fotodetector matricial 20 están formadas por la radiación transmitida directamente por la cámara fluidica 14 iluminada, en ausencia de una óptica de aumento dispuesta entre la cámara fluidica 14 y el fotodetector matricial 20. El fotodetector matricial 20 también se denomina dispositivo de tratamiento de imagen sin lente, y es apto para formar una imagen de la cámara fluidica 14 estando al mismo tiempo colocado a una distancia reducida de esta última. Por distancia reducida, se entiende una distancia inferior a 1 cm.

El fotodetector matricial 20 es apropiado para generar por lo menos una imagen cada 5 segundos, y la cadencia de adquisición es por lo tanto superior a 0,2 Hz. El fotodetector matricial 20 es un sensor de imágenes en dos dimensiones, a saber en un plano perpendicular al eje longitudinal X. La frecuencia de adquisición de las imágenes está preferentemente comprendida entre 1 Hz y 20 Hz.

El fotodetector matricial 20 es, por ejemplo, un sensor CCD. Como variante, el fotodetector 20 es un sensor CMOS.

El fotodetector matricial 20 está, por ejemplo, sustancialmente alineado con la cámara fluidica 14 según la dirección longitudinal X, como se ilustra en la figura 3 en la que el fotodetector 20 está representado en líneas de puntos.

Como variante, el fotodetector matricial 20 está ligeramente desplazado con respecto a la cámara 14 según el eje longitudinal X, como se ilustra en la figura 4 en la que el fotodetector 20 está representado asimismo en líneas de puntos.

La unidad de tratamiento de informaciones 21, visible en la figura 1, comprende un procesador de datos 30 y una memoria 32 asociada al procesador.

En el ejemplo de realización de la figura 2, el fotodetector matricial 20, la fuente de luz 16 y eventualmente la totalidad o parte de la unidad de tratamiento de informaciones 21 son solidarios a un mismo sustrato 23. El sistema de caracterización 10 comprende un sistema óptico 24, por ejemplo un espejo, que permite reflejar el haz luminoso 18 de la fuente de luz 16 hacia el fotodetector 20. Esto permite disponer de un sistema compacto. La cámara fluidica 14 está, por ejemplo, dispuesta en un soporte amovible 25. El soporte amovible 25 es, por ejemplo, desechable y está destinado a ser insertado en la vertical del fotodetector 20, a poca distancia de este último, de tal manera que la cámara fluidica es apta para ser iluminada por el haz luminoso 18. Según este ejemplo de realización, el soporte 25 está destinado a recibir el fluido a analizar 12, y después a ser insertado cerca del fotodetector 20 para que el

análisis pueda ser realizado. Comprende por ejemplo un conducto, en el que el fluido 12 circula hasta el canal 28 de la cámara fluidica, estando la cámara fluidica conectada a este conducto. Cuando el análisis está terminado, se retira el soporte 15 para ser, en particular, desechado. El sistema de caracterización 10 está entonces disponible para realizar otra medición con otro soporte.

5 El experto en la materia comprenderá que, en el ejemplo de realización de la figura 2, la dirección longitudinal X corresponde a la última porción del haz luminoso 18 entre el espejo correspondiente del sistema óptico 24 y el fotodetector 20, que atraviesa la cámara fluidica 14.

10 El o cada canal de circulación 28 presenta una anchura L, visible en las figuras 3 y 4. La anchura L es, por ejemplo, de valor comprendido entre 50 μm y 5 mm, preferentemente igual a 1,5 mm.

15 La memoria 32 es apta para almacenar un programa 34 de recepción de las imágenes adquiridas por el fotodetector matricial 20, un primer programa 36 de cálculo de un primer indicador Ind1_{n,n+m} apto para caracterizar el parámetro buscado; en este caso la variación de la velocidad de las partículas, tal como su ralentización. Como complemento o como variante, la memoria 32 es apta para almacenar un segundo programa 38 de cálculo de un segundo indicador Ind2 apto para caracterizar otro parámetro buscado, en este caso la aglomeración de las partículas. La memoria 32 es apta asimismo para almacenar un programa 40 de caracterización de la variación de la velocidad de las partículas y/o de la aglomeración de las partículas.

20 Como variante, los medios de recepción 34, los primeros medios de cálculo 36, los segundos medios de cálculo 38 y los medios de caracterización 40 están realizados en forma de componentes lógicos programables, o también en forma de circuitos integrados dedicados.

25 El programa de recepción 34 es apropiado para recibir regularmente, por parte del fotodetector 20, las imágenes adquiridas secuencialmente, en diferentes momentos. El programa de recepción 34 es apropiado para recibir por lo menos una imagen por segundo, y la cadencia de recepción de las imágenes es superior a 0,2 Hz, típicamente en el intervalo de 1 Hz a 20 Hz.

30 El primer programa de cálculo 36 es apropiado para calcular una imagen A_n, que representa la imagen de transmisión I_n(x, y), a la que se resta una media local. Esta última se obtiene por convolución de la imagen I_n(x, y) con un núcleo K1. Este núcleo K1 es una matriz de dimensiones reducidas con respecto a I_n. Por ejemplo, las dimensiones del núcleo K1 son de 10 píxeles por 10 píxeles, y las dimensiones de I_n son por lo menos dos veces superiores a las del núcleo K1, incluso 10 veces superiores. El núcleo K1, que comprende P líneas y Q columnas es, por ejemplo, homogéneo, siendo todos sus valores idénticos. Según lo anterior, P y Q son unos números enteros, por ejemplo iguales a 10. Así, se establecen dos imágenes A_n y A_{n+m} que corresponden respectivamente a los instantes n y n+m, siendo m un número entero. En general, m es igual a 1, siendo las imágenes de transmisión I_n y I_{n+1} dos imágenes de transmisión sucesivas.

40
$$A_n(x, y) = I_n(x, y) - (I_n \otimes k1)(x, y) \quad (1)$$

$$A_{n+m}(x, y) = I_{n+m}(x, y) - (I_{n+m} \otimes k1)(x, y) \quad (2)$$

45 en las que I_n(x, y), I_{n+m}(x,y) representan dos imágenes de transmisión sucesivas en los instantes n y n+m, x e y representan las coordenadas de un punto de la imagen respectiva, siendo I_n(x,y), I_{n+m}(x,y) unas matrices que tienen X líneas e Y columnas, representando el símbolo ⊗ el producto de convolución definido por la ecuación siguiente:

$$(F \otimes k1)(x, y) = \sum_{p=0}^P \sum_{q=0}^Q F(x-p, y-q)k1(p, q) \quad (3)$$

50 siendo F una matriz de X líneas e Y columnas,

representando k1 un núcleo para la correlación de las imágenes adquiridas, siendo k1 una matriz de P líneas y Q columnas,

55 siendo X, Y, P y Q unos números enteros que verifican X ≥ P ≥ 1 e Y ≥ Q ≥ 1.

Las imágenes son, por ejemplo, adquiridas cada segundo por el fotodetector matricial 20, y las dos imágenes de transmisión I_n(x,y), I_{n+1}(x,y) son entonces unas imágenes adquiridas en un segundo de intervalo.

60 El primer programa de cálculo 36 está después apropiado para calcular una imagen de correlación Icorr_{n,n+m}(x,y) representativa de la correlación entre dos imágenes de transmisión I_n(x,y), I_{n+m}(x,y) por ejemplo según la ecuación siguiente:

$$I_{corr_{n,n+m}}(x,y) = \frac{((A_n \times A_{n+m}) \otimes k1)(x,y)}{\sqrt{((A_n^2) \otimes k1)(x,y)} \sqrt{((A_{n+m}^2) \otimes k1)(x,y)}} \quad (4)$$

5 en la que $I_{corr_{n,n+m}}(x,y)$ representa la imagen de correlación de dos imágenes de transmisión I_n, I_{n+m} establecidas en los instantes respectivos n y $n+m$; x e y representan las coordenadas de un punto de la imagen, siendo $I_{corr_{n,n+m}}(x,y)$ una matriz que tiene X líneas e Y columnas.

10 El primer programa de cálculo 36 es apropiado por último para calcular el primer indicador $Ind1_{n,n+m}$ a partir de la imagen de correlación $I_{corr_{n,n+m}}(x,y)$ obtenida anteriormente. Este indicador $Ind1_{n,n+m}$ es representativo de la intensidad de la imagen $I_{corr_{n,n+m}}(x,y)$. Este indicador $Ind1_{n,n+m}$ es entonces apto para caracterizar la variación de la velocidad de las partículas, tal como su ralentización.

15 El indicador de correlación $Ind1_{n,n+m}$ es representativo de la correlación entre por lo menos dos imágenes de transmisión $I_n(x,y)$ y $I_{n+m}(x,y)$ respectivamente adquiridas en los instantes n y $n+m$, siendo esta correlación establecida para una región de interés 142 de la imagen de correlación $I_{corr_{n,n+m}}(x,y)$. Dicha región de interés 142 está determinada por el usuario. Corresponde a la zona de la imagen de correlación $I_{corr_{n,n+m}}(x,y)$ que se utiliza para determinar el indicador de correlación $Ind1_{n,n+m}$. Se trata por ejemplo de una zona cuadrada que comprende algunas decenas de píxeles de lado, por ejemplo 50×50 píxeles. El indicador de correlación $Ind1_{n,n+m}$ traduce el valor de la intensidad en esta región de interés 142. Se determina en particular a partir de la intensidad media o la intensidad total en la región de interés 142 de la imagen $I_{corr_{n,n+m}}(x,y)$. Este indicador $Ind1_{n,n+m}$ representa, por ejemplo, el nivel de intensidad media o de dicha intensidad total en la región de interés 142.

20 Como variante, el primer programa de cálculo 36 es apropiado para calcular unas imágenes intermedias $C_n(x,y), C_{n+m}(x,y)$ a partir de las dos imágenes de transmisión $I_n(x,y), I_{n+m}(x,y)$ adquiridas en los instantes n y $n+m$, según la ecuación siguiente:

$$25 \quad C_n(x,y) = I'_n(x,y) - \overline{I'_n} \quad (5)$$

$$C_{n+m}(x,y) = I'_{n+m}(x,y) - \overline{I'_{n+m}} \quad (6)$$

30 en las que $I'_n(x,y), I'_{n+m}(x,y)$ representan respectivamente una región de interés de las dos imágenes de transmisión I_n y I_{n+m} . Como se ha mencionado anteriormente, el índice m es, por ejemplo, igual a 1. Las coordenadas x e y designan las coordenadas de un punto de la imagen, $C_n(x,y)$, siendo $C_{n+m}(x,y)$ unas matrices que tienen N líneas y M columnas, y

35 $\overline{I'_n}, \overline{I'_{n+m}}$ representan un valor medio de las regiones de interés respectivas $I_n(x,y), I_{n+m}(x,y)$. Se precisa que la resta de I'_n y de I'_{n+m} respectivamente por $\overline{I'_n}, \overline{I'_{n+m}}$ es facultativa. Esto corresponde a una etapa de normalización que permite obtener un indicador comprendido entre 0 y 1. Además, esto permite librarse del efecto de la fluctuación de la intensidad de iluminación del medio entre dos imágenes.

40 Según esta variante, el primer programa de cálculo 36 es entonces apropiado para calcular el primer indicador $Ind1_{n,n+m}$ según la ecuación siguiente:

$$Ind1_{n,n+m} = \frac{\sum_{x=1, y=1}^{N, M} \sqrt{C_n^2(x,y)} \sqrt{C_{n+m}^2(x,y)}}{\sqrt{\sum_{x=1, y=1}^{N, M} C_n^2(x,y)} \sqrt{\sum_{x=1, y=1}^{N, M} C_{n+m}^2(x,y)}} \quad (7)$$

45 en la que $Ind1_{n,n+m}$ representa el primer indicador

El programa de caracterización 40 es apropiado para caracterizar la variación de la velocidad y/o la aglomeración de partículas contenidas en el líquido 12. Más precisamente, el programa de caracterización 40 es apropiado para determinar, a partir del primer indicador calculado $Ind1_{n,n+m}$, la variación de la velocidad de las partículas contenidas en el líquido 12, tal como su ralentización. En el modo de realización descrito, en el que el líquido 12 contiene sangre, el primer programa de caracterización 40 es apropiado para determinar, a partir del primer indicador calculado $Ind1_{n,n+m}$ la coagulación de las partículas sanguíneas y/o un intervalo temporal, denominado tiempo de coagulación, entre un instante de origen y el instante en el que el primer indicador calculado $Ind1_{n,n+m}$ adquiere un valor predeterminado. Así, de manera general, $Ind1_{n,n+m}$ caracteriza un parámetro de coagulación de la sangre, basado en la observación de imágenes de transmisión I_n, I_{n+m} en los instantes n y $n+m$, estando m generalmente

comprendido entre 1 y 10, y preferentemente es igual a 1.

El funcionamiento del sistema de caracterización 10 según la invención se describirá ahora con la ayuda de la figura 5, que representa un organigrama del procedimiento de caracterización según la invención.

Previamente a su utilización, el o los canales de circulación 28 de la cámara fluidica están vacíos, y una imagen inicial I_0 de la cámara 14 muestra entonces una zona blanca que corresponde al canal de circulación 28 y unas zonas que delimitan el canal, apareciendo en este ejemplo en forma de zonas oscuras que corresponden al resto de la cámara fluidica 14, como se representa en la figura 6.

Cuando tiene lugar la etapa inicial 100, el líquido 12 se introduce en la zona de depósito 26 de la cámara fluidica. El líquido 12 fluye por capilaridad desde la zona de depósito 26 en dirección del o de los canales de circulación 28.

El líquido 12 se mezcla, eventualmente cuando tiene lugar la etapa 110, con un reactivo 112, visible en las figuras 3 y 4, y apto para activar o favorecer el fenómeno de ralentización de las partículas. El reactivo 112 es, por ejemplo, un reactivo liofilizado apto para favorecer la ralentización de las partículas sanguíneas por medio de una coagulación de la sangre.

El reactivo 112 se deposita, por ejemplo, aguas arriba de la zona de detección óptica que corresponde a la zona en el interior de las líneas punteadas en la figura 3, para la cual una imagen es adquirida por el fotodetector 20. Como variante, el reactivo 112 está dispuesto en el interior de la zona de detección óptica, como se representa en la figura 4. La mezcla entre el líquido 12 y el reactivo 112 se efectúa cuando el líquido 12 fluye al contacto con el reactivo 112 en el interior del canal de circulación 28 (flecha F1).

En el modo de realización descrito, el reactivo 112 es una proteína pro-coagulante. Esta proteína se deposita, se seca o se liofiliza en el canal de circulación 28. El reactivo 112 es, por ejemplo, la proteína protrombina, también denominada TP, cuando se determina el parámetro INR (del inglés *International Normalized Ratio*).

$$INR = \left(\frac{T}{T_{ref}} \right)^{ISI}$$

siendo T el tiempo de coagulación medido, siendo T_{ref} el tiempo de referencia considerado, siendo ISI un factor de corrección que depende de los reactivos utilizados para activar la coagulación.

Como variante, el reactivo 112 es la proteína Ecarina, cuando el tiempo de coagulación se mide según el ensayo ECT (del inglés *Ecarin Clotting Time*). Como variante, el reactivo 112 es la proteína trombina cuando el tiempo de coagulación se mide según el ensayo TT (del inglés *Thrombine Time*).

