

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 125**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2012 E 12821354 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2015 EP 2798352**

54 Título: **Método y aparato para la identificación automatizada de plaquetas en una muestra de sangre completa a partir de imágenes de microscopio**

30 Prioridad:

**30.12.2011 US 201161581887 P**

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

**22.01.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**YU, CHANGHUA;  
XIE, MIN y  
WU, YIMING**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 557 125 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Método y aparato para la identificación automatizada de plaquetas en una muestra de sangre completa a partir de imágenes de microscopio

5 Antecedentes de la invención

1. Campo técnico

10 La presente invención se refiere a métodos y a aparatos para realizar análisis en muestras de sangre completa a partir de imágenes de microscopio en general, y a la versión automatizada de los mismos que comportan plaquetas en particular.

Antecedentes

15 Los diagnósticos médicos a menudo incluyen el análisis de una muestra de sangre completa de un paciente. Uno de los diagnósticos más habituales es un conteo sanguíneo completo (denominado "CSC"), que es un conjunto de pruebas que incluye un "conteo de plaquetas" (es decir, un conteo de trombocitos). El conteo de plaquetas es realmente una determinación de concentración; es decir, el número de plaquetas por volumen. En un adulto, un  
 20 conteo de plaquetas normal varía generalmente entre aproximadamente 150.000 y 450.000 plaquetas por microlitro de sangre. Un conteo de plaquetas anormal puede ser indicio de un problema de salud; por ejemplo, infección, enfermedad, etc. Si los niveles plaquetarios caen por debajo de 20.000 por microlitro, puede producirse un sangrado espontáneo y se considera un riesgo potencialmente mortal.

25 Tradicionalmente, los conteos de plaquetas se han realizado o bien untando una pequeña cantidad de sangre no diluida en un portaobjeto o mediante citometría de flujo. En el caso del portaobjeto, la muestra se aplica a un portaobjeto y las plaquetas y otros componentes que residen en el portaobjeto se cuentan. El conteo de plaquetas (es decir, las plaquetas por volumen en la muestra) se calcula en función de los componentes relativos en la  
 30 muestra.

Para realizar un conteo de plaquetas por impedancia o citometría de flujo óptica, la muestra de sangre debe diluirse y después enviarse a través de un recipiente pequeño en el que los sensores de impedancia u ópticos puedan  
 35 evaluar las células componentes en la muestra a medida que atraviesan el recipiente en serie. La exactitud de estos dispositivos puede sufrir, dependiendo de los componentes presentes en la muestra. En un conteo por impedancia, por ejemplo, los fragmentos de glóbulos rojos pueden interpretarse y contarse como plaquetas, y las plaquetas gigantes pueden interpretarse y contarse como glóbulos rojos (hematíes). En ambos casos, la exactitud del conteo de plaquetas automatizado sufre. Además, la dilución de la muestra debe ser precisa o la exactitud se ve afectada negativamente, y la muestra diluida debe desecharse adecuadamente después del análisis. El circuito interno necesario para manipular la muestra diluida suele requerir mantenimiento y en el mejor de los casos contribuye  
 40 notablemente a la complejidad y el coste del dispositivo.

El documento US 2009/238439 A1 desvela un método para detectar y contar plaquetas, individualmente y en grupos globales.

45 Lo que se necesita es un aparato y método para realizar análisis automatizados sobre una muestra de sangre completa, incluido un conteo de plaquetas, que pueda superar las limitaciones de la técnica anterior, incluido el tiempo necesario para realizar el análisis, el nivel de conocimientos del operador necesario para realizar el análisis, y que pueda proporcionar una mayor versatilidad que los métodos y aparatos conocidos de la técnica anterior.

50 Sumario de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para identificar plaquetas en una muestra de sangre completa como se reivindica en la reivindicación 1.

55 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un aparato para identificar plaquetas en una muestra de sangre completa como se reivindica en la reivindicación 10.

Pueden determinarse diferencias de intensidad en regiones locales dentro de una imagen.

60 Puede representarse la intensidad del plasma en una imagen.

Los candidatos plaquetarios se evalúan utilizando un contraste direccional de una diferencia de intensidad.

Puede evaluarse la imagen para determinar una presencia de uno o varios grupos de plaquetas en la muestra.

65

Pueden identificarse y analizarse candidatos plaquetarios en la imagen utilizando un clasificador basado en reglas que utilice una pluralidad de características cuantitativas.

5 Los aspectos de la presente invención descritos anteriormente y las realizaciones pueden utilizarse individualmente o combinados entre sí, y la presente invención no se limita a ninguna configuración particular. Estos y otros aspectos, realizaciones, características y ventajas de la presente invención serán evidentes teniendo en cuenta la descripción detallada de la invención que se proporciona a continuación, y tal como se ilustra en los dibujos adjuntos.

10 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una vista esquemática de un dispositivo de análisis que puede realizar un análisis plaquetario de acuerdo con la presente invención.

15 La Figura 2 es una vista en perspectiva de un cartucho de análisis que tiene una cámara de análisis que puede utilizarse con la presente invención.

La Figura 3 es una vista despiezada del cartucho mostrado en la Figura 2

La Figura 4 es una vista planar desde arriba de una bandeja que sujeta una cámara de análisis.

La Figura 5 es una vista esquemática en sección de una cámara de análisis.

20 La Figura 6 es una imagen que muestra plaquetas y glóbulos blancos en una muestra bajo imagen fluorescente.

La Figura 7 es una imagen que muestra una interfaz de línea de cola / muestra.

La Figura 8 es una imagen que muestra una interfaz de muestra / aire.

La Figura 9 es una imagen de una región de entrada de la muestra de una cámara.

La Figura 10 es una ilustración esquemática del contraste direccional de la intensidad en una plaqueta.

25 Las Figuras 11 a-11c son ilustraciones esquemáticas de distribuciones de Gauss de la intensidad de la imagen en un candidato plaquetario.

La Figura 12 es una imagen que muestra una perla en una muestra bajo captación de imagen fluorescente.

La Figura 13 es una vista esquemática de un candidato plaquetario en un cuadro delimitador de una cuadrícula ortogonal.

30 La Figura 14 es una vista esquemática del candidato plaquetario que se muestra en la Figura 14, colocado ahora en una envoltura conexas.

La Figura 15 es un diagrama de flujo que ilustra una realización del presente método para identificar plaquetas en una muestra mediante imágenes de la muestra.

35 Descripción detallada de la invención

Haciendo referencia a las Figuras 1 y 2, los aspectos de la presente invención incluyen un método y un aparato para identificar y enumerar plaquetas en una muestra de sangre que reside de forma quiescente en una cámara de análisis. La cámara de análisis se incluye generalmente en un cartucho 20 que se configura para su uso con un dispositivo de análisis 22 automatizado, dispositivo que tiene hardware de captación de imágenes y un analizador programable adaptado para adquirir y analizar imágenes de la muestra y, por tanto, identificar y enumerar plaquetas en la muestra.

45 Haciendo referencia a las Figuras 2-5, la presente invención no se limita al uso con cualquier realización de cámara de análisis particular. Ejemplos de cámaras de análisis aceptables (y los cartuchos que las acompañan) se describen en la patente de Estados Unidos n.º 7.850.916, y las solicitudes de patente estadounidense con n.º de serie 12/971.860; 13/341.618; y 13/594.439. Para los fines de esta divulgación, se describirá la invención como si utilizara el cartucho y la cámara de análisis descritos en la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 13/594,439. La cámara de análisis 24 desvelada en la Solicitud '439 incluye un miembro planar 26 superior y un miembro planar 28 de base fijado a una bandeja 30 que se monta de forma desmontable en el cartucho 20. En algunas realizaciones, una pluralidad de perlas 31 separadoras (por ejemplo, perlas de tamaño uniforme) se colocan entre los miembros planares 26, 28 superior y de base, generalmente en contacto con las superficies opuestas de los miembros planares. La Figura 2 muestra el cartucho 20 en forma montada. La Figura 3 muestra una vista despiezada del cartucho 20, que incluye la cámara de análisis 24 y la bandeja 30. La Figura 4 es una vista desde arriba de la cámara de análisis 24 montada sobre la bandeja 30, y muestra una vista plana X-Y de la cámara 24. La

55 La Figura 5 es una vista transversal esquemática de la cámara 24, que ilustra una vista plana Z-X de la cámara 24. La altura 32 de la cámara 24 se extiende a lo largo del eje Z, extendiéndose entre las superficies interiores opuestas 34, 36 de los miembros planares. Para los análisis de muestras de sangre completa, la altura 32 de la cámara 24 es preferentemente de aproximadamente cuatro micrones (4µm), pero la cámara 24 no se limita a dicha altura.