El líquido 12 es iluminado por el haz luminoso 18 cuando tiene lugar la etapa 120. La fuente de luz 16 emite en efecto el haz luminoso 18 en dirección de la cámara fluidica 14, en la que se encuentra el líquido 12 según la dirección longitudinal X.

Cuando tiene lugar la etapa 130, el fotodetector matricial 20 efectúa entonces la adquisición secuencial de varias imágenes de transmisión $I_n(x,y)$, $I_{n+m}(x,y)$ en instantes diferentes n y n+m. Cada imagen de transmisión $I_n(x,y)$, $I_{n+m}(x,y)$ está formada por la radiación transmitida, en el instante de adquisición correspondiente, por la cámara fluidica 1 iluminada.

Las imágenes $I_n(x,y)$, $I_{n+m}(x,y)$ son, por ejemplo, unas imágenes inmediatamente sucesivas, siendo entonces m igual a 1, preferentemente adquiridas cada segundo, como se representan en las figuras 7 y 8, donde el espacio temporal entre las dos imágenes $I_n(x,y)$, $I_{n+1}(x,y)$ adquiridas sucesivamente es igual a un segundo.

Las imágenes adquiridas $I_n(x,y)$, $I_{n+1}(x,y)$ corresponden a las interferencias de las figuras de difracción generadas por unas partículas en suspensión en el líquido 12. La iluminación de las partículas por el haz 18 espacial y temporalmente coherente, tal como un haz láser, genera una figura de difracción que varía en el tiempo a causa del movimiento de las partículas contenidas en el líquido 12.

La observación de una figura de difracción explotable, colocando el fotodetector matricial 20 a una distancia tan reducida se debe en particular a la ausencia de óptica de aumento entre la cámara fluidica 14 y el fotodetector 20.

Cuando tiene lugar la etapa de adquisición 130, el fotodetector 20 está dispuesto a una distancia reducida de la cámara fluidica 14, siendo la segunda distancia D2 entre la cámara fluidica 14 y el fotodetector 20 según la dirección longitudinal X inferior a 1 cm.

Al final de la etapa de adquisición 130, en particular después de la adquisición de las imágenes $I_n(x,y)$, $I_{n+1}(x,y)$, el

primer programa de cálculo 36 empieza, cuando tiene lugar la etapa 140, por calcular las imágenes $A_n(x,y)$, $A_{n+1}(x,y)$ con la ayuda de las ecuaciones (1), (2) y (3).

5 El primer programa de cálculo 36 calcula después la imagen de correlación $I_{corr_{n,n+1}}(x,y)$ correspondiente a partir de las imágenes $A_n(x,y)$, $A_{n+1}(x,y)$ y con la ayuda de la ecuación (4).

10 En el modo de realización descrito, las imágenes de correlación evolucionan en función del tiempo, como se representa en las figuras 9 y 10, en las que la imagen de correlación $I_{corr_{N1,N1+1}}(x,y)$, señalada $I_{corr_{N1}}(x,y)$, que corresponde a una correlación entre dos imágenes de transmisión I_n , I_{n+1} realizadas con $n = N1$ antes de la coagulación (figura 9) presenta un aspecto muy diferente de la imagen $I_{corr_{N2}}(x,y)$ que corresponde a una correlación entre dos imágenes de transmisión I_{N2} , I_{N2+1} , realizadas con $n = N2$ después de la coagulación (figura 10).

15 El primer programa de cálculo 36 calcula por último el valor del primer indicador $Ind1_{n,n+1}$ para cada imagen de correlación $I_{corr_{n,n+1}}(x,y)$ obtenida. El valor del primer indicador $Ind1_{n,n+1}$ es, por ejemplo, el valor medio de los puntos de la imagen de correlación $I_{corr_{n,n+1}}(x,y)$ en la región de interés predeterminada 142, visible en las figuras 9 y 10. Como variante, el valor del primer indicador $Ind1_{n,n+1}$ es la integral de la imagen en la región de interés 142 (es decir la suma de los niveles de grises de cada píxel). También como variante, el valor del primer indicador $Ind1_{n,n+1}$ es una función de esta integral.

20 Como variante, el primer programa de cálculo 36 empieza, cuando tiene lugar la etapa 140, por calcular las imágenes intermedias $C_n(x,y)$, $C_{n+1}(x,y)$ con la ayuda de las ecuaciones (5) y (6).

25 El primer programa de cálculo 36 calcula después el valor del primer indicador $Ind1_{n,n+1}$ a partir de las imágenes intermedias $C_n(x,y)$, $C_{n+1}(x,y)$ y con la ayuda de la ecuación (7).

30 En el modo de realización descrito, al final de la etapa de cálculo 140, el procedimiento de caracterización vuelve a la etapa 130 con el fin de adquirir una nueva imagen de la cámara fluidica 14 iluminada, y después calcular, de manera análoga a la etapa 140, una nueva imagen de correlación $I_{corr_{n+1,n+2}}(x,y)$ y un nuevo valor del primer indicador $Ind1_{n+1, n+2}$.

35 Las etapas de adquisición 130 y de cálculo 140 se repiten entonces de manera regular, por ejemplo cada segundo, durante un tiempo predeterminado, por ejemplo superior a 60 segundos, o hasta una parada activada por el usuario, en particular a la vista de la evolución temporal del primer indicador.

La evolución temporal del primer indicador $Ind1_{n,n+m}$, representada en el modo de realización descrito por la curva 145 visible en la figura 11, permite entonces caracterizar la variación de la velocidad de las partículas contenidas en el líquido 12, tal como la ralentización de las partículas sanguíneas.

40 En la figura 11, un instante inicial t_0 corresponde a la mezcla del reactivo 112 con el líquido 12, y el canal de circulación 28 enfrente de la zona de detección óptica se rellena después en un primer instante t_1 . Dicho de otra manera, el ejemplo de realización de la figura 11 corresponde al caso en el que el reactivo 112 es depositado justo antes de la zona de detección óptica, como se representa en la figura 3.

45 La curva 145 muestra entonces, a partir del primer instante t_1 , una disminución del valor del primer indicador $Ind1_{n,n+m}$ para alcanzar un valor mínimo inferior a 0,1. La curva 145 muestra después, a partir de un segundo instante t_{2A} , un aumento rápido del valor del primer indicador $Ind1_{n,n+m}$ hasta una estabilización de este valor alrededor de 0,8.

50 La fase entre los primer y segundo instantes t_1 , t_{2A} , también denominada primera fase, durante la cual el valor del primer indicador $Ind1_{n,n+m}$ es bajo, corresponde a una baja correlación entre las imágenes de transmisión adquiridas sucesivamente. En efecto, esto se debe a un cambio importante del patrón de difracción de una imagen a otra durante la primera fase, a causa del movimiento de las partículas en suspensión en el líquido 12, en el espacio que corresponde a la región de interés 142.

55 La fase a partir del segundo instante t_{2A} y hasta el final de la caracterización, también denominada segunda fase, corresponde por su parte a una ralentización de las partículas en el líquido 12, lo cual se traduce por un aumento de la correlación entre las imágenes sucesivas.

60 El programa de caracterización 40 determina entonces, a partir del primer indicador $Ind1_{n,n+m}$ calculado, el intervalo temporal entre el instante origen t_0 y el instante t_{2A} en el que el primer indicador presenta de nuevo unos valores de correlación crecientes. El intervalo temporal entre el instante origen t_0 y el segundo instante t_{2A} se denomina asimismo tiempo de coagulación T_c . En el ejemplo de realización de la figura 11, el tiempo de coagulación T_c es igual a aproximadamente 29 s.

65 El programa de caracterización 40 determina asimismo la coagulación de las partículas sanguíneas a partir del

primer indicador $\text{Ind}1_{n,n+m}$ calculado. El tiempo de coagulación T corresponde por ejemplo a la diferencia temporal entre el instante inicial t_0 ($t = 0$ sobre la curva 145 de la figura 11) y el instante de coagulación, que caracteriza la coagulación de la sangre.

5 Este instante de coagulación corresponde, por ejemplo, a un punto en el que la curva 145 alcanza una meseta, más allá de la cual los valores del primer indicador $\text{Ind}1_{n,n+m}$ no evolucionan casi nada (segundo instante t_{2A}). Se comprende entonces que este instante de coagulación t_{2A} es asimismo determinable a partir de la derivada de la función temporal que describe la evolución del primer indicador $\text{Ind}1_{n,n+m}$, por ejemplo cuando esta última pasa más allá de un cierto umbral.

10 Como variante, este instante de coagulación se determina a partir de la segunda derivada de esta función. A partir de esta segunda derivada, es posible situar un punto de inflexión 146 de la curva 145. El instante t_{2A} que corresponde a este punto de inflexión 146 se utiliza entonces, por ejemplo, para determinar el instante de coagulación.

15 En el ejemplo de realización de la figura 11, se traza una tangente 147 a la curva 145, que pasa por este punto de inflexión 146. El instante de coagulación corresponde entonces a la abscisa en la cual dicha tangente 147 cruza la línea de base de esta curva (segundo instante t_{2A}) o bien a la abscisa en la que dicha tangente 147 cruza el eje de las abscisas (tercer instante t_{2B}). Por línea de base, se entiende la porción de la curva, sustancialmente plana, que precede a la brusca subida del valor del primer indicador $\text{Ind}1_{n,n+m}$. En el ejemplo representado, la línea de base corresponde a la porción de la curva 145 cuyas abscisas están comprendidas aproximadamente entre 15 s y 28 s, (segundo instante t_{2A}).

20 Como se ha indicado anteriormente, se obtiene el tiempo de coagulación T por una diferencia entre el instante de coagulación t_{2A} , t_{2B} y el instante inicial t_0 , seleccionado en el origen del eje de las abscisas de la curva 145.

25 El sistema de caracterización 10 y el procedimiento de caracterización según la invención permiten por lo tanto caracterizar la variación de la velocidad de las partículas contenidas en el líquido 12 en una gran parte del o de los canales de circulación 28 de la cámara fluidica debido a la poca distancia entre la cámara fluidica 14 y el fotodetector 20.

30 En el ejemplo de realización de la figura 11, el sistema de caracterización 10 y el procedimiento de caracterización según la invención permiten caracterizar una ralentización de las partículas por detección de un aumento de la correlación entre las imágenes sucesivas.

35 El experto en la materia comprenderá entonces que el sistema de caracterización 10 y el procedimiento de caracterización según la invención permiten, de manera análoga, caracterizar una aceleración de las partículas por detección de una disminución de la correlación entre las imágenes sucesivas.

40 La segunda distancia D_2 inferior a 1 cm entre la cámara fluidica 14 y el fotodetector 20 permite también limitar el volumen del sistema de caracterización 10.

45 Además, la importante extensión del haz luminoso 18 según el plano P , es decir superior a 5 mm^2 , y por ejemplo comprendida entre 5 mm^2 y 200 mm^2 , permite limitar el calentamiento del líquido 12 contenido en la cámara fluidica 14. En efecto, la superficie importante del haz luminoso 18 permite tener una densidad óptica de potencia baja.

50 Además, el hecho de utilizar un haz luminoso extenso y formar una imagen a distancia reducida de la cámara permite examinar un volumen de fluido aún más importante. Se limita entonces la influencia de fenómenos locales, susceptibles de volverse predominantes cuando el haz luminoso es más fino, y el volumen de fluido analizado es casi puntual. El análisis de la correlación entre dos imágenes de transmisiones I_n , I_{n+m} permite tener en cuenta la estructura espacial de la coagulación, en el plano del canal microfluidico 28. Dicho de otra manera, se observa la evolución de la coagulación de la sangre en dos dimensiones.

55 Las figuras 12 a 17 ilustran un segundo modo de realización para el cual los elementos análogos al primer modo de realización, descrito anteriormente, son localizados por referencias idénticas, y no se describen de nuevo.

60 Según el segundo modo de realización, el sistema de caracterización 10 está destinado a caracterizar más particularmente la aglomeración de partículas contenidas en un líquido 12. El sistema de caracterización 10 es, por ejemplo, apto para caracterizar la aglomeración de las partículas sanguíneas, tales como los glóbulos rojos, también denominada aglutinación de partículas sanguíneas.

Una información relativa al grupo sanguíneo se determina entonces además a partir del estado de aglomeración, también denominado estado de aglutinación.

65 Como se conoce en sí mismo, el grupo sanguíneo es determinable según el ensayo de Beth-Vicent detectando la presencia de antígenos A o B que implican la ausencia de anticuerpos anti-A o anti-B. En el caso en el que los

hematíes de la sangre ensayada presenten un antígeno A o B, se formará un complejo antígeno-anticuerpo y llevará a una agregación celular como se recuerda en la tabla 200, visible en la figura 12.

5 La cámara fluidica 14 comprende dos canales de circulación 202, 204 distintos, a saber un primer canal 202 y un segundo canal 204, como se representa en la figura 13.

Según el segundo modo de realización, la fuente de luz 16 es cualquier tipo de fuente de luz. La fuente de luz 16 no es necesariamente espacial y temporalmente coherente.

10 Según el segundo modo de realización, el segundo programa de cálculo 38 es apropiado para calcular el segundo indicador ind2 apto para caracterizar la aglomeración de las partículas, siendo el segundo indicador Ind2 un indicador de intensidad para cada imagen adquirida $I_n(x,y)$. El segundo indicador Ind2 es representativo del histograma de la intensidad de cada píxel en la imagen I_n , o en una región de interés de esta última. Se determina, por ejemplo, midiendo la intensidad total de la imagen I_n o en una región de interés predeterminada de la imagen I_n ,
15 eventualmente después de la umbralización.

El programa de caracterización 40 es apropiado para determinar después un estado de aglomeración de las partículas del líquido 12 a partir del segundo indicador calculado Ind2. El estado de aglomeración se determina, por ejemplo, cuando el segundo indicador Ind2 sobrepasa un umbral predeterminado.

20 En el modo de realización descrito, en el que el líquido 12 contiene sangre, las partículas son, por ejemplo, glóbulos rojos, y el programa de caracterización es entonces apropiado para determinar una información relativa al grupo sanguíneo a partir del estado de aglomeración.

25 El funcionamiento de este segundo modo de realización se describirá ahora con la ayuda de las figuras 13 a 17.

Cuando tiene lugar la etapa inicial 100, el líquido 12, por ejemplo la muestra sanguínea de un donante del cual se desea determinar el grupo sanguíneo, se introduce en la zona de depósito 26 de la cámara fluidica. El líquido 12 fluye entonces desde la zona de depósito 26 en dirección a los canales de circulación 202, 204, por ejemplo por capilaridad.

30 El líquido 12 se mezcla después con un primer 206 y un segundo 208 reactivos distintos, cuando tiene lugar la etapa 110, como se representa en la figura 13.

35 Cada reactivo 206, 208 se deposita, por ejemplo, aguas arriba de la zona de detección óptica que corresponde a la zona interior de las líneas punteadas en la figura 13 para la cual una imagen es adquirida por el fotodetector 20.

40 La mezcla entre el líquido 12 y los primer y segundo reactivos 206, 208 se efectúa cuando el líquido 12 fluye al contacto con el primer reactivo 206 en el interior del primer canal 202 (flecha F2) y respectivamente desde el segundo reactivo 208 en el interior del segundo canal 204 (flecha F3).

45 En el modo de realización descrito, el primer reactivo 206 es un suero de donante A, es decir que contiene unos anticuerpos anti-B, y el segundo reactivo 208 es un suero de donante B, es decir que contiene unos anticuerpos anti-A.

En función del grupo sanguíneo asociado a la muestra sanguínea 12, se producirá entonces una agregación celular o no en cada uno de los canales de circulación 202, 204.

50 El líquido 12, tal como la muestra sanguínea mezclada con los primer y segundo reactivos 206, 208, se ilumina después por el haz luminoso 18 cuando tiene lugar la etapa 120.

55 Cuando tiene lugar la etapa 130, el fotodetector matricial 20 efectúa entonces la adquisición de una imagen de transmisión $I(x,y)$ que corresponde a una zona de detección óptica que abarca los dos canales de circulación 202, 204.

60 El experto en la materia observará que, según el segundo modo de realización, la adquisición de una sola imagen de transmisión $I(x,y)$ permite caracterizar la aglomeración de las partículas contenidas en el líquido 12, comparando esta imagen con una imagen de referencia $I_{ref}(x,y)$, siendo esta última por ejemplo una imagen realizada sobre una zona de referencia, no representada, en la que la sangre no está mezclada con un reactivo. Esta zona de referencia es, por ejemplo, un tercer canal, de geometría idéntica a la del primer o segundo canal 202, 204, y que no comprende ningún reactivo.

65 Como variante, se trata de una zona situada en el primer canal 202 o en el segundo canal 204, aguas arriba del reactivo 206, 208.

Como variante, la imagen de referencia $I_{ref}(x,y)$ se realiza en el mismo sitio que la imagen de transmisión, justo

después del rellenado del canal por el líquido analizado, siendo la imagen de transmisión $I(x,y)$ realizada, en las mismas condiciones, después de un cierto tiempo, por ejemplo 1 minuto, de tal manera que el eventual efecto del reactivo sobre el líquido analizado sea medible.

5 La imagen adquirida $I(x,y)$ corresponde de manera análoga a la difracción y a la difusión del haz luminoso 18 por las partículas en suspensión en el líquido 12. Preferentemente, esta imagen está realizada en condiciones idénticas para los dos canales, así como para la zona de referencia. Por condiciones idénticas, se entiende en particular las condiciones de iluminación, la distancia fuente-detector, las características del detector utilizado, el tiempo de reposo, el campo observado, el tamaño de la imagen.

10 La iluminación de las partículas por el haz luminoso 18 genera un patrón de difracción. Tal como se ha indicado anteriormente, la ausencia de lente de aumento entre el fluido y el fotodetector 20, acoplada a la superficie importante del haz incidente, permite formar una imagen explotable a distancia reducida, cubriendo un campo importante de fluido, tal como un campo que presenta un área de varios mm^2 .

15 Cuando tiene lugar la etapa de adquisición 130, el fotodetector 20 está dispuesto cerca de la cámara fluidica 14, siendo la segunda distancia D_2 entre la cámara fluidica 14 y el fotodetector 20 según la dirección longitudinal X inferior a 1 cm.

20 En el ejemplo de realización de las figuras 14 y 15, que representan una imagen 210 adquirida del primer canal 202, y respectivamente una imagen 212 adquirida del segundo canal 204, se observa una agregación celular sólo en el segundo canal 204 por la presencia de manchas blancas en la imagen 212. Dicho de otra manera, el grupo sanguíneo asociado a la muestra sanguínea ensayada es el grupo B según la tabla 200 de la figura 12.

25 Al final de la etapa de adquisición 130, el segundo programa de cálculo 38 calcula, cuando tiene lugar la etapa 140, el segundo indicador Ind_2 apto para caracterizar la aglomeración de las partículas, siendo el segundo indicador Ind_2 un indicador de intensidad para cada imagen adquirida $I(x,y)$. El segundo indicador Ind_2 es representativo de la intensidad en la región de interés predeterminada de la imagen, en particular de la distribución de la intensidad de los píxeles en dicha región.

30 El segundo indicador Ind_2 es, por ejemplo, una característica de la imagen, y en particular del histograma del nivel de grises de la imagen adquirida para cada canal 202, 204 y, llegado el caso, del canal de referencia como se ilustra en las figuras 16 y 17, que representan un histograma 214 del nivel de grises de la imagen adquirida del primer canal 202, y respectivamente un histograma 216 del nivel de grises de la imagen adquirida del segundo canal 204. Cada histograma de niveles de grises 214, 216 presenta en la abscisa los valores de niveles de grises y en la ordenada la población de píxeles, es decir el número de píxeles, para un nivel de grises dado en la abscisa. Una característica del histograma es, por ejemplo, la intensidad media de los píxeles, señalada con I_{mean} , después de una eventual umbralización de la imagen, permitiendo esta umbralización conservar sólo la información de los píxeles cuya intensidad es superior a un cierto umbral.

40 Con referencia al ejemplo representado en las figuras 16 y 17, tras efectuar una umbralización de la intensidad que corresponde al valor 120, se entiende que la intensidad media de la imagen correspondiente a la figura 17, es superior a la intensidad media de la imagen correspondiente a la figura 16. Esto viene del hecho de que el histograma de la figura 17, que representa la observación de una aglutinación de partículas, comprende más píxeles intensos (niveles de grises superiores a 200) que el histograma de la figura 16, representando este último la observación de una no aglutinación. El segundo indicador Ind_2 está entonces, por ejemplo, establecido según la intensidad media de la imagen.

50 Según una variante, se determina para cada imagen realizada, la intensidad I_{max} , correspondiendo esta última, en el histograma de la imagen, al valor más elevado de la intensidad que se parece a un número predeterminado de píxeles, por ejemplo 500 píxeles. Se determina después la diferencia entre I_{max} y I_{mean} , mediante la resta $I_{\text{max}} - I_{\text{mean}}$, representando entonces el segundo indicador Ind_2 esta diferencia. En el histograma de la figura 17, el segundo indicador Ind_2 así definido es más elevado que en el histograma de la figura 16. El valor del segundo indicador Ind_2 así determinado permite concluir la presencia o la ausencia de un fenómeno de aglutinación, por medio de una comparación, por ejemplo con un valor $\text{Ind}_{2,\text{ref}}$ obtenido sobre una zona de referencia, o también con un valor predeterminado, siendo la predeterminación de este valor por ejemplo efectuada según unos ensayos experimentales.

60 Según una variante, en cada imagen de transmisión, se determina la intensidad I_{peak} que corresponde al valor máximo del histograma, es decir al valor de intensidad que se parece al número más elevado de píxeles. En las figuras 16 y 17, este valor corresponde al pico de cada distribución, respectivamente iguales a 120 y 130. Se determina también el valor máximo I_{max} que se parece al número de píxeles de valor superior a un umbral predeterminado. Con referencia a las figuras 16 y 17, y adoptando un umbral de 500, I_{max} es respectivamente igual a 181 y 256. El segundo indicador Ind_2 corresponde a la distancia entre I_{max} e I_{peak} , respectivamente 61 para la figura 16 y 126 para la figura 17. Se concluye con una aglutinación cuando el segundo indicador Ind_2 es superior, por ejemplo del 25%, a un cierto umbral predeterminado, o cuando es superior al indicador $\text{Ind}_{2,\text{ref}}$ establecido para la

zona de referencia.

Según una variante, el segundo indicador Ind2 es un indicador de comparación entre una región de interés de una imagen de transmisión I y una imagen de referencia I_{ref} que no contiene reactivo (y por lo tanto en el que la aglutinación no se produce) como a continuación:

$$Ind2 = \frac{\sum_x \sum_y |I(x, y) - I_{ref}(x, y)|}{\sum_x \sum_y I(x, y) + I_{ref}(x, y)}$$

Se compara el segundo indicador Ind2 con un umbral predeterminado, por ejemplo 0,25. Así, si el segundo indicador Ind2 es superior a este umbral, se concluye con una aglutinación.

El programa de caracterización 40 es apropiado para determinar después un estado de aglomeración de las partículas del líquido 12 a partir del segundo indicador calculado Ind2.

El estado de aglomeración se determina, por ejemplo, cuando el segundo indicador Ind2 sobrepasa un umbral predeterminado.

Si la comparación es positiva, es decir si el nivel de grises obtenido es superior al umbral predeterminado, entonces el programa de caracterización 40 deduce la presencia de una agregación celular en el canal 202, 204 correspondiente.

En el segundo modo de realización descrito, el programa de caracterización 40 determina por último el grupo sanguíneo asociado a la muestra sanguínea 12 ensayada a partir del tipo de los primer y segundo reactivos 206, 208, así como de la tabla 200.

Las ventajas de este segundo modo de realización son idénticas a las del primer modo de realización descrito anteriormente.

Como complemento del primer modo de realización, la cámara fluídica 14 comprende una pluralidad de canales, por ejemplo los dos canales 202, 204 visibles en la figura 13, con el fin de caracterizar la variación de la velocidad de las partículas del líquido 12 cuando el líquido 12 está mezclado con unos reactivos diferentes, estando entonces un reactivo respectivo dispuesto en cada canal 202, 204 de la cámara fluídica 14. Esto permite, con un mismo dispositivo, determinar diferentes parámetros de análisis de una misma muestra líquida, por ejemplo el tiempo de coagulación y el grupo sanguíneo.

Dicha cámara fluídica 14 es, por ejemplo, ventajosa para caracterizar la coagulación del líquido 12 que contiene sangre, con diferentes reactivos aptos para favorecer la ralentización de las partículas sanguíneas mediante una coagulación de la sangre, tales como los diferentes reactivos 112 definidos anteriormente.

Se concibe así que el sistema de caracterización 10 según la invención permite observar una mayor parte de la cámara fluídica 14, teniendo al mismo tiempo un volumen limitado.

Las figuras 18 a 29 ilustran un segundo ejemplo del segundo modo de realización, en el que el líquido a caracterizar 12 es un líquido biológico, en particular sangre o sangre diluida, y el sistema de caracterización 10 es apto para caracterizar la aglomeración de partículas, en este caso glóbulos rojos en el líquido biológico 12.

El líquido a caracterizar 12 comprende, en este ejemplo, sangre diluida al 1/20 en un tampón PBS (del inglés *Phosphate Buffered Saline*), comprendiendo el tampón el 1% en volumen de FBS (del inglés *Foetal Bovine Serum*).

El volumen de sangre diluida es de 40 µl, al que se añade una cantidad variable de anticuerpos, tales como un anti-glóbulo rojo denominado CD235A, comercializado a título de ejemplo por la compañía Becton Dickinson bajo la referencia BD 555569. La cantidad de anticuerpo añadida varía de 0 a 1 µg de anticuerpos por µl de sangre no diluida, lo cual corresponde a una concentración comprendida entre 0 y 6,7 µM.

La adición de este anticuerpo permite ocultar los antígenos de superficie de los glóbulos rojos (en particular la glicoforina A), lo cual provoca su aglutinación.

El objetivo de este segundo ejemplo es mostrar que es posible caracterizar un estado de aglutinación de partículas sanguíneas, por ejemplo de glóbulos rojos, por tratamiento de imagen sin lente con la ayuda del sistema de caracterización 10.

A cada cantidad de anticuerpo añadida en el líquido a caracterizar 12, se efectúa una adquisición de la muestra de

líquido a caracterizar 12 con la ayuda del sistema de caracterización 10, es decir por tratamiento de imagen sin lente, siendo las imágenes 220A, 220B, 220C y 220D obtenidas visibles en las figuras 18 a 21. Se calcula después un histograma en nivel de grises de la intensidad de los píxeles de cada una de estas imágenes 220A, 220B, 220C y 220D, siendo los histogramas calculados 222A, 222B, 222C y 222D visibles en las figuras 22 a 25. Unas imágenes de referencia 224A, 224B, 224C y 224D de la muestra de líquido a caracterizar 12 se obtienen asimismo con un microscopio, como se representa en las figuras 26 a 29. Se señala que, para la observación en microscopio, la muestra sanguínea se diluye con un factor de dilución de una décima parte.

En este segundo ejemplo, la fuente de luz 16 es un diodo láser, que presenta un espectro de emisión centrado en una longitud de onda λ por ejemplo igual a 670 nm, y la primera distancia D1 es sustancialmente igual a 8 cm. La muestra está confinada en la cámara fluidica 14 que comprende un canal 28 de 150 μm de grosor dispuesto entre dos paredes transparentes de 200 μm de grosor. Estas paredes están realizadas en un material plástico, por ejemplo en un material COP (del inglés *Cyclo Olefin Polymer*).

La cámara fluidica 14 está colocada directamente sobre el tapón de vidrio del fotodetector matricial 20, tal como un sensor CMOS, que comprende 1280 * 1024 píxeles, siendo cada píxel de 5 μm x 5 μm de diámetro, de tal manera que la cámara fluidica 14 esté dispuesta entre el sensor CMOS y la fuente de luz 16. La segunda distancia D2 es entonces preferentemente inferior a 1 cm, por ejemplo igual a 550 μm .

Las adquisiciones de imágenes se realizan, por ejemplo, con un tiempo de reposo de 5 minutos, con una imagen por adquisición. Las imágenes 220A, 220B, 220C y 220D corresponden respectivamente a una cantidad de anticuerpo añadida creciente. Más precisamente, las imágenes 220A, 220B, 220C y 220D corresponden respectivamente a:

- una cantidad de anticuerpos sustancialmente nula,
- una cantidad de anticuerpos inferior a una concentración umbral C,
- una cantidad de anticuerpos igual a la concentración umbral C, y
- una cantidad de anticuerpos igual a 2 veces la concentración umbral C.

Cuando la cantidad de anticuerpos añadida supera la concentración umbral C, los glóbulos rojos se aglomeran y las imágenes obtenidas por tratamiento de imagen sin lente con la ayuda del sistema de caracterización 10 reflejan el tamaño de los aglutinados. El valor de la concentración umbral C es, por ejemplo, igual a 250 ng de anticuerpos para 1 μl de sangre no diluida, lo que corresponde a 1,7 μm .

Se observa que la aglomeración de glóbulos rojos provoca la aparición de zonas extendidas claras (alto nivel de grises) delimitadas por unas zonas oscuras (bajo nivel de grises). Este efecto de segmentación de imagen según unas zonas que comprenden varias decenas, incluso centenas de píxeles, de niveles de grises comparables, se puede observar comparando las imágenes 220A (figura 18) o 220B (figura 19), en las que no se observa ninguna aglutinación, con las imágenes 220C (figura 20) y 220D (figura 21), en las que se observa una aglutinación. La presencia o ausencia de una aglutinación de partículas observable en las imágenes 220A, 220B, 220C y 220D se confirma por las observaciones con el microscopio representadas en las imágenes 224A (figura 26), 224B (figura 27), 224C (figura 28) y 224D (figura 29) respectivamente. Esto se traduce por una evolución del histograma de cada imagen, tendiendo esta última a estirarse hacia valores bajos de niveles de grises a medida que aumenta la cantidad de aglomerados, como se puede observar desde el histograma 222A que corresponde a la imagen 220A que va hacia el histograma 222D que corresponde a la imagen 220D.