60 Haciendo referencia a la Figura 1, un dispositivo de análisis 22 que puede usarse con la cámara 24 descrita anteriormente, incluye generalmente una lente objetivo 34, un posicionador 36 del cartucho, uno o varios iluminadores 38 de la muestra, uno o varios disectores 40 de la imagen, y un analizador 42 programable. Uno o ambos de la lente objetivo 34 y el posicionador 36 del cartucho pueden acercarse o alejarse entre sí para cambiar una posición focal relativa del dispositivo relativo a la cámara 24 y la muestra colocada en el interior.

65

El iluminador 38 de la muestra ilumina la muestra utilizando luz desde longitudes de onda predeterminadas. Por ejemplo, el iluminador 38 de la muestra puede incluir una fuente de luz de epifluorescencia y una fuente de luz de transmisión. Como se explicará más adelante, un colorante tal como Naranja de Acridina (también denominado "Naranja Básico 15" o "NDA") emite luz a longitudes de onda particulares cuando se mezcla con sangre completa y se somete a una longitud de onda de excitación desde la fuente de luz epifluorescente, una fuente que habitualmente produce luz en el intervalo de aproximadamente 450-490 nm. Una longitud de onda de excitación a aproximadamente 470 nm es particularmente útil. La fuente de luz de transmisión puede producir luz a longitudes de onda asociadas con luz roja y verde, por ejemplo. La luz roja se produce generalmente en el intervalo de aproximadamente 600-700 nm, prefiriéndose luz roja a aproximadamente 660 nm. La luz verde se produce generalmente en el intervalo de aproximadamente 515-570 nm, prefiriéndose luz verde a aproximadamente 540 nm. La luz transmitida a través de la muestra, o que fluoresce desde la muestra, se captura utilizando el disector 40 de la imagen, y una señal representativa de la luz capturada se envía al analizador 42 programable, donde se procesa en una imagen. La imagen se produce de una forma que permite determinar la transmitancia luminosa o la intensidad de fluorescencia capturada dentro de la imagen sobre una base unitaria; por ejemplo, siendo "sobre una base unitaria" una unidad incremental de la cual puede diseccionarse la imagen de la muestra, tal como un píxel.

Un ejemplo de un disector 40 de la imagen aceptable es un sensor de imagen de tipo dispositivo de acoplamiento de carga (CCD) que convierte la luz que pasa a través de (o desde) la muestra en una imagen con formato de datos electrónicos. Los sensores de imagen del tipo semiconductores complementarios de óxido metálico ("CMOS") son otro ejemplo de un sensor de imagen que puede utilizarse. Las señales del disector 40 de la imagen proporcionan información para cada píxel de la imagen, información que incluye, o que puede obtenerse para incluir, intensidad, longitud de onda y densidad óptica. A los valores de Intensidad se les asigna una escala arbitraria de, por ejemplo, 0 unidades a 4095 unidades ("UVI"). La densidad óptica ("DO") es una medida de la cantidad de luz absorbida en relación con la cantidad de luz transmitida a través de un medio; por ejemplo, cuanto mayor sea el valor "DO", mayor es la cantidad de luz absorbida durante la transmisión. La DO puede describirse cuantitativamente en unidades de densidad óptica ("UDO") o fracciones de las mismas; por ejemplo, una MiliUDO es un  $1/1000^{\circ}$  de una UDO. Una unidad de "DO" disminuye la intensidad de la luz en un 90 %. Una "UDO" o "MiliUDO" como valor cuantitativo puede utilizarse para imágenes adquiridas u obtenidas mediante luz de transmisión. La información del disector 40 de la imagen puede separarse en múltiples canales. Por ejemplo, la información del disector 40 de la imagen puede separarse en tres canales. Sin embargo, la presente invención no se limita a una realización de tres canales. Un primero de los tres canales puede dirigirse hacia la información relativa a la luz emitida desde la muestra a una primera longitud de onda (por ejemplo, 540 nm, que aparece verde). Un segundo canal puede dirigirse hacia la información relativa a la luz emitida desde la muestra a una segunda longitud de onda (por ejemplo, 660 nm, que aparece roja). Un tercer canal puede dirigirse hacia la información relativa a la luz que atraviesa la muestra a una tercera longitud de onda (por ejemplo, 413 nm, que se utiliza para determinar densidad óptica – "DO" – azul). La presente invención no se limita a estas longitudes de onda o número de canales en particular.

El analizador 42 programable incluye una unidad central de proceso (CPU) y está en comunicación con el posicionador 36 del cartucho, el iluminador 38 de la muestra, y el disector 40 de la imagen. El analizador 42 programable se adapta (por ejemplo, se programa) para enviar y recibir señales desde uno o varios del posicionador 36 del cartucho, el iluminador 38 de la muestra, y un disector 40 de la imagen. Por ejemplo, el analizador 42 se adapta para: 1) enviar y recibir señales desde el posicionador 36 del cartucho para situar el cartucho y la cámara 24 relativos a uno o varios de los sistemas ópticos, el iluminador 38, y el disector 40 de la imagen; 2) enviar señales al iluminador 38 de la muestra para producir luz a longitudes de onda definidas (o, como alternativa, a múltiples longitudes de onda); y 3) enviar y recibir señales desde el disector 40 de la imagen para capturar luz por periodos de tiempo definidos. Cabe señalar que la funcionalidad del analizador 42 programable puede implementarse utilizando hardware, software, firmware, o una combinación de los mismos. Un experto en la materia sería capaz de programar la unidad de proceso para realizar la funcionalidad descrita en el presente documento sin excesiva experimentación.

El analizador 42 programable también se adapta para procesar las señales recibidas desde el disector 40 de la imagen de acuerdo con algoritmos que identifican plaquetas dentro de la imagen de la muestra, y para distinguir plaquetas de características de la imagen que son similares a las plaquetas, pero no son plaquetas, y de características de fondo que ocultan las plaquetas.

El dispositivo de análisis 22 se adapta para captar la imagen de una muestra de sangre completa sustancialmente no diluida colocada dentro de la cámara de análisis 24. La muestra se mezcla con una cantidad de colorante fluorescente (u otro colorante) que puede teñir las plaquetas contenidas dentro de la muestra. La adición y mezcla del colorante con la muestra puede producirse en cualquier momento antes de la captación de la imagen de la muestra; por ejemplo, mezclarse en los canales del cartucho antes de pasar al interior de la cámara 24 por flujo capilar. El colorante impregna y tiñe las respectivas plaquetas. El colorante, tras la excitación, produce una emisión de luz fluorescente a longitudes de onda particulares asociadas con colores particulares. El color o los colores específicos y la intensidad de la luz emitida por el colorante dentro de la plaqueta son habitualmente una función de una serie de factores, incluidos: la concentración del colorante dentro de la plaqueta, y el pH de la plaqueta. Como se describirá más adelante, la emisión de luz fluorescente produce regiones de emisión máxima localizadas que representan la plaqueta desde la cual se están emitiendo.

Un ejemplo de un colorante aceptable que puede utilizarse al realizar un conteo de plaquetas en una muestra de sangre completa es Naranja de Acridina ("NDA"). NDA es un colorante fluorescente que, al mezclarse con una muestra de sangre completa, tiñe las plaquetas (y los leucocitos 50 y reticulocitos) dentro de la muestra. La presente invención no se limita a utilizar NDA, y pueden utilizarse otros colorantes (por ejemplo, Naranja Astrazón) en lugar de NDA o en combinación con NDA. Utilizando NDA como un ejemplo, si la muestra se somete a una luz de excitación a, o aproximadamente a, una longitud de onda de 470 nm, la NDA dentro de la plaqueta emitirá luz a aproximadamente 540 nm (que aparece en verde) y luz a aproximadamente 660 nm (que aparece en rojo).

Para realizar el conteo de plaquetas, el analizador 42 se adapta (por ejemplo, se programa con un algoritmo) para dirigir el iluminador 38 de la muestra para iluminar la muestra que reside de forma quiescente dentro de la muestra con luz de excitación (por ejemplo, luz a aproximadamente 470 nm) y luz de transmisión (por ejemplo, luz a aproximadamente 413 nm y a aproximadamente 660 nm). Tras encontrar la luz de excitación, el colorante fluorescente dentro de cada plaqueta emite luz verde a aproximadamente 540 nm y luz roja a aproximadamente 660 nm. La luz fluorescente emitida desde la muestra y la luz de transmisión que atraviesa la muestra se captura utilizando el disector 40 de la imagen, y una señal representativa de la luz capturada se envía al analizador 42 programable, donde se procesa en una imagen. La imagen se produce de una forma que permite que la intensidad de fluorescencia y transmisión capturada dentro de la imagen se determine sobre una base unitaria.

El analizador 42 programable se adapta para recoger señales de los datos de la imagen desde el disector 40 de la imagen y procesar dichas señales de los datos de la imagen para facilitar la identificación de las plaquetas mostradas dentro de la imagen. El analizador 42 programable también se adapta para determinar el volumen de la muestra que reside de forma quiescente dentro de la cámara de análisis 24. Por ejemplo, el algoritmo se adapta para identificar perímetros de la muestra dentro de la cámara 24 tal como interfaces de línea de cola 44 / muestra 46 (por ejemplo, ver la Figura 7), líneas de cola 44 que forman límites laterales de la cámara 24, e interfaces 49 muestra 46 / aire 48 (por ejemplo, ver la Figura 8) que existen habitualmente en los bordes de la muestra 46 que no encuentran una línea de cola 44. La altura 32 de la cámara 24 se conoce o puede determinarse. Una vez determinada el área de la cámara 24 ocupada por la muestra 46 (por ejemplo, cada píxel de la imagen tiene un área de la cámara asociada), puede determinarse el volumen de la muestra utilizando el área de la muestra y la altura asociadas con la cámara 24.

En algunas realizaciones las señales de los datos de la imagen se procesan inicialmente con un algoritmo de suavizado que filtra las señales para hacer las partes del fondo de la imagen más uniformes. Un ejemplo de un algoritmo de suavizado aceptable es el que aplica un filtro morfológico (por ejemplo, un filtro de apertura de imagen) a los datos de la imagen. El filtro puede aliviar algunas variaciones del fondo y puede utilizarse para suprimir objetos brillantes grandes de la imagen tales como glóbulos blancos 50 ("leucocitos"). Los leucocitos 50 pueden aparecer como picos de intensidad debido al material contenido dentro de los leucocitos 50 (por ejemplo, ARN, ADN) que resalta el colorante utilizado para resaltar las plaquetas. La Figura 6 ilustra plaquetas 52 y leucocitos 50 dentro de una imagen. Sin embargo, los leucocitos 50 pueden distinguirse de las plaquetas 52 en base a su gran intensidad de luz en comparación con las plaquetas 52. Suprimir los leucocitos 50 de la imagen (por ejemplo, mediante un proceso de segmentación) facilita la identificación de las plaquetas 52.

Los datos de la imagen también se analizan para identificar picos de intensidad local. Este proceso de identificación de picos locales puede realizarse antes o después del proceso de "suavizado", pero realizar la etapa de suavizado en primer lugar elimina algunas posibles fuentes de error antes de la determinación de la intensidad de picos locales. Sin embargo, esta etapa de suavizado no es obligatoria. La identificación de los picos de intensidad local en una o varias longitudes de onda definidas puede realizarse utilizando una diversidad de técnicas diferentes. Como se describirá más adelante, la intensidad de la imagen puede variar sustancialmente por toda la muestra, pudiendo atribuirse las variaciones a factores tales como la variación de la intensidad del plasma, la proximidad de la línea de cola, la concentración de leucocitos, la concentración de hemáties, etc. La exactitud de la identificación de plaquetas se mejora evaluando cuantitativamente las diferencias de intensidad (es decir, los picos) de forma local. El término "local", como se utiliza en el presente documento, se refiere a pequeñas áreas definidas dentro de la muestra que residen de forma quiescente dentro de la cámara 24, pudiendo definirse las áreas en términos de una región de píxeles predeterminada; por ejemplo, un cuadrado de píxeles de 5x5. Un cuadrado de píxeles de 5x5 es útil al evaluar plaquetas 52 porque una plaqueta 31 típica de aproximadamente 2-3µm de tamaño encaja en el cuadrado de píxeles de 5x5 a la resolución utilizada para la captación de imágenes. Sin embargo, la presente invención no se limita a "regiones locales" de este tamaño particular. En cada una de estas regiones locales, se determina un valor máximo de intensidad de la imagen de la muestra. Por ejemplo, la muestra puede someterse a una luz de excitación fluorescente, y adquirirse una imagen de la muestra, incluyendo la imagen la intensidad de luz emitida; por ejemplo, intensidades de luz emitidas dentro del canal fluorescente verde. Una vez determinados los picos de intensidad de la imagen en las respectivas regiones locales, puede aplicarse un umbral global para eliminar los picos de intensidad (por ejemplo, máximos) por debajo del umbral global. Este proceso de identificación establece todas las partes dentro de la imagen que pueden representar potencialmente una plaqueta 31, denominándose cada una de dichas partes en adelante un "candidato plaquetario". Una vez identificados todos los posibles candidatos plaquetarios, los datos de la imagen se analizan más a fondo para eliminar aquellos candidatos que no son plaquetas 52, y para identificar los grupos de plaquetas que pueden estar presentes dentro de la imagen.

La intensidad de la imagen de las partes de la imagen de la muestra que están próximas a las líneas de cola 44 de la cámara de análisis y la interfaz (o interfaces) 49 muestra/aire pueden contaminarse por los efectos de la intensidad de la luz causados por las líneas de cola 44 y la interfaz (o interfaces) 49 muestra/aire. Por ejemplo, como puede verse en la Figura 7, cuando la muestra se ilumina las líneas de cola 44 aparecen brillantes, con una elevada intensidad de la imagen. La elevada intensidad de la imagen de las líneas de cola 44 provoca que las áreas próximas tengan más intensidad que la que tendrían de otro modo, aumentando así la posibilidad de una identificación de plaquetas errónea, o la posibilidad de que las plaquetas 52 se pierdan debido a la intensidad global. El mismo efecto se produce en cierta medida en la interfaz 49 muestra/aire como puede verse en la Figura 8. Una técnica que puede implantarse algorítmicamente mediante el analizador 42 para representar la contaminación por intensidad en las partes próximas de la imagen (es decir, áreas anómalas) es eliminar la consideración de dichas partes próximas de la imagen durante el conteo de plaquetas; por ejemplo, mediante enmascaramiento, etc. La determinación de cuánta imagen de la muestra se suprime puede hacerse, por ejemplo, evaluando datos históricos relevantes. Por ejemplo, la supresión de aproximadamente 100 líneas de píxeles de la imagen de la muestra próxima a una línea de cola suele ser adecuada para eliminar la contaminación por intensidad atribuible a dicha línea de cola 44. De forma similar, la supresión de aproximadamente 80 líneas de píxeles de la imagen de la muestra próxima a una interfaz 49 muestra/aire suele ser adecuada para eliminar la contaminación por intensidad atribuible a dicha interfaz. Para representar las plaquetas 52 presentes en las partes suprimidas de la imagen de la muestra, el número de plaquetas en dicha área puede calcularse en base a números de plaquetas relativos determinados en regiones de la imagen de la muestra específicas del área suprimida.

En algunas realizaciones, puede adaptarse aún más el algoritmo utilizado dentro del procesador 42 para reconocer otras áreas donde el reconocimiento de plaquetas es problemático. Por ejemplo, en algunos casos una región de una cámara de análisis 24 puede tener discrepancias que inhibirán una determinación precisa del volumen. En ese caso, puede verse afectada la capacidad para hacer un conteo de plaquetas preciso (que es una función del volumen) en dicha área. La Figura 9, por ejemplo, muestra una región de entrada de la cámara que tiene imágenes con anomalías 58 a causa de una muestra excesiva en el área. Para representar dichas anomalías, puede calcularse el número de plaquetas 52 en el área en base a conteos de plaquetas en áreas de la muestra específicas del área problemática.

Otra técnica para facilitar la identificación de las plaquetas 52 que puede implantarse algorítmicamente mediante el analizador 42 es una supresión del fondo existente dentro de la imagen adquirida inicialmente. Por ejemplo, puede aplicarse un filtro a las señales de los datos de la imagen que suprima las variaciones de intensidad (por ejemplo, intensidad de la luz verde) por debajo de un umbral global predeterminado. Los máximos de intensidad local por debajo del umbral global que podrían identificarse de otro modo como plaquetas 52 pueden eliminarse, eliminando así la posibilidad de que dichos picos de intensidad se identifiquen incorrectamente como plaquetas 52. Por ejemplo, pueden utilizarse técnicas de segmentación como mecanismo para suprimir el fondo. La presente invención no se limita a ninguna técnica de segmentación particular, y puede elegirse una técnica específica en vista de la aplicación que nos ocupa. La presente invención tampoco se limita a utilizar una técnica de segmentación para suprimir el fondo, y puede utilizar otras técnicas que seleccionan (es decir, "escogen") píxeles o que distinguen de otro modo píxeles con características particulares.