El estado de aglutinación de la muestra sanguínea es entonces cuantificado por el cálculo del segundo indicador Ind2 según varias variantes posibles:

- el segundo indicador Ind2 es, según una primera variante, igual a la desviación típica de la distribución en intensidad de los píxeles de la zona de interés examinada, y es entonces señalado con Ind2_A,
- el segundo indicador Ind2 es, según una segunda variante, igual al número de píxeles por debajo de un cierto umbral, siendo este umbral por ejemplo una fracción del nivel de grises máximo, dividido entre el número total de píxeles en la zona de interés examinada, y el segundo indicador Ind2 calculado según esta segunda variante es entonces señalado con Ind2_B. En el ejemplo de las figuras 22 a 25, el valor del umbral es igual a 125.

La tabla 1 siguiente presenta el valor del segundo indicador Ind2 según estas dos variantes y para cada una de las zonas de interés representadas en las figuras 18 a 21.

Figuras	18	19	20	21
Ind2 _A	36	33	51	59
Ind2 _B	$6,5 \cdot 10^{-3}$	$6,5 \cdot 10^{-3}$	$8,7 \cdot 10^{-2}$	$1,4 \cdot 10^{-1}$

Cuando el segundo indicador Ind2_A según la primera variante es inferior a un valor umbral, comprendido por ejemplo entre 40 y 45, no se observa ninguna aglutinación. Más allá de este valor, cuanto más elevado sea el valor del

segundo indicador Ind2_A, más importante es la cantidad de partículas.

El segundo indicador Ind2_B, calculado según la segunda variante, permite llegar a las mismas conclusiones, adquiriendo un valor umbral comprendido entre $1 \cdot 10^{-2}$ y $5 \cdot 10^{-2}$.

Así, se constata que es posible observar, incluso cuantificar, un estado de aglutinación de partículas en el líquido biológico 12, con la ayuda de un indicador calculado a partir de una imagen obtenida por el sistema de caracterización 10, es decir por tratamiento de imagen sin lente, y en particular el segundo indicador Ind2_A, Ind2_B, según las primera y segunda variantes de este segundo ejemplo, siendo este segundo indicador una función de la distribución de la intensidad de los píxeles de las imágenes 220A, 220B, 220C y 220D adquiridas por el sistema de caracterización 10.

La utilización del sistema de caracterización 10 se puede considerar también en un ensayo de diagnóstico basado en la detección de aglutinados en un fluido biológico.

Las figuras 30 a 45 ilustran un tercer ejemplo del segundo modo de realización, en el que el líquido a caracterizar 12 es un líquido biológico, en particular sangre o sangre diluida, y el sistema de caracterización 10 es apto para caracterizar la aglomeración, también denominada aglutinación, de partículas en el líquido biológico 12.

En este tercer ejemplo, se pone en evidencia la detección de la aglutinación de glóbulos rojos en una muestra sanguínea, que comprende una cantidad variable de proteína A, siendo la aglutinación provocada por la adición de una cantidad dada de un reactivo (anticuerpo).

El líquido a caracterizar 12 comprende, por ejemplo, sangre diluida al 1/20 en un tampón PBS (del inglés *Phosphate Buffered Saline*), comprendiendo el tampón el 1% en volumen de FBS (del inglés *Foetal Bovine Serum*).

El volumen de sangre diluido es de 40 μ l, en el que se incuba un anticuerpo, tal como un anti-glóbulo rojo denominado CD235A, comercializado a título de ejemplo por la compañía Becton Dickinson, bajo la referencia BD 555569, con una solución de proteína A en cantidad variable. La duración de la incubación es de 1 hora.

Así, se dispone de varias soluciones, denominadas anticuerpos - proteína A, en las que la relación molar anticuerpo-proteína A es variable. Estas soluciones son susceptibles de provocar la aglutinación de glóbulos rojos, de donde viene la denominación "soluciones pro-aglutinantes". Un volumen de 1,2 μ l de cada una de estas soluciones se incuba con 40 μ l de muestra de sangre diluida descrita anteriormente, durante 1,5 horas, formando cada una de estas mezclas una muestra de líquido a caracterizar 12.

En cada una de las mezclas así obtenidas, la concentración molar de anticuerpo S es inferior al umbral C determinado en el segundo ejemplo anterior. Dicho de otra manera, esta concentración de anticuerpos no permite la aglutinación espontánea de glóbulos rojos. En este caso, esta concentración S es de 100 ng de anticuerpos por μ l de sangre no diluida, es decir 0,7 μ M.

Para cada una de las muestras de líquido a caracterizar 12, se efectúa una adquisición de imagen con la ayuda del sistema de caracterización 10, es decir por tratamiento de imagen sin lente, siendo las imágenes adquiridas 230A, 230B, 230C, 230D y 230E obtenidas visibles en las figuras 30 a 34. Se calcula después un histograma en nivel de grises de la intensidad de los píxeles de cada una de estas imágenes 230A, 230B, 230C, 230D y 230E, siendo los histogramas calculados 232A, 232B, 232C, 232D y 232E visibles en las figuras 35 a 39. Unas imágenes de referencia 234A, 234B, 234C, 234D y 234E de cada una de las muestras de líquido a caracterizar 12 se obtienen asimismo con un microscopio, como se representa en las figuras 40 a 44. Se señala que, para la observación en microscopio, la muestra sanguínea se diluye con un factor de dilución de una décima parte.

En un tercer ejemplo, la fuente de luz 16 es un diodo láser, que presenta un espectro de emisión centrado en una longitud de onda λ igual a 670 nm, y la primera distancia D1 es sustancialmente igual a 8 cm. La muestra se confina en la cámara fluídica 14 que comprende un canal 28 de 150 μ m de grosor dispuesto entre dos paredes transparentes de 200 μ m de grosor. Estas paredes están realizadas en material plástico, por ejemplo en material COP (del inglés *Cyclo Olefin Polymer*).

La cámara fluídica 14 está colocada directamente sobre el tapón de vidrio del fotodetector matricial 20, tal como un sensor CMOS. El sensor CMOS es, por ejemplo, una matriz de 1280 por 1024 píxeles, teniendo cada píxel la forma de un cuadrado de 5 μ m de lado, de tal manera que la cámara fluídica 14 esté dispuesta entre el sensor CMOS y la fuente de luz 16. La segunda distancia D2 es entonces preferentemente inferior a 1 cm, por ejemplo igual a 550 μ m.

Las adquisiciones de imágenes se realizan por ejemplo con un tiempo de reposo de 5 minutos, con una imagen por adquisición. Las imágenes 230B, 230C, 230D y 230E corresponden respectivamente a una cantidad de proteína A añadida creciente. Más precisamente, las imágenes 230A, 230B, 230C, 230D y 230E corresponden respectivamente a:

ES 2 523 947 T3

- ausencia de anticuerpos, es decir una relación molar Anticuerpo:Proteína A = 0:40 (0 moléculas de anticuerpos por 40 moléculas de proteína A),
- ausencia de proteína A, es decir una relación molar Anticuerpo:Proteína A = 1:0 (1 molécula de anticuerpos por 0 moléculas de proteína A),
- relación molar Anticuerpo:Proteína A = 1:1 (1 molécula de anticuerpos por 1 molécula de proteína A),
- relación molar Anticuerpo:Proteína A = 1:5 (1 molécula de anticuerpos por 5 moléculas de proteína A),
- relación molar Anticuerpo:Proteína A = 1:40 (1 molécula de anticuerpos por 40 moléculas de proteína A),

El anticuerpo sirve en este caso de agente de acoplamiento entre una molécula de proteína A y un glóbulo rojo, como se detallará ulteriormente.

En presencia de proteína A y en ausencia de anticuerpo, no se observa ninguna aglutinación de glóbulos rojos, como se representa en la figura 30. En presencia de anticuerpos y en ausencia de proteína A, no se observa ninguna aglutinación de glóbulos rojos, como se aprecia en la figura 31.

Cuando la relación anticuerpo:proteína A es igual a 1:1, no se observa tampoco ninguna aglutinación de glóbulos rojos, como se representa en la figura 32.

Cuando la relación anticuerpo:proteína A es igual a 1:5, se observa una aglutinación de glóbulos rojos, visible en la figura 33. Cuando la relación anticuerpo:proteína A es igual a 1:40, se observa también una aglutinación de glóbulos rojos, visible en la figura 34, siendo el tamaño de los aglutinados observados en la figura 34 superior al de los aglutinados observados en la figura 33.

Las figuras 35 a 39 representan el histograma de la intensidad de los píxeles de las figuras 30 a 34 respectivamente.

Se observa que la aglomeración de glóbulos rojos provoca la aparición de zonas claras (fuerte nivel de grises) delimitadas por una zona oscura (bajo nivel de grises). Este efecto de segmentación de imagen según unas zonas que comprenden varias decenas, incluso centenas de píxeles, de niveles de grises comparables, es visible comparando las imágenes 230A (figura 30) o 230B (figura 31) o 230C (figura 32), en las que no se observa ninguna aglutinación, con las imágenes 230D (figura 33) y 230E (figura 34), en las que se observa una aglutinación. La presencia o la ausencia de una aglutinación de partículas observables en las imágenes 230A, 230B, 230C, 230D y 230E está conformada por las observaciones con microscopio representadas en las imágenes 234A (figura 40), 234B (figura 41), 234C (figura 42), 234D (figura 43) y 234E (figura 44) respectivamente. Esto se traduce por una evolución del histograma de cada imagen, tendiendo este último a estirarse hacia los valores bajos de nivel de grises a medida que aumenta la cantidad de aglomerados, como se puede ver desde el histograma 232A que corresponde a la imagen 230A que va hacia el histograma 232E que corresponde a la imagen 230E. El estado de aglutinación de la muestra sanguínea está entonces cuantificado por el cálculo del segundo indicador Ind2 según varias variantes posibles:

- el segundo indicador Ind2 es, según una primera variante, igual a la desviación típica de la distribución en intensidad de los píxeles de la zona de interés examinada, y está entonces señalada con Ind2_A,
- el segundo indicador Ind2 es, según una segunda variante, igual al número de píxeles por debajo de un cierto umbral, siendo este umbral por ejemplo una fracción del nivel de grises máximo, dividido entre el número total de píxeles en la zona de interés examinada, y el segundo indicador Ind2 calculado según esta segunda variante se señala entonces con Ind2_B. En el ejemplo de las figuras 22 a 25, el valor del umbral es por ejemplo igual a 125.

La tabla 2 siguiente presenta el valor del segundo indicador Ind2 según estas dos variantes y para cada una de las zonas de interés representadas en las figuras 30 a 34.

Figuras	30	31	32	33	34
Ind2 _A	33	39	35	50	52
Ind2 _B	$4,0 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-2}$	$5,5 \cdot 10^{-3}$	$6,5 \cdot 10^{-2}$	$9,5 \cdot 10^{-2}$

Cuando el segundo indicador Ind2_A según la primera variante es inferior a un valor umbral, comprendido por ejemplo entre 40 y 45, no se observa ninguna aglutinación. Más allá de este valor umbral, cuanto más elevado sea el valor del segundo indicador Ind2_A, más importante es la cantidad de partículas aglutinadas.

El segundo indicador Ind2_B, calculado según la segunda variante, permite llegar a las mismas conclusiones, adquiriendo un valor umbral comprendido entre $1 \cdot 10^{-2}$ y $5 \cdot 10^{-2}$.

Así, se constata que es posible observar, incluso cuantificar, un estado de aglutinación de partículas en el líquido biológico 12, con la ayuda de un indicador calculado a partir de una imagen obtenida por el sistema de caracterización 10, es decir por tratamiento de imagen sin lente, y en particular el segundo indicador Ind_{2A}, Ind_{2B}, según las primera y segunda variantes de este segundo ejemplo, que está en función de la distribución de la intensidad de los píxeles de las imágenes 230A, 230B, 230C, 230D y 230E adquiridas por el sistema de caracterización 10.

Además, cuanto más importante sea la cantidad de proteína A, más importante es el tamaño de los aglutinados, siendo constante la cantidad de anticuerpo añadida. Así, el segundo indicador Ind_{2A}, Ind_{2B}, que cuantifica el estado de aglutinación permite también cuantificar una cantidad de proteína en la muestra sanguínea.

En función de la relación molar anticuerpo-proteína A, los glóbulos rojos se aglomeran y las imágenes 230A, 230B, 230C, 230D y 230E obtenidas por tratamiento de imagen sin lente reflejan el tamaño de los aglutinados, es decir un grado de aglutinación. Se comprende entonces que, introduciendo una cantidad determinada de anticuerpos en la muestra sanguínea, es posible estimar la cantidad de proteína A presente en esta muestra en función del estado de aglutinación, es decir en función del segundo indicador Ind_{2A}, Ind_{2B} descrito anteriormente.

Dicho de otra manera, la cantidad de proteína A, más allá de la cual se observa una aglutinación, constituye el límite de detección de una determinación de esta proteína en la muestra sanguínea, introduciendo una cantidad dada de anticuerpos en la muestra de líquido a caracterizar 12.

Así, se comprende que es posible observar, incluso cuantificar, un estado de aglutinación de partículas en un fluido biológico, por unos indicadores relativos a la imagen obtenida por tratamiento de imagen sin lente, y en particular el segundo indicador Ind_{2A}, Ind_{2B}, según las primera y segunda variantes de este segundo ejemplo, que está en función de la distribución de la intensidad de los píxeles. Este estado de aglutinación depende, por ejemplo, de la concentración de un analito en el líquido biológico, permitiendo entonces la cuantificación de este estado de aglutinación el ensayo de este analito en el líquido. El ejemplo muestra que este ensayo se puede realizar introduciendo un reactivo bi-funcional, en este caso el anticuerpo 300, en una muestra sanguínea, apto para fijarse al mismo tiempo sobre una partícula del fluido biológico, en este caso los glóbulos rojos 302, y sobre el analito a ensayar, en este caso la proteína A 304, formando así un puente entre un analito 304 y los glóbulos rojos 302, como se representa en la figura 45.

El término bi-funcional designa la facultad del reactivo para enlazarse al mismo tiempo sobre una partícula y sobre un analito.

De manera general, por analito, se entiende una especie química o biológica presente en el líquido, tal como una molécula, una macromolécula (por ejemplo proteína o ácido nucleico), una célula, una bacteria, un virus, o también una espora.

Además, el analito 304 debe comprender como mínimo 2 sitios de unión con el reactivo bi-funcional, como se representa en la figura 45. Así, cada analito 304 puede estar enlazado, por medio del reactivo bi-funcional, a por lo menos dos partículas. Esto provoca la aglutinación de las partículas.

Dicho de otra manera, el estado de aglutinación de las partículas en el líquido 12 depende de la cantidad de analito presente en el líquido 12, siendo esta cantidad dosificable añadiendo un reactivo susceptible de provocar la formación de aglutinados, siendo el reactivo 300 entonces apto para fijarse entre una de dichas partículas 302 y un analito 304, con el fin de formar un aglutinado.

En función de la cantidad de analito 304 presente en el líquido, se forma un aglutinado, compuesto por partículas 302 y de analito 304. Determinando el estado de aglutinación correspondiente a una cantidad dada de reactivo introducido, es posible entonces estimar la cantidad de analito 304 presente en el líquido 12.