Otra técnica para facilitar la identificación de las plaquetas 52 que puede implementarse algorítmicamente mediante el analizador 42 conlleva representar (por ejemplo, calcular) la intensidad de la imagen del plasma dentro de áreas locales de la muestra. El plasma habitualmente aparece más brillante (es decir, con más intensidad de imagen) que los hematíes, pero no tan brillante como las plaquetas 52. Al menos parte del colorante fluorescente añadido a la muestra puede residir dentro del plasma y, como consecuencia, iluminar la muestra con luz de excitación crea cierto nivel de intensidad de la luz emitida dentro del plasma. Sin embargo, puede que la distribución de colorante dentro del plasma no sea uniforme dentro de toda la muestra. En consecuencia, la intensidad de la imagen del plasma puede variar significativamente dentro de la muestra colocada dentro de la cámara de análisis 24. Por ejemplo, los datos de las imágenes indican que la intensidad del plasma en la imagen dentro de una primera área de la muestra puede variar hasta un 30-40 % a partir de la intensidad de la imagen del plasma en una segunda área de la muestra. La falta de uniformidad dentro de la intensidad del plasma hace que sea difícil representar uniformemente la intensidad del plasma sin que el proceso de identificación de plaquetas se vea afectado negativamente. La falta de uniformidad de la intensidad del plasma es particularmente problemática en regiones dentro de la muestra donde residen grandes cantidades de hematíes 54. Si la intensidad del plasma no se representa, pueden aparecer pequeñas áreas de plasma visibles dentro de las regiones de hematíes como picos de intensidad local que entonces podrían identificarse erróneamente como plaquetas 52. Para solucionar esta cuestión, el algoritmo puede adaptarse para aplicar una máscara de hematíes en las regiones de hematíes para separar los hematíes 54 (o suprimirlos de otro modo de la imagen), dejando las demás áreas de plasma. Por ejemplo, los hematíes 54 no tienen expresión en el canal rojo de los datos de las señales de imágenes. Por lo tanto, una imagen formada utilizando una máscara de canal rojo solamente mostrará la intensidad del plasma y cualesquiera plaquetas 52 que estén dentro de la región de los hematíes. Entonces, las plaquetas 52 pueden distinguirse cuantitativamente del plasma local gracias a la diferencia de intensidad (por ejemplo, aquellos píxeles que sean aproximadamente un 20 % mayores que los píxeles circundantes) entre los dos componentes de la muestra. En las regiones de hematíes que no tienen suficientes áreas de plasma para permitir este tipo de análisis comparativo, puede utilizarse una técnica alternativa basada en la intensidad de la imagen de los propios hematíes 54. Por ejemplo, la intensidad del plasma de la imagen estimada en

dichas regiones puede basarse en el siguiente cálculo: (intensidad de la imagen media de los hematíes) + 3\*(desviación estándar de la intensidad de la imagen de los hematíes) = intensidad del plasma estimada. El presente método no se limita a esta técnica alternativa particular.

5 Después de aplicar una o varias de las técnicas descritas anteriormente a los candidatos plaquetarios y de eliminar la consideración de los candidatos no plaquetarios (en la medida en que se identifiquen), los demás candidatos pueden analizarse más a fondo evaluando las características de cada candidato individual. Una primera técnica que puede implantarse algorítmicamente mediante el analizador 42 conlleva evaluar el contraste direccional del pico de intensidad del candidato dentro de un área determinada. El área puede definirse en términos de los píxeles que rodean el pico de intensidad. Por ejemplo, utilizando una resolución que sea útil para un análisis de sangre completa (por ejemplo, 0,5µm/píxel), el área que potencialmente representa al candidato plaquetario puede definirse como de hasta aproximadamente tres o cuatro (3 o 4) píxeles por fuera desde el pico de intensidad, y el área fuera de los cuatro (4) píxeles puede definirse como fuera del candidato plaquetario. La presente invención no se limita a estas definiciones del área, que pueden seleccionarse para adaptarse a la aplicación que nos ocupa. Las plaquetas 10 tienen un contraste de intensidad direccional dentro del área definida, en la que la intensidad disminuye por fuera desde el centro del área (es decir, por fuera desde el pico de intensidad, mostrado diagramáticamente en la Figura 10) en una dirección hacia el perímetro del área. Por ejemplo, la intensidad del pico está en un máximo en el centro y disminuye a lo largo de una pendiente que se extiende por fuera hacia el perímetro del área. En términos de la imagen, que se segmenta por etapas mediante los píxeles que forman la imagen, cada píxel tiene una disminución de intensidad que se desplaza en la dirección hacia el perímetro del área. Esta disminución de intensidad incremental existe en una pluralidad de direcciones fuera del valor de intensidad máximo en el centro del área, pero no necesariamente en todas las direcciones. La uniformidad circunferencial del contraste de intensidad direccional puede evaluarse evaluando cuantitativamente la intensidad de la imagen de los píxeles cada "Y" grados de rotación (por ejemplo, cada 30 grados) alrededor del pico de intensidad del candidato. La velocidad de disminución de la intensidad por píxel también puede variar para adaptarse a la aplicación que nos ocupa. Además, puede utilizarse un primer porcentaje de disminución de intensidad en una primera región de la muestra, y un segundo porcentaje mayor en otras regiones de la muestra en las que la identificación de plaquetas es más difícil; por ejemplo, utilizar un porcentaje de disminución de intensidad mayor en regiones de mayor intensidad del plasma, o en regiones de hematíes. La Figura 10 representa diagramáticamente un pico de intensidad de un candidato plaquetario, que ilustra una disminución de intensidad incremental desde el centro del área por fuera en una sola dirección hacia el perímetro del área.

Otra técnica para evaluar algorítmicamente las características de un candidato individual conlleva determinar cuantitativamente una distribución de Gauss de la disminución de intensidad incremental que rodea al pico de intensidad del candidato en un área determinada (área que se ha definido anteriormente en relación con el contraste direccional). Las Figuras 11a- 11c ilustran diagramáticamente tres distintas distribuciones de Gauss de la intensidad que rodea a un pico de intensidad. En la Figura 11a, un pico de intensidad marcadamente definido se sitúa en el centro del área, y la distribución de intensidad disminuye uniformemente alejándose del pico central; por ejemplo, una disminución de intensidad de píxel a píxel de aproximadamente 4 %. Esta distribución de intensidad es muy típica de las imágenes de plaquetas y los candidatos plaquetarios que tienen esta distribución se aceptan como imágenes de plaquetas. En la Figura 11b, la distribución ilustra un pico de intensidad dentro del centro del área, rodeado de una región de casi la misma intensidad (por ejemplo, una variación de menos del 3 % de intensidad entre los píxeles centrales), región que a su vez está rodeada por una región de una disminución de intensidad relativamente grande en la dirección hacia fuera. Esta distribución de intensidad (que aparece como que tiene un área del pico de intensidad grande) es menos típica de las imágenes de plaquetas y puede ser una función de la imagen que se está sobreexponiendo. Dependiendo de las circunstancias de la imagen, los candidatos plaquetarios que tienen este tipo de distribución de Gauss pueden aceptarse como una plaqueta; por ejemplo, aceptarse cuando son favorablemente comparables a valores de intensidad del plasma locales, etc. En la Figura 11c, la distribución ilustra un pico de intensidad relativamente marcado dentro del centro del área, rodeado por una disminución de intensidad marcada en la dirección hacia fuera. Esta distribución de intensidad no es indicativa de una plaqueta, y estos candidatos plaquetarios no se aceptan como plaquetas 52. Sobre un candidato plaquetario pueden realizarse uno o ambos de los análisis de distribución de Gauss y de contraste direccional.

Dentro de una muestra de sangre completa sustancialmente no diluida, las plaquetas 52 pueden sumarse en grupos que aparecen en la imagen como una masa que tiene múltiples picos de intensidad. Si se considera que un grupo solamente es una única plaqueta, el número de plaquetas 52 identificadas será inferior a las que realmente están presentes en el grupo. Para evitar este tipo de error, el analizador 42 puede adaptarse algorítmicamente para identificar grupos de plaquetas y distinguirlos de las plaquetas 52 únicas. Un método para identificar y distinguir los grupos conlleva el análisis de distribución de Gauss anteriormente descrito. Esta técnica utiliza la región del área externa definida como un candidato plaquetario dentro del análisis de distribución de Gauss (por ejemplo, el área dentro de un radio de "x" píxeles). Para identificar un grupo, la intensidad de la imagen de los píxeles en el perímetro se compara con la intensidad del plasma local. Si un número de los píxeles del perímetro del candidato (por ejemplo, 50 %) tiene cada uno una intensidad de la imagen que es un porcentaje predeterminado mayor que la intensidad del plasma de la imagen local, entonces el candidato se considera un grupo. Este es un ejemplo de un método para identificar un grupo y la presente invención no se limita a este ejemplo particular.

Una vez identificado un grupo, puede determinarse el número de plaquetas 52 dentro del grupo utilizando una variedad de técnicas. Por ejemplo, el algoritmo puede adaptarse para determinar un valor de intensidad de la imagen umbral ( $T_h$ ) para cada pico en el grupo. El valor de intensidad de la imagen umbral ( $T_h$ ) se determina en base al valor de intensidad de la imagen de dicho pico particular, y a un valor de intensidad del plasma local. El valor umbral ( $T_h$ ) es inferior al respectivo valor de intensidad pico, pero es mayor que los valores de intensidad del fondo local. Para determinar el número de plaquetas 52 dentro de un grupo determinado, el algoritmo aplica una técnica de "aumento" al grupo identificado. Con la técnica de aumento, las unidades de la imagen (por ejemplo, los píxeles) que están próximas a las unidades de intensidad de la imagen pico, y que tienen un valor de intensidad igual o mayor al valor de intensidad umbral ( $T_h$ ), se identifican como parte del grupo. El proceso aplica entonces la misma evaluación umbral a los píxeles próximos a los últimos píxeles identificados como parte del grupo. El proceso se repite hasta que no se encuentran más píxeles próximos a un nivel de intensidad mayor que el nivel umbral ( $T_h$ ).

Una vez "aumentado" el grupo, se determina el área asociada a cada plaqueta aumentada (es decir, cada cuerpo expandido por fuera desde un pico de intensidad de la imagen como se ha descrito anteriormente) dentro del grupo y se determina un valor del área medio (área aumentada media de PLQ) de dichas regiones expandidas. Después, dicho valor de área medio (área aumentada media de PLQ) se compara con un área de plaquetas normal medio conocido (área normal media de PLQ). Si el área aumentada media (área aumentada media de PLQ) es mayor que un multiplicador por el área media de plaqueta humana (por ejemplo,  $\alpha * \text{área normal media de PLQ}$ , en la que  $\alpha$  puede equivaler a 1.x), entonces el número de plaquetas 52 dentro del grupo se define mediante el área total del grupo ( $A_{\text{grupo}}$ ) dividido entre el área media de plaqueta humana (por ejemplo,  $A_{\text{grupo}} / \text{área normal media de PLQ}$ ). Si el área aumentada media (área aumentada media de PLQ) es inferior a dicho multiplicador por el área media de plaqueta humana, entonces el número de plaquetas 52 dentro del grupo se define por el área total del grupo dividido entre el área de plaqueta aumentada media (por ejemplo,  $A_{\text{grupo}} / \text{área aumentada media de PLQ}$ ).

Para aquellos análisis plaquetarios que utilizan una cámara de análisis 24 que tiene perlas 31 colocadas dentro de la cámara 24 (por ejemplo, una cámara tal como la desvelada en la Solicitud '114), las perlas 31 pueden aparecer en la imagen como con un anillo brillante alrededor de su perímetro; es decir, un anillo de alta intensidad dentro de la imagen. La imagen mostrada en la Figura 12 incluye una pluralidad de perlas 31, cada una con un anillo de alta intensidad de la imagen alrededor de su perla 31 perimetral.

Para evitar un posible error de identificación de plaquetas asociado a las perlas 31 (por ejemplo, dentro del anillo brillante, o muy cerca del anillo, o en el interior del anillo), el analizador 42 puede adaptarse para evaluar los picos de intensidad asociados a una perla 31 utilizando un clasificador basado en reglas basado en una pluralidad de características. Sin embargo, la presente invención no se limita a utilizar el clasificador solamente con el fin de analizar regiones próximas a la perla para las plaquetas 52.

Como etapa inicial, las perlas 31 se identifican dentro de la muestra de la imagen. Por ejemplo, pueden identificarse perlas 31 dentro de la imagen de la muestra creada para determinar el volumen de la muestra, pudiendo aparecer en la imagen como una mancha oscura; por ejemplo, en algunos casos las perlas identificadas pueden ocultarse para aparecer más claramente como una mancha oscura para facilitar el análisis. Sin embargo, la invención no se limita a esta técnica para identificar perlas 31.

Una vez identificada una perla 31, se identifica cada pico de intensidad de la imagen dentro del área de la perla y se considera un candidato plaquetario. Para evaluar más a fondo un candidato plaquetario, dicho candidato puede someterse entonces a una técnica de "aumento" como se ha descrito anteriormente para determinar si el candidato es un candidato plaquetario o posiblemente un grupo plaquetario.

Por cada pico de intensidad (por ejemplo, situado próximo a una perla 31) que se identifica como un candidato plaquetario, dicho candidato puede evaluarse entonces más a fondo utilizando el clasificador basado en reglas. Dentro de las medidas del clasificador basado en reglas, se analiza cada candidato plaquetario utilizando al menos parte de una pluralidad de características cuantitativas, incluidas: Área, Valor de Intensidad Pico Normalizado, Valor de Intensidad Media Normalizado, Intensidad del Plasma Estimada Normalizada, Redondez, Extensión, Solidez, Excentricidad, Longitud del Eje Principal, y Longitud del Eje Menor. Estas características cuantitativas son ejemplos de características que pueden utilizarse dentro del clasificador basado en reglas, pero la presente invención no se limita a estas características específicas. Además, la presente invención no se limita a utilizar ningún número o combinación particular de estas características; por ejemplo, en algunos casos el clasificador basado en reglas tan solo puede utilizar una característica o hasta todas las características durante el proceso de clasificación.

Por ejemplo, para evaluar un candidato plaquetario particular, el clasificador puede considerar primero el Área del candidato. Puede asignarse un valor cuantitativo para el Área del candidato en base al número de píxeles que ocupe el candidato plaquetario dentro de la imagen.

El clasificador basado en reglas también se adapta para considerar un valor cuantitativo representativo de un Valor de Intensidad Pico Normalizado del candidato plaquetario. Por ejemplo, como se ha indicado anteriormente, a los valores de intensidad de la imagen se les puede asignar una escala arbitraria de, por ejemplo, 0 unidades a 4095 unidades ("UVI"). En esta característica, el valor de intensidad pico de la imagen puede normalizarse dividiendo el

valor determinado entre 4095. Como se ha indicado anteriormente, la escala de intensidad de 0-4095 es una escala arbitraria y la presente invención no se limita a esta escala particular.

5 El clasificador basado en reglas también se adapta para considerar un valor cuantitativo representativo del Valor de Intensidad Media Normalizado del candidato plaquetario. En esta característica, los valores de intensidad de la imagen de los píxeles dentro del candidato plaquetario se promedian y normalizan dividiendo el valor determinado entre 4095. Nuevamente, la escala de intensidad de 0-4095 es una escala arbitraria y la presente invención no se limita a este caso particular.

10 El clasificador basado en reglas también se adapta para considerar un valor cuantitativo representativo de la Intensidad del Plasma Estimada Normalizada del plasma local para el candidato plaquetario. En esta característica, de una forma igual o similar a la descrita anteriormente, se identifican las regiones de plasma local y se determina un valor representativo de la intensidad de la imagen de dichas regiones de plasma; por ejemplo, se determina un valor de intensidad medio para las regiones de plasma local. El valor representativo de la intensidad de la imagen para las regiones de plasma local se normaliza entonces de una forma tal como la descrita anteriormente; por ejemplo, el valor dividido entre 4095.

15 El clasificador basado en reglas también se adapta para considerar un valor cuantitativo representativo de la Redondez de un candidato plaquetario. Una técnica para determinar la Redondez de un candidato plaquetario conlleva utilizar la siguiente ecuación:

$$20 \quad \text{Redondez} = \frac{\text{Perímetro}^2}{4\pi \cdot \text{Área}}$$

25 en la que el término *Perímetro* se define como la distancia alrededor del perímetro del candidato plaquetario, y el término *Área* es el área del candidato plaquetario.