En los segundo y tercer ejemplos del segundo modo de realización, descritos anteriormente, la segunda distancia D₂ es inferior a 1 cm. Los inventores han observado sin embargo que, asimismo, en el caso de la caracterización de la aglutinación, los valores de la segunda distancia D₂ superiores a 1 cm, tales como unos valores de algunos centímetros, incluso algunas decenas de centímetros, permiten obtener unos resultados explotables, incluso si los valores de la segunda distancia D₂ inferiores a 1 cm siguen siendo preferibles.

De manera general, estos segundo y tercer ejemplos demuestran otro aspecto de la invención. Según este otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de caracterización de la aglutinación de partículas, tales como unas partículas biológicas, en un líquido, por ejemplo un líquido biológico, y en particular un líquido corporal, comprendiendo el procedimiento de caracterización las etapas siguientes:

- la introducción del líquido en una cámara fluidica,
- la iluminación de la cámara fluidica por un haz luminoso, procediendo el haz luminoso en particular de una

fuente de luz, tal como un diodo láser o un diodo electro-luminiscente,

- 5 - la adquisición de una imagen, o de una pluralidad de imágenes, de la cámara fluidica por un fotodetector matricial, estando el fotodetector colocado preferentemente a una distancia de la cámara fluidica inferior a 1 cm, estando la cámara fluidica dispuesta entre la fuente de luz y el fotodetector matricial,
- el tratamiento de la imagen, o de la pluralidad de imágenes, para determinar un indicador que caracteriza la aglutinación de partículas en el líquido biológico, y
- 10 - la caracterización de la aglutinación de partículas en el líquido, en función del valor del indicador.

Se debe observar que la imagen es adquirida por el fotodetector, preferentemente sin óptica de aumento entre la cámara fluidica y el fotodetector matricial. Sin embargo, a nivel de cada píxel del detector pueden estar previstas unas microlentes de focalización, como se ha mencionado anteriormente.

15 Como complemento y de manera facultativa, el indicador es un indicador representativo de la distribución de la intensidad de los píxeles en una imagen, o de manera más general, cualquier otro indicador que traduce la segmentación de la imagen según diferentes zonas, comprendiendo cada zona varias decenas a centenas de píxeles de intensidad comparable, es decir cuya intensidad está repartida en un intervalo de niveles de grises del orden de la mitad, incluso de una tercera parte, incluso de una cuarta parte, incluso menos de la cuarta parte de la dinámica de la imagen.

20 Como complemento y de manera facultativa, el procedimiento de caracterización comprende la adición de un reactivo, susceptible de provocar la aglutinación de partículas en el líquido.

25 Como se ilustra en el tercer ejemplo del segundo modo de realización, la aglutinación de las partículas está, por ejemplo, en función de una cantidad de analito presente en el líquido.

30 Según esta variante, la invención se refiere a un procedimiento de detección de la cantidad de un analito, en un líquido, por ejemplo un líquido biológico, y en particular un líquido corporal, comprendiendo el procedimiento de detección las etapas siguientes:

- la introducción del líquido en una cámara fluidica,
- 35 - la iluminación de la cámara fluidica por un haz luminoso, procediendo el haz luminoso en particular de una fuente de luz, tal como un diodo láser o un diodo electroluminiscente,
- la adición de un reactivo, apto para provocar la formación de aglutinados de partículas y de analito en el líquido,
- 40 - la adquisición de una imagen, o de una pluralidad de imágenes, de la cámara fluidica por un fotodetector matricial, estando el fotodetector colocado preferentemente a una distancia de la cámara fluidica inferior a 1 cm, estando la cámara fluidica dispuesta entre la fuente de luz y el fotodetector matricial,
- 45 - el tratamiento de la imagen, o de la pluralidad de imágenes, para determinar un indicador que caracteriza la aglutinación de partículas en el líquido biológico, y
- la estimación de la cantidad de analito en el líquido, en función del valor del indicador.

50 Según también otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de determinación de un parámetro del líquido 12, que comprende sangre, comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:

- la introducción del líquido 12 en la cámara fluidica 14,
- 55 - la iluminación de la cámara fluidica 14 por medio del haz luminoso de excitación 18 emitido por la fuente de luz 16, extendiéndose el haz luminoso 18 a través de la cámara fluidica 14 según la dirección longitudinal X,
- la adquisición de por lo menos una imagen $I_n(x,y)$, $I_{n+m}(x,y)$, $I(x,y)$ por el fotodetector matricial 20, siendo la imagen $I_n(x,y)$, $I_{n+m}(x,y)$, $I(x,y)$ formada por una radiación transmitida por la cámara fluidica 14 iluminada, y
- 60 - la determinación de un indicador $Ind1_{n,n+m}$, $Ind2$, a partir de dicha por lo menos una imagen $I_n(x,y)$, $I_{n+m}(x,y)$, $I(x,y)$.

65 Cuando tiene lugar la etapa de adquisición, el fotodetector 20 está dispuesto a la distancia $D2$, inferior a 1 cm, de la cámara fluidica 14 según la dirección longitudinal X.

Como complemento y de manera facultativa, el procedimiento de determinación comprende una o más de las características siguientes, consideradas aisladamente o según todas las combinaciones técnicamente posibles:

- 5 - el haz luminoso 18 ilumina directamente la cámara fluidica 14, y la imagen $I_n(x,y)$, $I_{n+m}(x,y)$, $I(x,y)$ está formada directamente por la radiación transmitida por la cámara fluidica 14 iluminada, en ausencia de una óptica de aumento dispuesta entre la cámara fluidica 14 y el fotodetector 20;
- el parámetro es una coagulación, y el procedimiento comprende entonces las etapas siguientes:
 - 10 + la mezcla del líquido 12 con un reactivo para favorecer la coagulación de la sangre,
 - + la adquisición de una serie de imágenes de transmisión $I_n(x,y)$, $I_{n+m}(x,y)$ en los instantes temporales n , $n+m$ diferentes,
 - 15 + el cálculo de un indicador $Ind1_{n,n+m}$ para establecer una correlación entre dos zonas de las imágenes de transmisión $I_n(x,y)$, $I_{n+m}(x,y)$,
siendo la coagulación determinada en función del valor de dicho indicador;
 - 20 - el parámetro es un tiempo de coagulación, y el procedimiento comprende entonces las etapas siguientes:
 - + la mezcla del líquido 12 con un reactivo para favorecer la coagulación de la sangre,
 - + la adquisición de una serie de imagen es de transmisión $I_n(x,y)$, $I_{n+m}(x,y)$ en los instantes temporales n , $n+m$ diferentes,
 - 25 + el cálculo de un indicador $Ind1_{n,n+m}$ para establecer una correlación entre dos imágenes $I_n(x,y)$, $I_{n+m}(x,y)$, y
 - + la determinación de un intervalo temporal, denominado tiempo de coagulación, entre un instante origen t_0 y el instante t_{2A} , t_{2B} en el que el indicador $Ind1_{n,n+m}$ adquiere un valor determinado.
 - 30 - el parámetro es una aglutinación de partículas sanguíneas, y el procedimiento comprende entonces las etapas siguientes
 - 35 + la mezcla del líquido 12 con un reactivo apto para generar una aglutinación de las partículas sanguíneas,
 - + la adquisición de una imagen de transmisión $I(x,y)$,
 - + el cálculo de un indicador $Ind2$ en función de la intensidad en una zona predeterminada de la imagen de transmisión $I(x,y)$, y
 - 40 + la determinación de un estado de aglutinación cuando este indicador $Ind2$ sobrepasa un umbral predeterminado;
 - 45 - la partículas sanguíneas son unos glóbulos rojos, comprendiendo el reactivo un anticuerpo, dando el estado de aglutinación entonces una información relativa al grupo sanguíneo.

Según este otro aspecto independiente, la invención se refiere también a un sistema de determinación de un parámetro del líquido 12, que comprende sangre, comprendiendo el sistema de determinación:

- 50 - la cámara fluidica 14 destinada a recibir el líquido 12;
- la fuente de luz 16 apropiada para emitir el haz luminoso de excitación 18 para iluminar la cámara fluidica 14, extendiéndose el haz luminoso 18 según la dirección longitudinal X;
- 55 - el fotodetector matricial 20 apropiado para adquirir por lo menos una imagen $I_n(x,y)$, $I_{n+1}(x,y)$, $I(x,y)$ de una radiación transmitida por la cámara fluidica 14 iluminada; y
- la unidad de tratamiento de informaciones 21 que comprende unos medios de determinación de un indicador $Ind1_{n,n+m}$, $Ind2$, a partir de dicha por lo menos una imagen $I_n(x,y)$, $I_{n+m}(x,y)$, $I(x,y)$.
- 60

El fotodetector 20 está dispuesto a la distancia $D2$, inferior a 1 cm, de la cámara fluidica 14 según la dirección longitudinal X.

- 65 El parámetro es una coagulación, un tiempo de coagulación, o también una aglutinación de partículas sanguíneas.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de caracterización de una variación de la velocidad de partículas o de una aglomeración de partículas, estando las partículas, tales como unas partículas sanguíneas, contenidas en un líquido (12), comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:
- la introducción (100) del líquido (12) en una cámara fluidica (14);
 - la iluminación (120) de la cámara fluidica (14) por medio de un haz luminoso de excitación (18) emitido por una fuente de luz (16), extendiéndose el haz luminoso (18) a través de la cámara fluidica (14) según una dirección longitudinal (X);
 - la adquisición (130) de por lo menos dos imágenes ($I_n(x,y)$, $I_{n+m}(x,y)$, $I(x,y)$) por un fotodetector matricial (20), estando las imágenes ($I_n(x,y)$, $I_{n+m}(x,y)$, $I(x,y)$) formadas por una radiación transmitida por la cámara fluidica (14) iluminada; y
 - el cálculo (140), a partir de las imágenes adquiridas ($I_n(x,y)$, $I_{n+m}(x,y)$, $I(x,y)$), de por lo menos un indicador ($Ind1_{n,n+m}$, $Ind2$) que caracteriza la variación de la velocidad o la aglomeración de las partículas;
- caracterizado por que, cuando tiene lugar la etapa de adquisición (130), el fotodetector (20) está dispuesto a una distancia ($D2$) inferior a 1 cm de la cámara fluidica (14) según la dirección longitudinal (X).
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el haz luminoso (18) presenta una superficie comprendida entre 5 mm^2 y 200 mm^2 , preferentemente igual a 25 mm^2 , según un plano (P) perpendicular a la dirección longitudinal (X), estando dicho plano (P) dispuesto en contacto con la cámara fluidica (14).
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el haz luminoso (18) ilumina directamente la cámara fluidica (14), y la imagen ($I_n(x,y)$, $I_{n+m}(x,y)$; $I(x,y)$) está formada directamente por la radiación transmitida por la cámara fluidica (14) iluminada, en ausencia de una óptica de aumento dispuesta entre la cámara fluidica (14) y el fotodetector (20).
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, cuando tiene lugar la etapa de adquisición (130), varias imágenes de transmisión ($I_n(x,y)$, $I_{n+m}(x,y)$) son adquiridas secuencialmente en unos instantes temporales (n, n+m) diferentes, y en el que, cuando tiene lugar la etapa de cálculo (140), un primer indicador calculado ($Ind1_{n,n+m}$) es un indicador de correlación apto para caracterizar la variación de la velocidad de las partículas, siendo el indicador de correlación ($Ind1_{n,n+m}$) representativo de la correlación entre por lo menos dos imágenes de transmisión ($I_n(x,y)$, $I_{n+m}(x,y)$), adquiridas respectivamente en los instantes n y n+m, o de la correlación para una región predeterminada de dichas imágenes de transmisión ($I_n(x,y)$, $I_{n+m}(x,y)$).
5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el procedimiento comprende además una etapa (110) de mezcla del líquido (12) con un reactivo (112) apto para favorecer la ralentización de las partículas, tal como un reactivo (112) apto para favorecer la ralentización de las partículas sanguíneas por medio de una coagulación de la sangre.
6. Procedimiento según la reivindicación 4 o 5, en el que el procedimiento comprende además una etapa de determinación, a partir del primer indicador calculado ($Ind1_{n,n+m}$), de la coagulación de las partículas sanguíneas y/o de un intervalo temporal (Tc), denominado tiempo de coagulación, entre un instante de origen ($t0$) y el instante ($t2_A$, $t2_B$) en el que el primer indicador calculado ($Ind1_{n,n+m}$) adquiere un valor predeterminado.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la fuente de luz (16) es una fuente de luz espacial y temporalmente coherente, tal como un láser.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que el primer indicador ($Ind1_{n,n+m}$) se calcula a partir de una imagen de correlación ($Icorr_{n,n+m}(x,y)$) que define la correlación espacial entre dichas imágenes de transmisión (I_n , I_{n+m}), o de una región predeterminada (142) de dicha imagen de correlación ($Icorr_{n,n+m}(x,y)$).
9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la imagen de correlación ($Icorr_{n,n+m}(x,y)$) se determina por la ecuación siguiente:

$$Icorr_{n,n+m}(x,y) = \frac{((A_n \times A_{n+m}) \otimes k1)(x,y)}{\sqrt{((A_n^2) \otimes k1)(x,y)} \sqrt{((A_{n+m}^2) \otimes k1)(x,y)}}$$

en la que x e y representan las coordenadas de un punto de la imagen, $Icorr_{n,n+m}(x,y)$ es una matriz que tiene X líneas e Y columnas,

$k1(x,y)$ representa una matriz predeterminada que tiene P líneas y Q columnas,

$A_n(x,y)$ y $A_{n+m}(x,y)$ están definidas por las ecuaciones siguientes:

$$A_n(x,y) = I_n(x,y) - (I_n \otimes k1)(x,y)$$

$$A_{n+m}(x,y) = I_{n+m}(x,y) - (I_{n+m} \otimes k1)(x,y)$$

$I_n(x,y)$, $I_{n+m}(x,y)$ representan dos imágenes de transmisión sucesivas en los instantes n y n+m, siendo $I_n(x,y)$, $I_{n+m}(x,y)$ unas matrices de X líneas e Y columnas,

y el símbolo \otimes representa el producto de convolución definido por:

$$(F \otimes k1)(x,y) = \sum_{p=0}^P \sum_{q=0}^Q F(x-p, y-q) k1(p,q)$$

siendo $F(x,y)$ una matriz de X líneas e Y columnas,

siendo X, Y, P y Q unos números enteros que verifican $X \geq P \geq 1$ e $Y \geq Q \geq 1$.

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que el primer indicador ($Ind1_{n,n+m}$) se calcula con la ayuda de la ecuación siguiente:

$$Ind1_{n,n+m} = \frac{\sum_{x=1, y=1}^{N,M} \sqrt{C_n^2(x,y)} \sqrt{C_{n+m}^2(x,y)}}{\sqrt{\sum_{x=1, y=1}^{N,M} C_n^2(x,y)} \sqrt{\sum_{x=1, y=1}^{N,M} C_{n+m}^2(x,y)}}$$

en la que $Ind1_{n,n+m}$ representa el primer indicador,

$C_n(x,y)$ y $C_{n+m}(x,y)$ están definidos por las ecuaciones siguientes:

$$C_n(x,y) = I'_n(x,y) - \overline{I'_n}$$

$$C_{n+m}(x,y) = I'_{n+m}(x,y) - \overline{I'_{n+m}}$$

representando $I'_n(x,y)$, $I'_{n+m}(x,y)$ respectivamente una región predeterminada de dos imágenes de transmisión sucesivas en los instantes n y n+m, designando x e y las coordenadas de un punto de la imagen, siendo $I'_n(x,y)$, $I'_{n+m}(x,y)$ unas matrices que tienen N líneas y M columnas, y

representando $\overline{I'_n}$, $\overline{I'_{n+m}}$ un valor medio de las regiones predeterminadas respectivas $I'_n(x,y)$ e $I'_{n+m}(x,y)$.