30 El clasificador basado en reglas también se adapta para considerar un valor cuantitativo representativo de la Extensión de un candidato plaquetario. En esta característica, se determina un valor cuantitativo representativo de la proporción de los píxeles en un cuadro delimitador 60 que también están dentro de la "máscara segmentada" 62, valor que se denomina la Extensión. La "máscara segmentada" 62 se refiere al área ocupada por el candidato plaquetario dentro del cuadro delimitador 60. Un ejemplo de un cuadro delimitador 60 es el cuadro más pequeño en una cuadrícula ortogonal 64 que encierra la máscara segmentada 62. La Figura 13 ilustra diagramáticamente una máscara segmentada 62 de un candidato plaquetario de forma elíptica colocado dentro de una parte de un cuadro delimitador 60 de una cuadrícula ortogonal 64.

35 El clasificador basado en reglas también se adapta para considerar un valor cuantitativo representativo de la Solidez de un candidato plaquetario. En esta característica, se determina un valor cuantitativo representativo de la proporción de píxeles en la envolvente 66 convexa que también están en la máscara segmentada 62, valor que se denomina la Solidez. Como se ha indicado anteriormente, la máscara segmentada 62 se refiere al área ocupada por el candidato plaquetario. La envolvente 66 convexa puede definirse, por ejemplo, como el cuadro más pequeño en el que puede entrar la máscara segmentada 62, pudiendo no estar alineada ortogonalmente la envolvente 66. La Figura 14 ilustra diagramáticamente la máscara segmentada 62 de forma elíptica mostrada en la Figura 13, colocada ahora dentro de una envolvente 66 convexa.

40 El clasificador basado en reglas también se adapta para considerar un valor cuantitativo representativo de la Excentricidad de un candidato plaquetario. En esta característica, se determina un valor cuantitativo representativo de una relación de una distancia entre los focos de la elipse y la longitud de su eje principal.

45 El clasificador basado en reglas también se adapta para considerar un valor cuantitativo representativo de la Longitud del Eje Principal de un candidato plaquetario. En esta característica, se determina un valor cuantitativo representativo de la longitud (en píxeles) del eje principal de la elipse que tiene los mismos segundos momentos centrales normalizados que la máscara segmentada.

50 El clasificador basado en reglas también se adapta para considerar un valor cuantitativo representativo de la Longitud del Eje Menor de un candidato plaquetario. En esta característica, se determina un valor cuantitativo representativo de la longitud (en píxeles) del eje menor de la elipse que tiene los mismos segundos momentos centrales normalizados que la máscara segmentada.

55 El valor cuantitativo de cada característica puede variar, en cierto grado, dentro de una población de muestra desde un sujeto particular, y también puede variar entre sujetos. La presente invención aborda esta variabilidad utilizando típicamente una pluralidad de características para evaluar a un candidato plaquetario. Utilizando más de una característica para evaluar e identificar a un candidato plaquetario, el presente método disminuye la posibilidad de que cualquier característica particular tenga un efecto adverso en la exactitud de la evaluación. La variabilidad también puede abordarse ajustando selectivamente la magnitud del valor (o los valores) de referencia cuantitativos asociados a cada característica.

En algunas realizaciones, el clasificador basado en reglas es un clasificador basado en un modelo aprendido. Se utilizan imágenes de muestra de entrenamiento para entrenar al clasificador, y el clasificador entrenado crea a su vez el modelo aprendido. Una vez desarrollado el modelo aprendido, dicho modelo se utiliza después para evaluar características (por ejemplo, tales como las descritas anteriormente) asociadas a la imagen de un candidato plaquetario desde una muestra, y para incluir o excluir al candidato plaquetario en base a dichas características.

Las imágenes de muestra de entrenamiento pueden ser imágenes de plaquetas obtenidas empíricamente; por ejemplo, imágenes de plaquetas obtenidas por un técnico experto. En algunas realizaciones, las imágenes de muestra de entrenamiento pueden organizarse en conjuntos asociados a cada característica. El número de imágenes de plaqueta se selecciona para proporcionar datos suficientes para cada característica con fines de entrenamiento; es decir, datos suficientes para permitir que el clasificador se entrene con un nivel de exactitud aceptable para el análisis de la característica. El modelo aprendido utilizado en esta realización no se limita a ningún conjunto de entrenamiento de un tamaño particular. A menudo, un conjunto de entrenamiento puede contener entre cientos y miles de cada tipo de plaqueta característica para representar fielmente la variabilidad dentro de distintas personas, las distintas condiciones de captación de imágenes, etc.

El clasificador puede entrenarse (y el modelo aprendido desarrollarse) evaluando cada imagen de plaqueta dentro de un conjunto de entrenamiento para proporcionar un valor (o valores) de referencia cuantitativos para cada característica para cada plaqueta. Los valores de referencia colectivos (o las representaciones estadísticas de los mismos) pueden utilizarse entonces para construir el modelo aprendido. Los modelos aprendidos permiten que la presente aplicación se ajuste en base a datos de imágenes reales, y la interpretación automatizada de dichos datos de imágenes, proporcionando así un nivel de exactitud deseable. La presente invención no se limita a ningún tipo de modelo aprendido particular. Ejemplos de tipos de modelos aprendidos aceptables incluyen un modelo de red neural tal como un Perceptron Multicapa, o un modelo estadístico tal como un clasificador bayesiano, o un modelo lineal tal como una Máquina de Soporte Vectorial (SVM). Todos estos tipos de modelos aprendidos se conocen bien y la presente invención no se limita a ninguna realización particular de los mismos. En algunas realizaciones, pueden utilizarse combinaciones de estos modelos (y/u otros).

Durante el funcionamiento de la invención, una muestra no diluida de sangre completa se recoge en un cartucho desechable tal como el ilustrado en las Figuras 2-5. Reactivos, incluidos uno o varios colorantes (por ejemplo, NDA) y un anticoagulante (por ejemplo, EDTA), se añaden a la muestra para facilitar el análisis plaquetario. La muestra mezclada con los reactivos se deposita dentro de la parte de cámara de análisis del cartucho, donde reside de forma quiescente durante el proceso de captación de imágenes. El cartucho se introduce en (o se engrana de otro modo con) el dispositivo de análisis 22, donde es colocado adecuadamente por el posicionador 36 del cartucho relativo a la lente objetivo, el iluminador 38 de la muestra, y el disector 40 de la imagen, y la imagen se capta posteriormente.

En la mayoría de los casos, el dispositivo de análisis 22 se programa para captar la imagen de la totalidad de la muestra que reside de forma quiescente dentro de la cámara 24. Sin embargo, en algunas aplicaciones puede captarse la imagen de una parte de la muestra. El proceso de captación de la imagen puede variar dependiendo de la aplicación que nos ocupa. Para el análisis plaquetario descrito anteriormente, el proceso de captación de imágenes conlleva someter la muestra a una fuente de luz de excitación fluorescente; por ejemplo, luz a aproximadamente 470 nm desde la fuente de luz epifluorescente. La fuente de luz de excitación provoca que el colorante combinado con elementos colocados dentro de la muestra emita luz fluorescente a dos longitudes de onda diferentes (por ejemplo, roja ~ 660 nm, y verde ~ 540 nm). El disector 40 de la imagen capta la luz fluoresciendo desde la muestra y proporciona señales representativas de la intensidad y el color (es decir, longitud de onda) de la luz capturada. Las señales se procesan de una forma que permite que el analizador 42 programable forme una imagen de la muestra basada en las señales, pudiendo analizarse la imagen cuantitativamente para realizar el análisis plaquetario.

El diagrama de flujo mostrado en la Figura 15 proporciona un ejemplo del proceso a través del cual las plaquetas 52 en una muestra, con su imagen captada como se ha descrito anteriormente, pueden identificarse y enumerarse entonces de acuerdo con la presente invención. La presente invención no exige que se lleven a cabo todas las etapas identificadas en la Figura 15 en todas las realizaciones, ni tampoco se limita al orden de etapas particular mostrado en la Figura 15.

La primera etapa mostrada en la Figura 15 conlleva aplicar una máscara de volumen sanguíneo a la imagen para determinar el área ocupada por la muestra dentro de la imagen, que puede utilizarse entonces para determinar el volumen de la muestra dentro de la cámara de análisis 24. También puede generarse una máscara de hematíes para su uso posterior en la distinción de plaquetas 52 en determinadas regiones.

La segunda etapa conlleva la supresión del fondo de la imagen de la muestra. Como se ha indicado anteriormente, las partes del fondo de las imágenes pueden identificarse mediante diversas técnicas que incluyen la umbralización, y una vez identificadas pueden suprimirse mediante el filtrado, la segmentación, etc.

La tercera etapa conlleva identificar los picos de intensidad de la imagen identificando máximos de intensidad local en área de la imagen determinada.

La cuarta etapa conlleva identificar leucocitos 50 dentro de la imagen de la muestra, o partes de la imagen, y excluir dichas regiones como regiones de intensidad de la imagen que no son candidatos plaquetarios.

La quinta etapa conlleva identificar perlas 31 dentro de la imagen de la muestra y preparar una máscara que pueda aplicarse a las partes de la imagen que representan perlas 31.

5 La sexta etapa conlleva calcular la intensidad del plasma en regiones locales en las que es necesario identificar plaquetas 52; por ejemplo, pueden utilizarse valores de intensidad del plasma local para distinguir picos de intensidad local atribuibles a las plaquetas 52 a partir de picos de intensidad local atribuibles al plasma. Esta etapa puede realizarse de forma selectiva en regiones particulares dentro de la muestra; por ejemplo, regiones que  
10 contienen grandes números de hematíes 54.

La séptima etapa conlleva analizar candidatos plaquetarios particulares para determinar si el pico de intensidad de la imagen del candidato tiene un contraste direccional en una o varias direcciones extendiéndose por fuera desde el pico.

15 La octava etapa conlleva analizar la distribución de Gauss de la intensidad de la imagen de los candidatos plaquetarios particulares. La naturaleza de la distribución, como se ha descrito anteriormente, proporciona información concerniente a la probabilidad de que un candidato particular sea una verdadera plaqueta.

20 La novena etapa conlleva la supresión de elementos dentro de la imagen de la muestra que son atribuibles a imperfecciones presentes en el sistema de captación de imágenes; por ejemplo, arañazos en los paneles de la cámara de análisis, restos en los paneles, etc.

25 La décima etapa conlleva identificar plaquetas 52 de candidatos utilizando una técnica de aumento de la imagen. Esta técnica puede aplicarse a una variedad de distintos tipos de candidatos plaquetarios. Por ejemplo, la técnica de aumento puede aplicarse a un candidato plaquetario que se identifique como un posible grupo plaquetario. La técnica de aumento, uno de cuyos ejemplos se ha descrito anteriormente, proporciona un medio para evaluar el área ocupada por el candidato (o grupo) plaquetario. El área proporciona información que puede utilizarse posteriormente para evaluar si el candidato es realmente una plaqueta. Si el candidato es un grupo, el área proporciona información  
30 que puede utilizarse para determinar el número de plaquetas 52 que residen dentro del grupo.

La undécima etapa conlleva calcular el número de plaquetas 52 dentro de aquellos candidatos determinados como grupos. Anteriormente se han descrito ejemplos de técnicas matemáticas que pueden utilizarse para calcular el número de plaquetas 52 dentro de un grupo. La presente invención no se limita a estos algoritmos particulares.

35 La duodécima etapa conlleva clasificar candidatos plaquetarios que están situados muy cerca de las perlas 31 separadoras colocadas dentro de la cámara 24. Como se ha indicado antes, en algunas realizaciones de la presente invención el analizador 42 programable se adapta con un algoritmo que incluye un clasificador basado en reglas que puede incluir un modelo aprendido. Los candidatos plaquetarios se evalúan utilizando el clasificador y las plaquetas 52 identificadas se enumeran.

40 Una vez identificadas las verdaderas plaquetas 52, las plaquetas 52 dentro del volumen de la muestra determinada pueden presentarse en un valor de número de plaquetas por volumen, u otra forma útil, como se indica en la decimotercera etapa.

45 Aunque esta invención se ha mostrado y descrito con respecto a las realizaciones detalladas de la misma, los expertos en la materia entenderán que pueden realizarse diversos cambios en la forma y el detalle de la misma.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para identificar plaquetas dentro de una muestra de sangre completa, que comprende las etapas de:
  - añadir al menos un colorante a la muestra de sangre completa, colorante que puede marcar plaquetas (52);
  - colocar la muestra de sangre en una cámara (24) definida por al menos un panel transparente (26, 28);
  - captar la imagen de al menos una parte de la muestra que reside de forma quiescente dentro de la cámara (26, 28) para crear una o varias imágenes; e
  - identificar una o varias plaquetas (52) dentro de la muestra utilizando un analizador (42) adaptado para identificar las plaquetas (52) en base a características determinables cuantitativamente dentro de la imagen utilizando un analizador (42), características determinables cuantitativamente que incluyen diferencias de intensidad; caracterizado por que la etapa identificadora incluye evaluar candidatos plaquetarios utilizando un contraste direccional de una diferencia de intensidad.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además identificar partes anómalas de la imagen y calcular el número de plaquetas (52) en las partes anómalas de la imagen.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa identificadora incluye representar una intensidad del plasma en la imagen.
4. El método de la reivindicación 1, que comprende además determinar una diferencia de intensidad pico y determinar un valor de una disminución de intensidad incremental dentro de la imagen en una dirección que se aleja del pico.
5. El método de la reivindicación 4, que comprende además determinar una uniformidad circunferencial de la disminución de intensidad incremental.
6. El método de la reivindicación 4, que comprende además determinar una distribución de Gauss de la disminución de intensidad incremental.
7. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de identificación incluye evaluar la imagen para determinar una presencia de uno o varios grupos de plaquetas dentro de la muestra.
8. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de identificación incluye identificar candidatos plaquetarios dentro de la imagen y analizar uno o varios de los candidatos plaquetarios utilizando un clasificador basado en reglas que utiliza una pluralidad de características cuantitativas.
9. El método de la reivindicación 1, en el que las diferencias de intensidad son diferencias en la intensidad de la luz fluorescente emitida.
10. Un aparato para identificar plaquetas dentro de una muestra de sangre completa, que comprende:
  - un cartucho de análisis (20) que tiene una cámara de análisis (24) con un par de miembros planares (26, 28), al menos uno de los cuales es transparente, pudiendo dicho cartucho añadir al menos un colorante a la muestra de sangre completa, colorante que puede marcar plaquetas (52), y cámara (24) que puede sujetar la muestra de forma quiescente entre los miembros planares (26, 28); y
  - un dispositivo de análisis (22) que puede captar la imagen de al menos una parte de la muestra que reside de forma quiescente dentro de la cámara, dispositivo de análisis (22) que se adapta para identificar las plaquetas en base a características determinables cuantitativamente dentro de la imagen, características determinables cuantitativamente que incluyen diferencias de intensidad; caracterizado por que el dispositivo de análisis se adapta para evaluar candidatos plaquetarios utilizando un contraste direccional de una diferencia de intensidad.
11. El aparato de la reivindicación 10, en el que el dispositivo de análisis (22) se adapta para identificar partes anómalas de la imagen y para calcular el número de plaquetas en las partes anómalas de la imagen.
12. El aparato de la reivindicación 10, en el que el dispositivo de análisis (22) se adapta para representar una intensidad del plasma en la imagen.
13. El aparato de la reivindicación 10, en el que el dispositivo de análisis (22) se adapta para determinar una diferencia de intensidad pico y para determinar un valor de una disminución de intensidad incremental dentro de la imagen en una dirección que se aleja del pico.
14. El aparato de la reivindicación 10, en el que el dispositivo de análisis (22) se adapta para determinar una uniformidad circunferencial de la disminución de intensidad incremental.

15. El aparato de la reivindicación 13, en el que el dispositivo de análisis (22) se adapta para determinar una distribución de Gauss de la disminución de intensidad incremental.