11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el procedimiento comprende además una etapa (110) de mezcla del líquido (12) con un reactivo (206, 208) apto para generar una aglomeración de las partículas,

en el que cuando tiene lugar la etapa de cálculo (110), el indicador calculado es un segundo indicador ($Ind2$) para cada imagen adquirida ($I(x,y)$), siendo el segundo indicador ($Ind2$) representativo de la intensidad de los píxeles de la imagen ($I(x,y)$) en una región predeterminada de la imagen ($I(x,y)$), y

en el que el procedimiento comprende además una etapa de determinación de un estado de aglomeración de las partículas a partir del segundo indicador calculado ($Ind2$).

12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que se determina el estado de aglomeración cuando el segundo indicador ($Ind2$) sobrepasa un umbral predeterminado.

13. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que se determina el estado de aglomeración cuando el segundo indicador ($Ind2$) sobrepasa un indicador de referencia ($Ind2_{ref}$), obtenido por una imagen realizada en una zona de referencia.

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que las partículas sanguíneas son unos glóbulos rojos, el reactivo (206, 208) comprende un anticuerpo, y se determina además una información relativa al grupo sanguíneo a partir del estado de aglomeración.
- 5 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que el líquido (12) comprende un analito, comprendiendo el procedimiento entonces la estimación de la cantidad de dicho analito en el líquido (12), en función de dicho segundo indicador (Ind2).
- 10 16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cámara fluídica (14) comprende varios canales (202, 204) de circulación del fluido, y en el que, cuando tiene lugar la etapa de cálculo (140), se calcula un indicador (Ind1_{n,n+m}, Ind2) para cada uno de los canales (202, 204).
- 15 17. Sistema (10) de caracterización de una variación de la velocidad de partículas o de una aglomeración de partículas, estando las partículas, tales como unas partículas sanguíneas, contenidas en un líquido (12), comprendiendo el sistema (10):
- una cámara fluídica (14) destinada a recibir el líquido (12);
 - 20 - una fuente de luz (16) apropiada para emitir un haz luminoso de excitación (18) para iluminar la cámara fluídica (14), extendiéndose el haz luminoso (18) a través de la cámara fluídica (14) según una dirección longitudinal (X);
 - un fotodetector matricial (20) apropiado para adquirir por lo menos dos imágenes (I_{n(x,y)}, I_{n+1(x,y)}, I(x,y)) de una radiación transmitida por la cámara fluídica (14) iluminada; y
 - 25 - una unidad de tratamiento de informaciones (21) que comprende unos medios de cálculo (36, 38) adaptados para calcular, a partir de las imágenes adquiridas (I_{n(x,y)}, I_{n+1(x,y)}, I(x,y)), por lo menos un indicador (Ind1_{n,n+m}, Ind2) que caracteriza la variación de la velocidad o la aglomeración de las partículas;
- 30 caracterizado por que el fotodetector (20) está dispuesto a una distancia (D2) inferior a 1 cm de la cámara fluídica según la dirección longitudinal (X).
18. Sistema (10) según la reivindicación 17, en el que el fotodetector matricial (20) comprende una pluralidad de píxeles, presentando cada píxel unas dimensiones cada una inferiores o iguales a 4 μm.

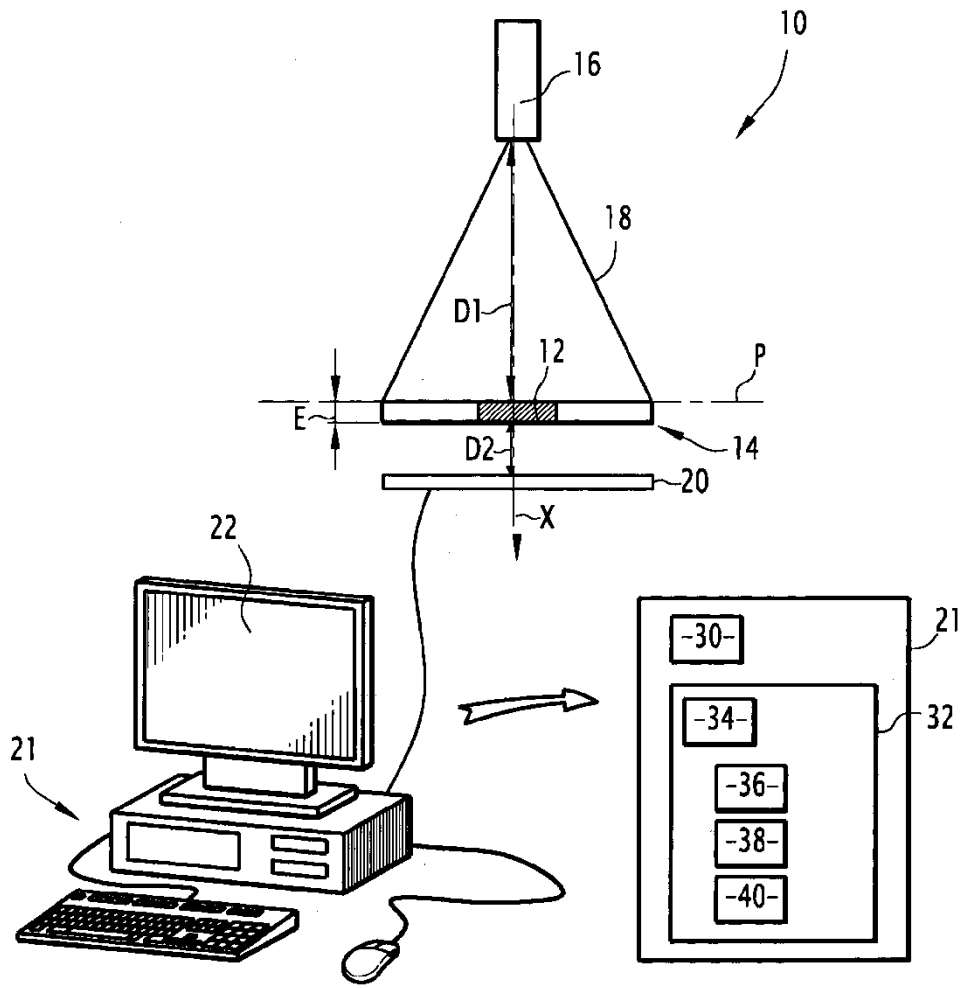


FIG.1

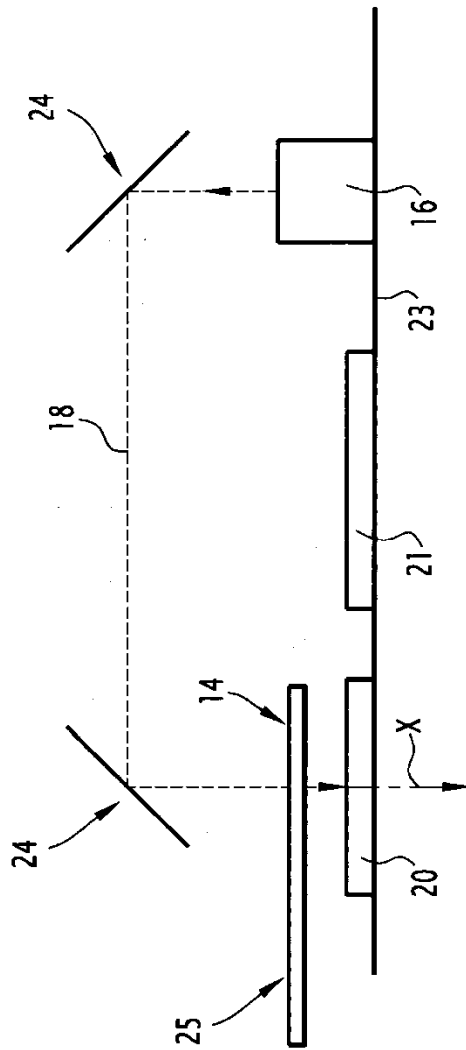


FIG.2

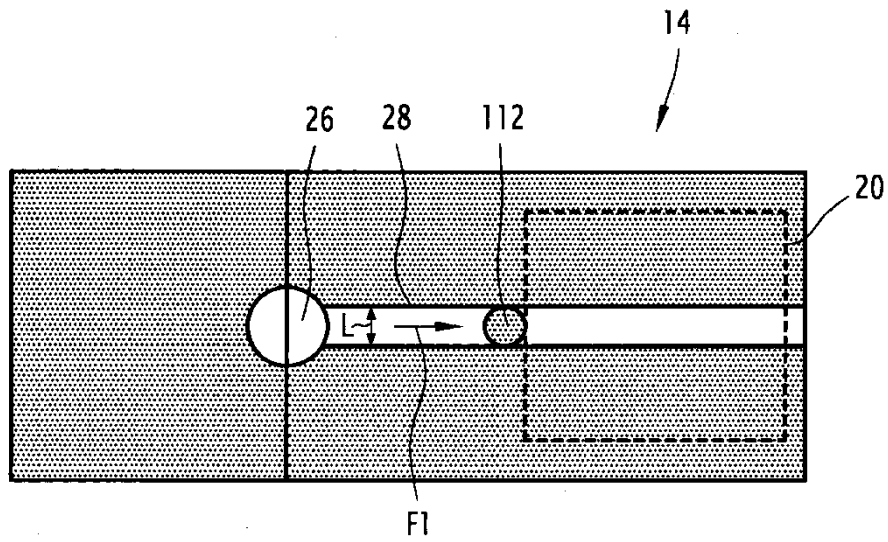


FIG. 3

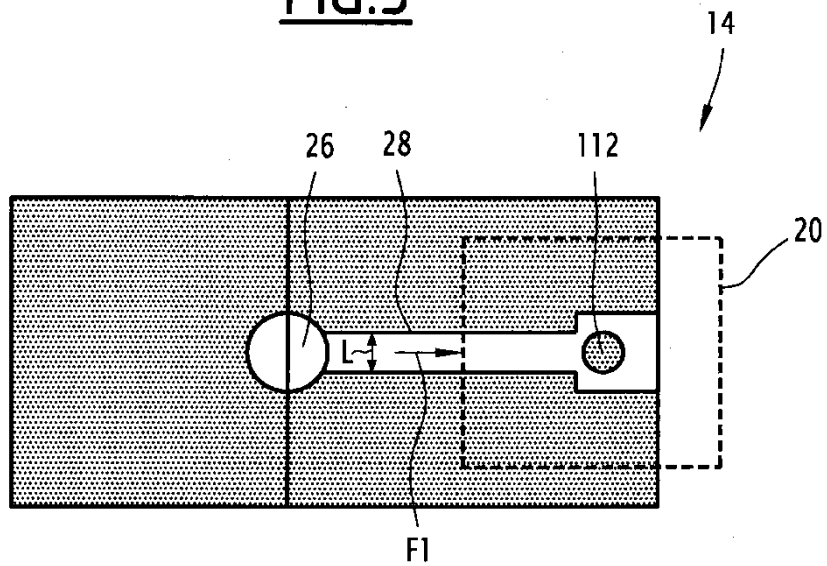


FIG. 4

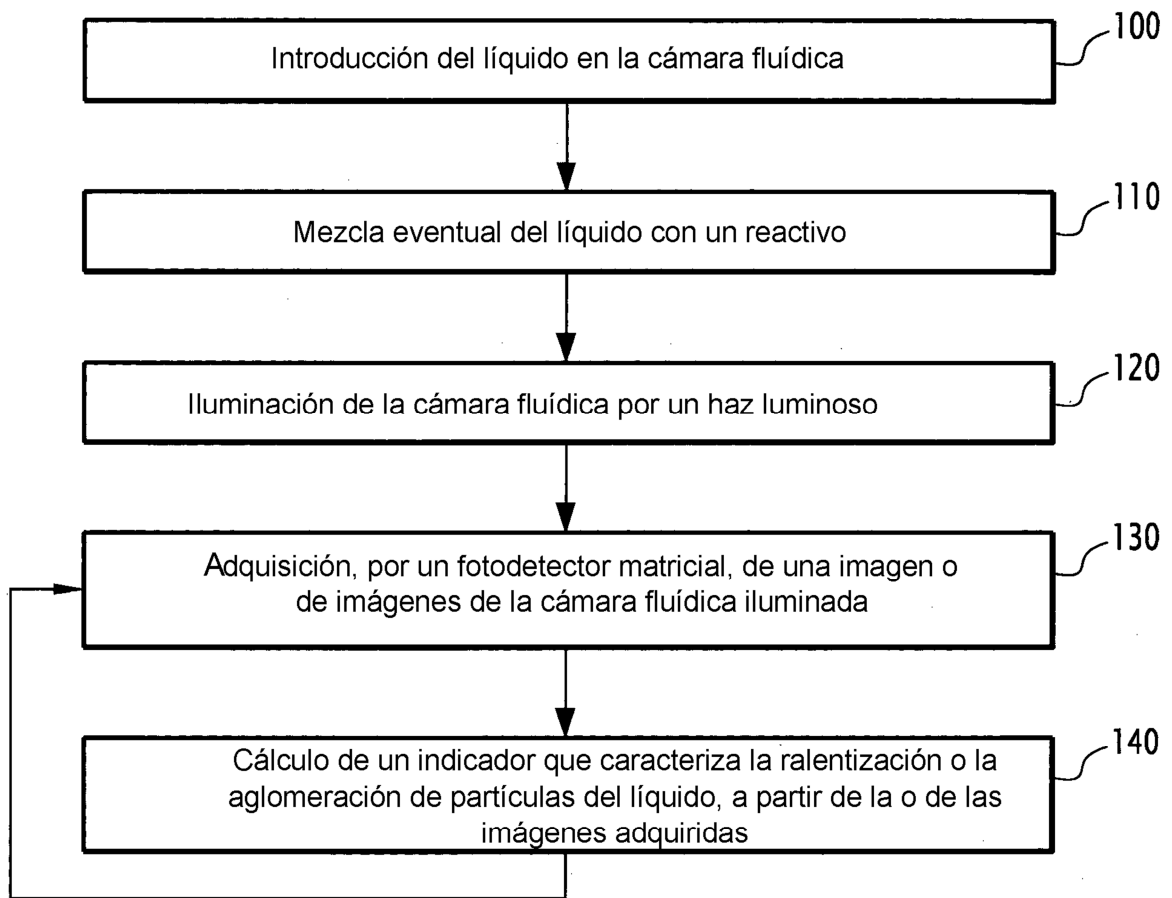
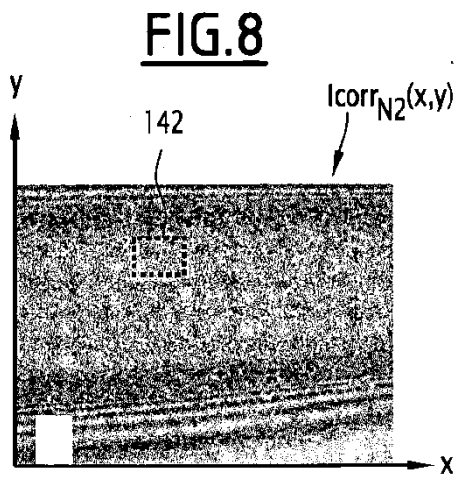
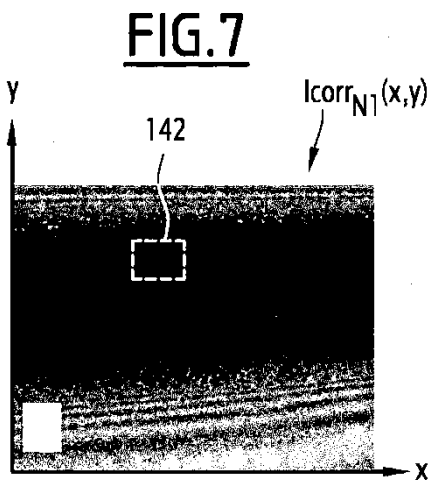
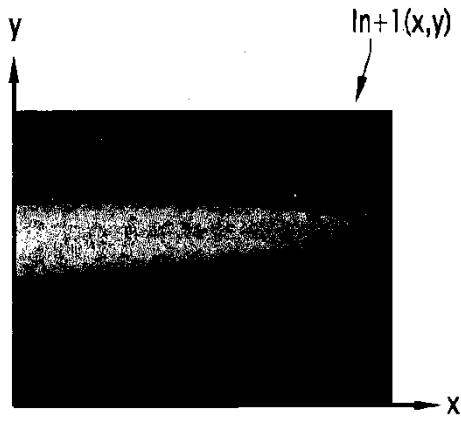
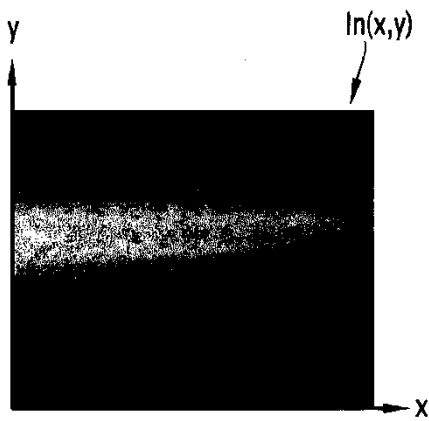
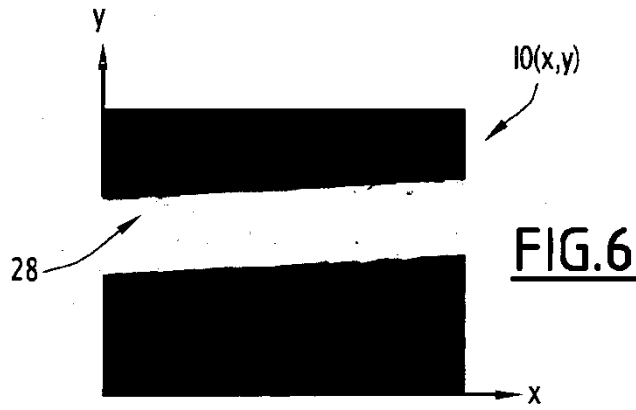


FIG.5



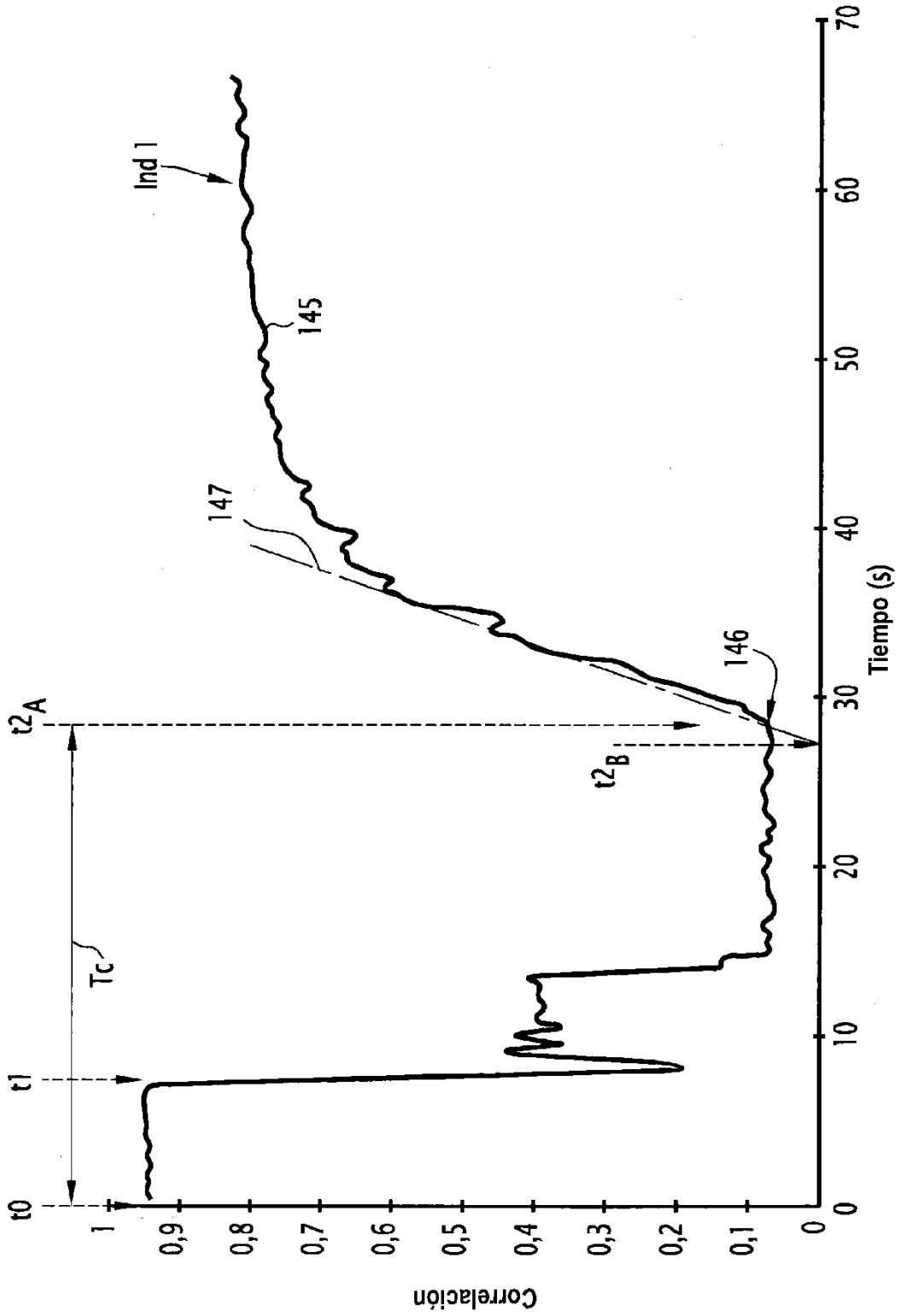


FIG.11

Grupo sanguíneo del paciente

200

Anticuerpo depositado		A	B	AB	O
Anti-A Suero B		X		X	
Anti-B Suero A			X	X	

X = agregación celular

FIG.12

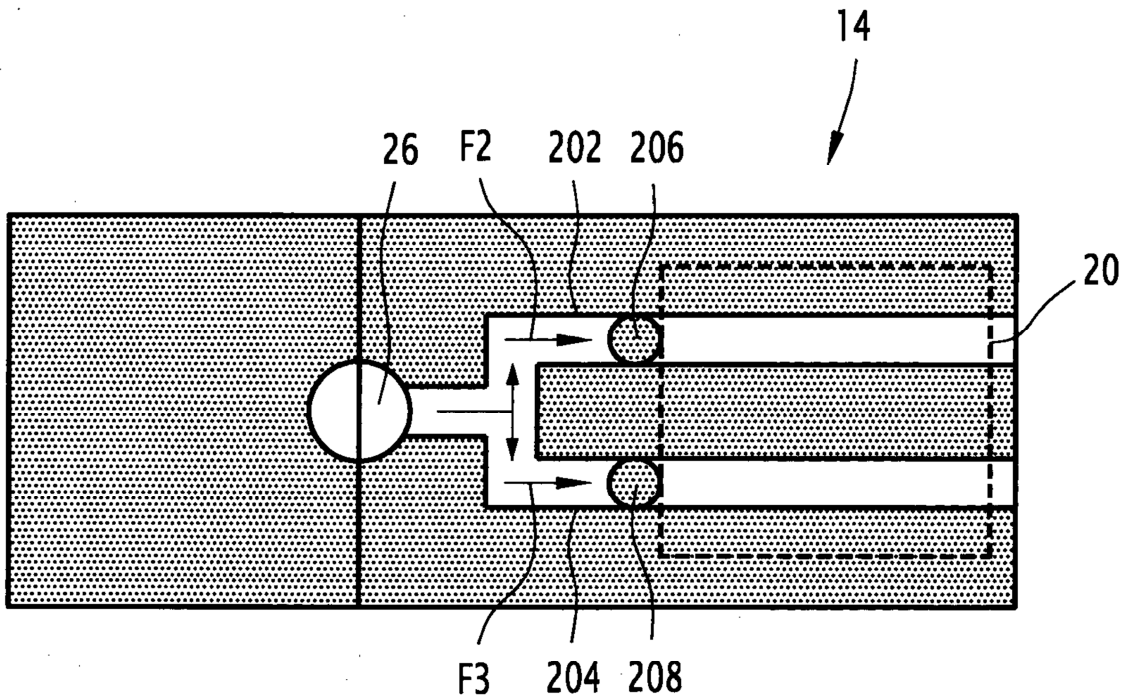


FIG.13

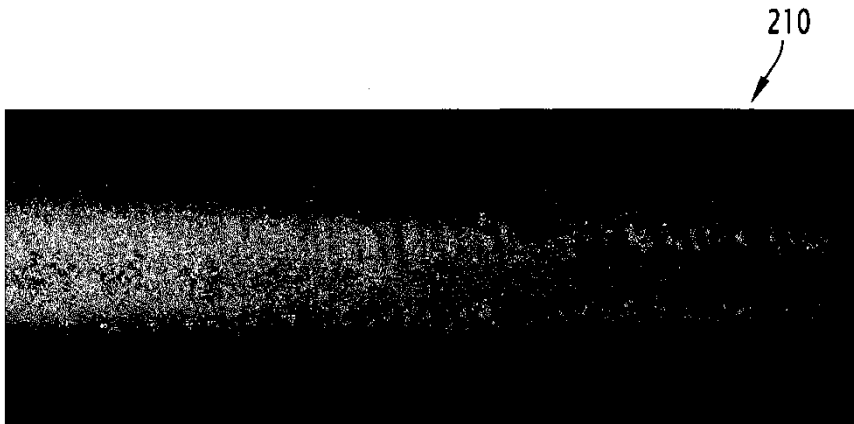


FIG.14

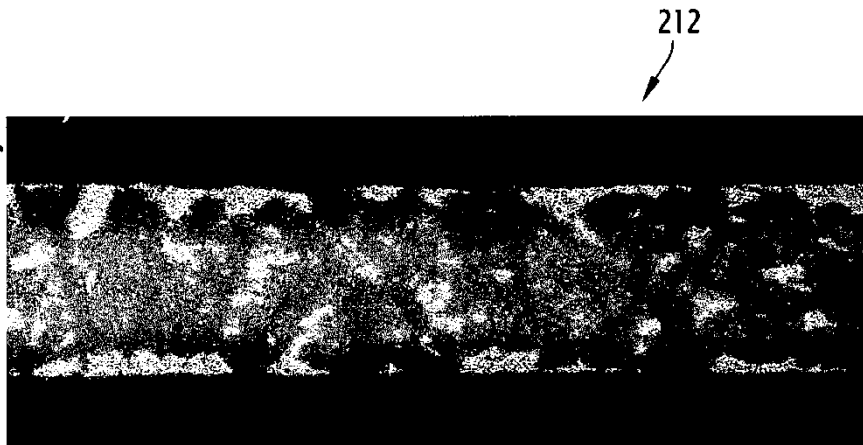


FIG.15

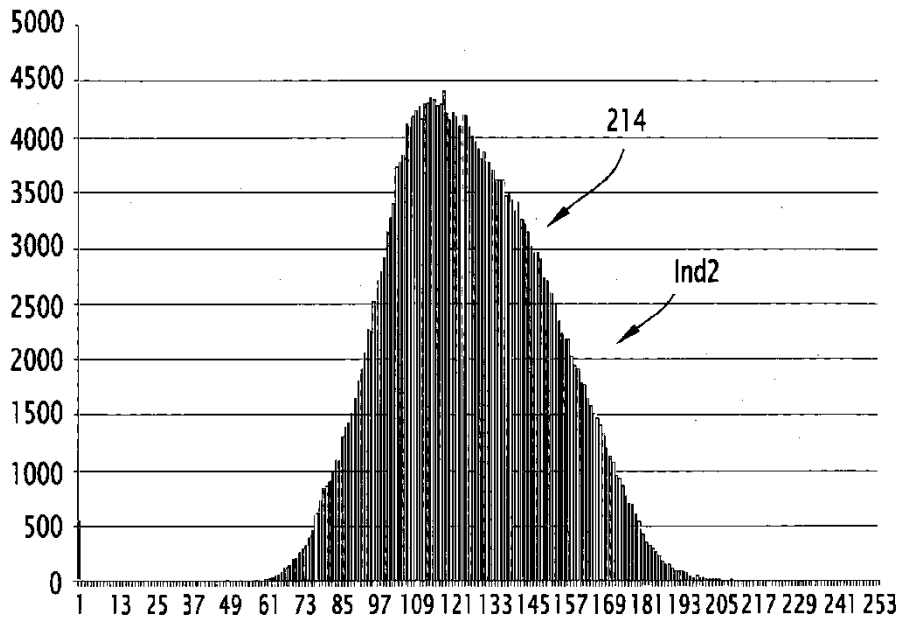


FIG.16

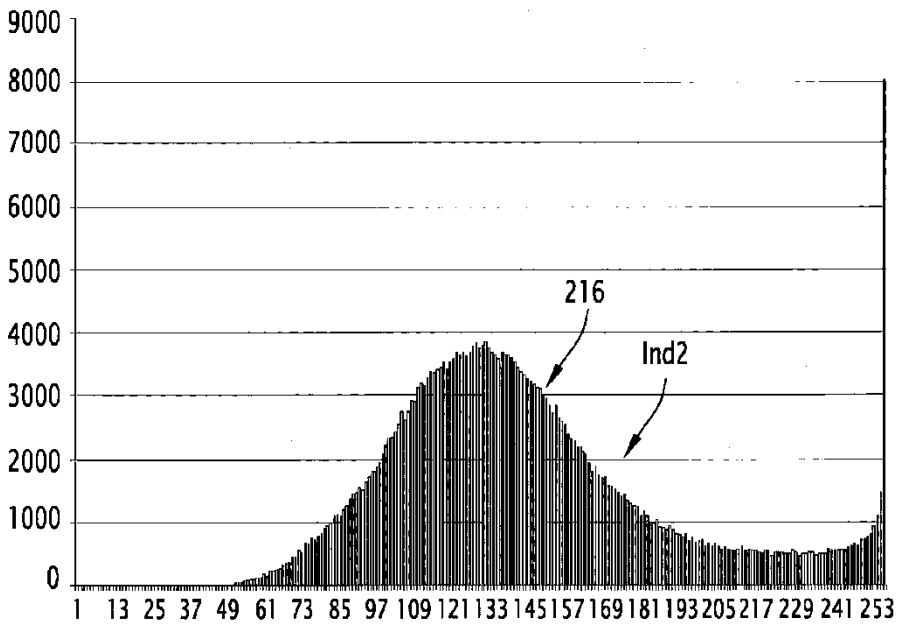


FIG.17

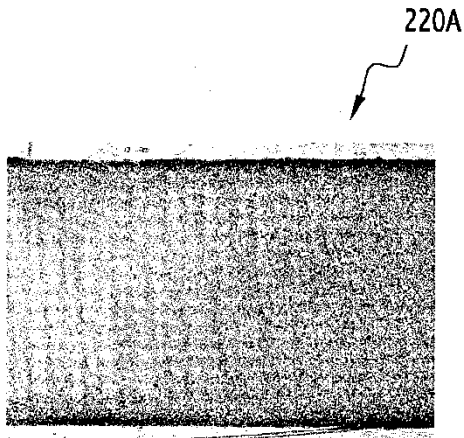


FIG.18

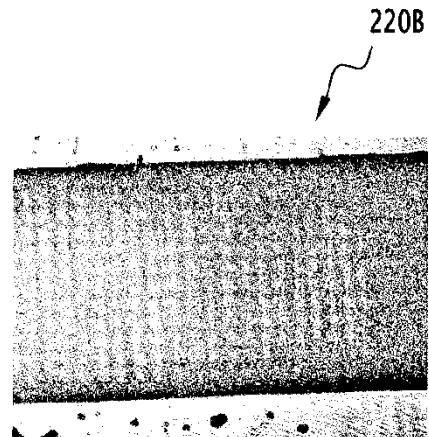


FIG.19

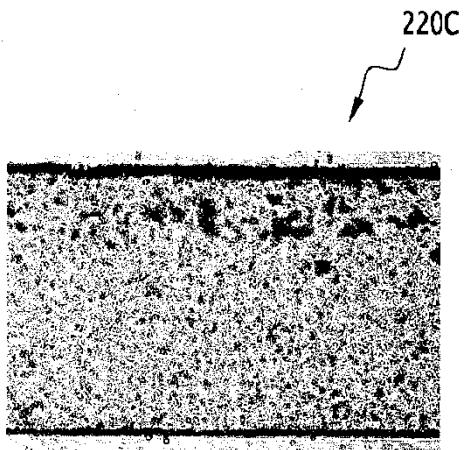


FIG.20

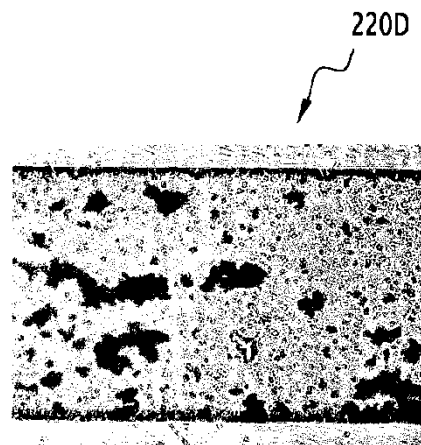


FIG.21

222A



FIG.22

222B

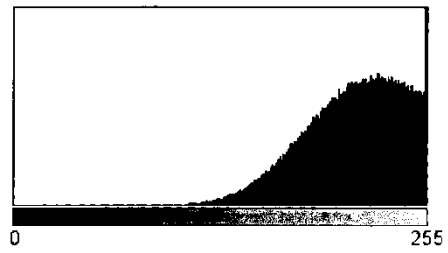


FIG.23

222C

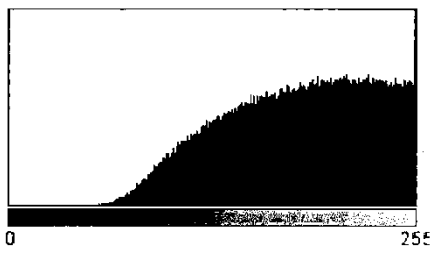


FIG.24

222D

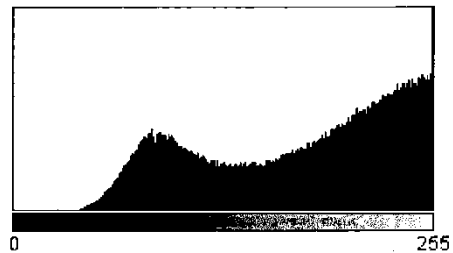


FIG.25

224A

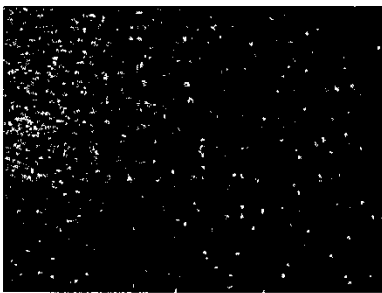


FIG.26

224B

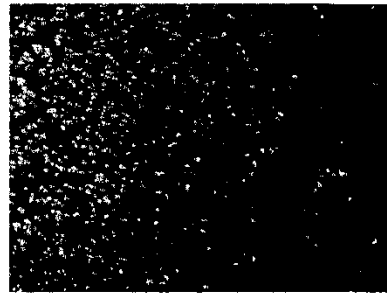


FIG.27

224C

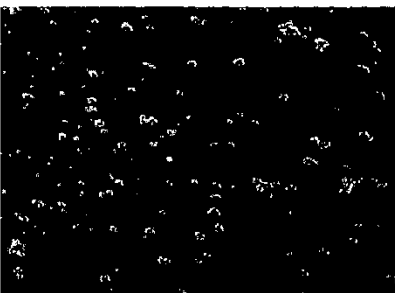


FIG.28

224D



FIG.29

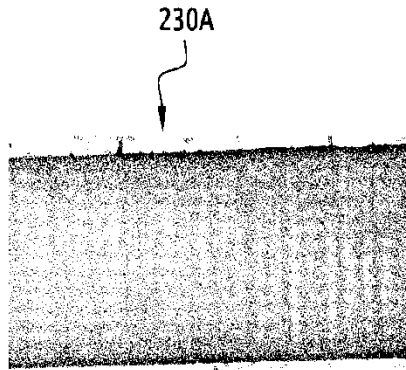


FIG.30

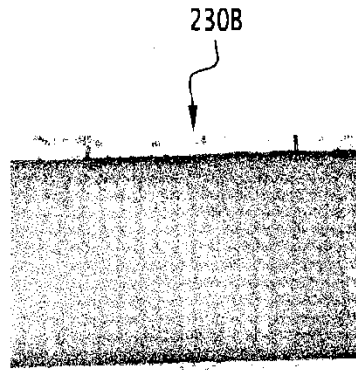


FIG.31

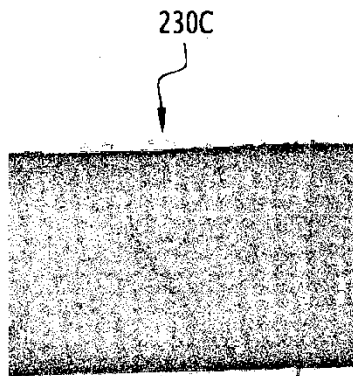


FIG.32

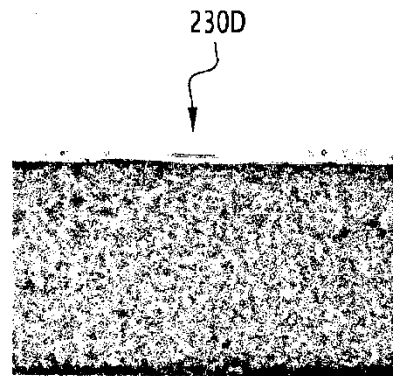


FIG.33

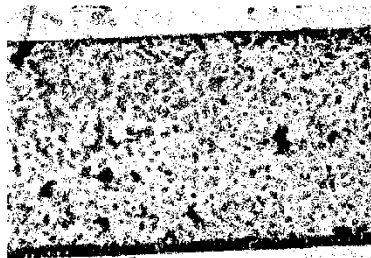


FIG.34

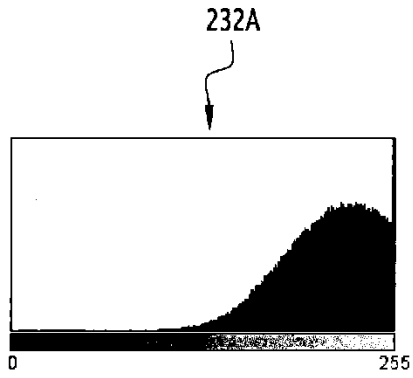


FIG.35

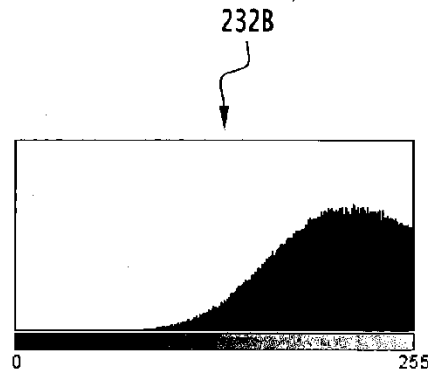


FIG.36

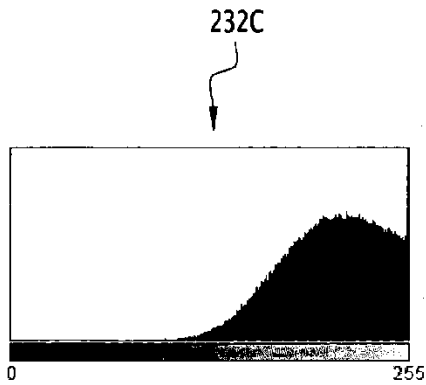


FIG.37

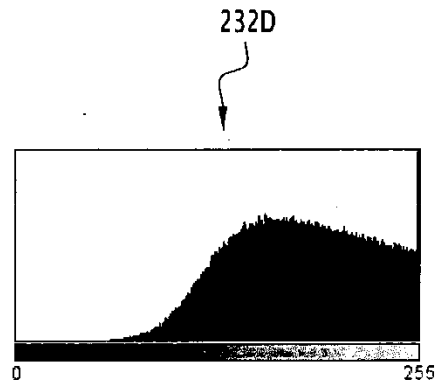


FIG.38

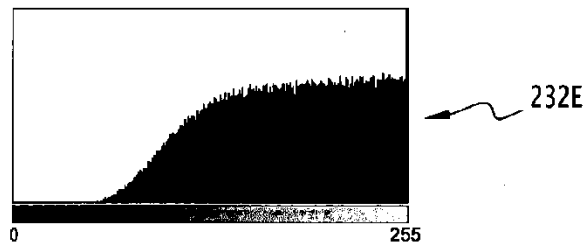


FIG.39

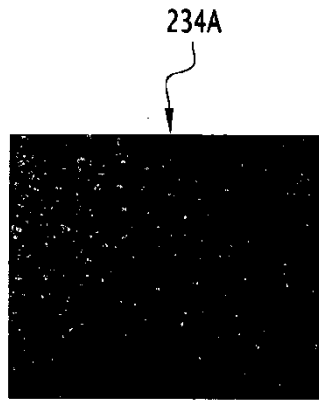


FIG.40

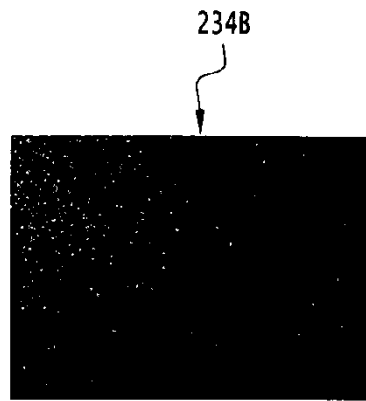


FIG.41

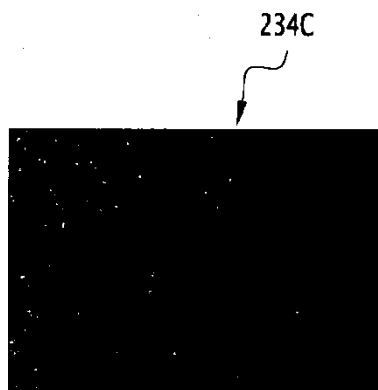


FIG.42

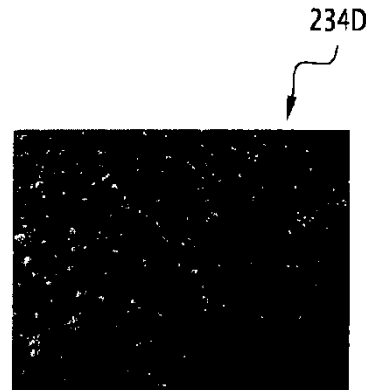


FIG.43

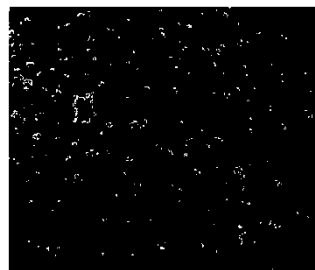


FIG.44

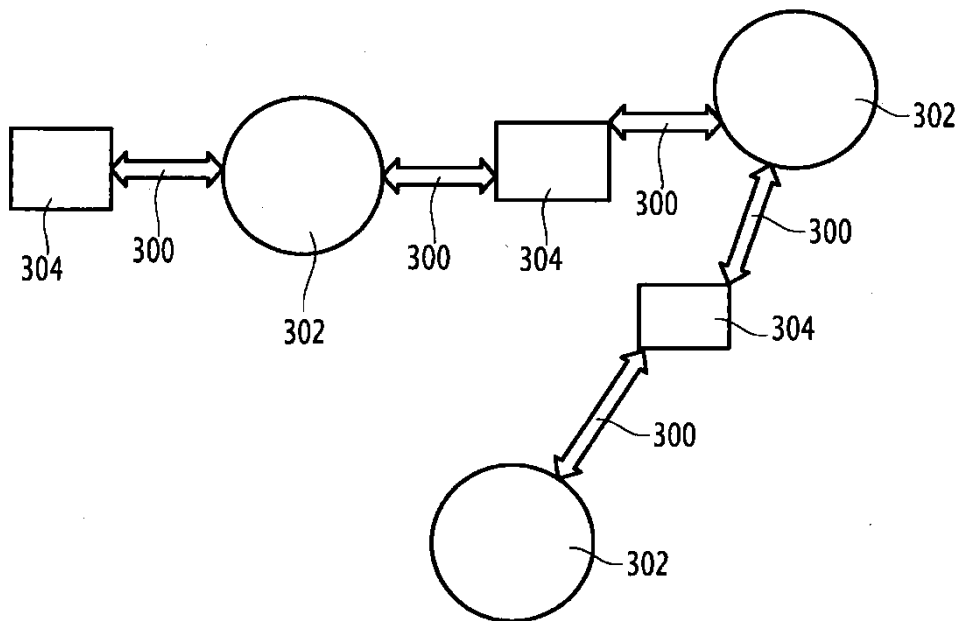


FIG.45