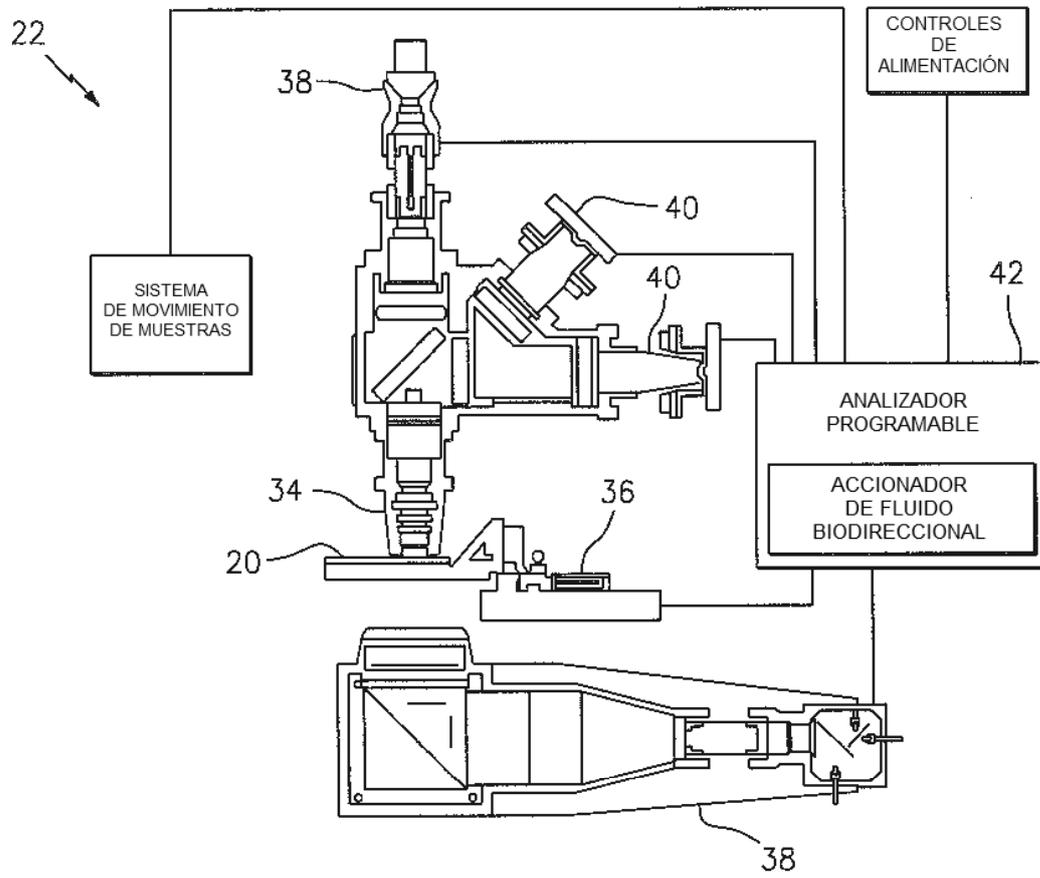


FIG. 1

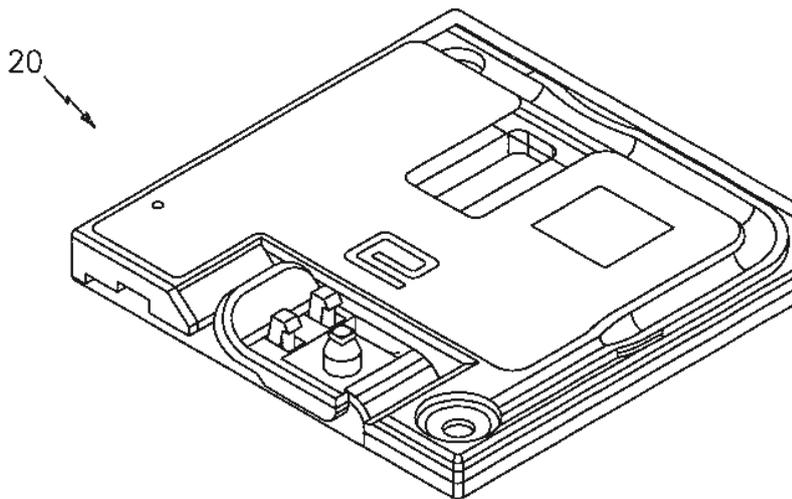


FIG. 2

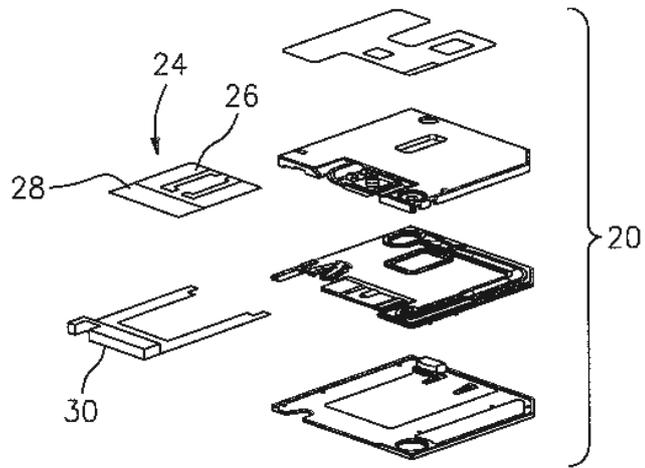


FIG. 3

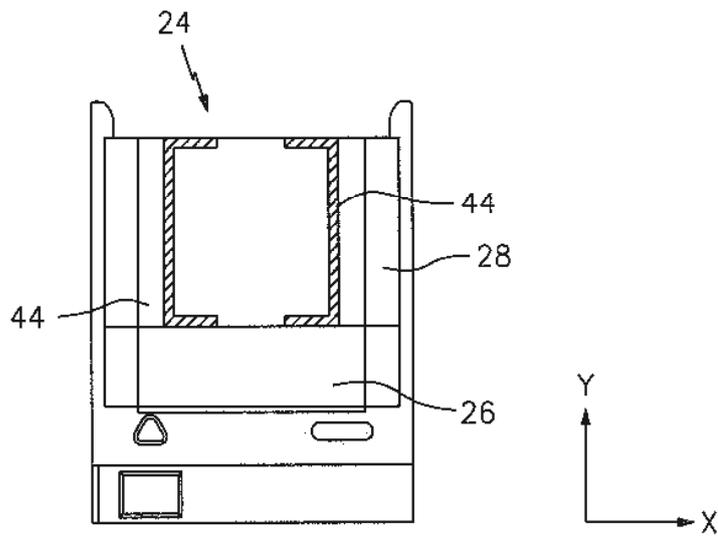


FIG. 4

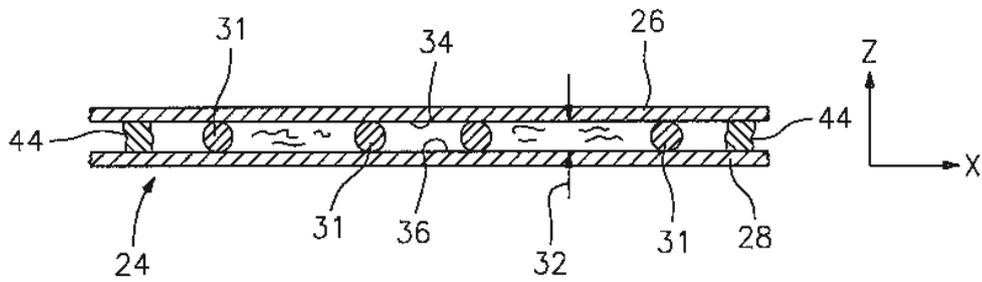
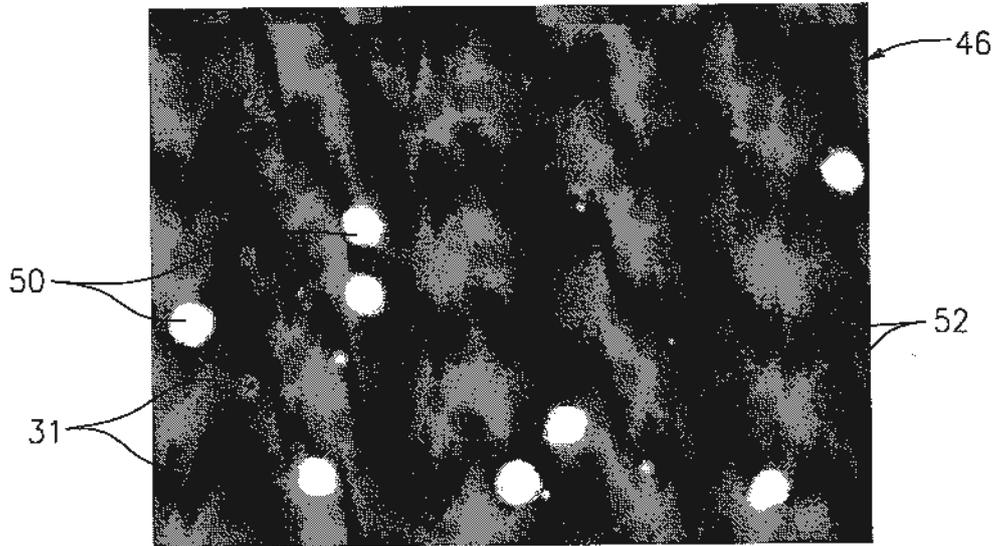


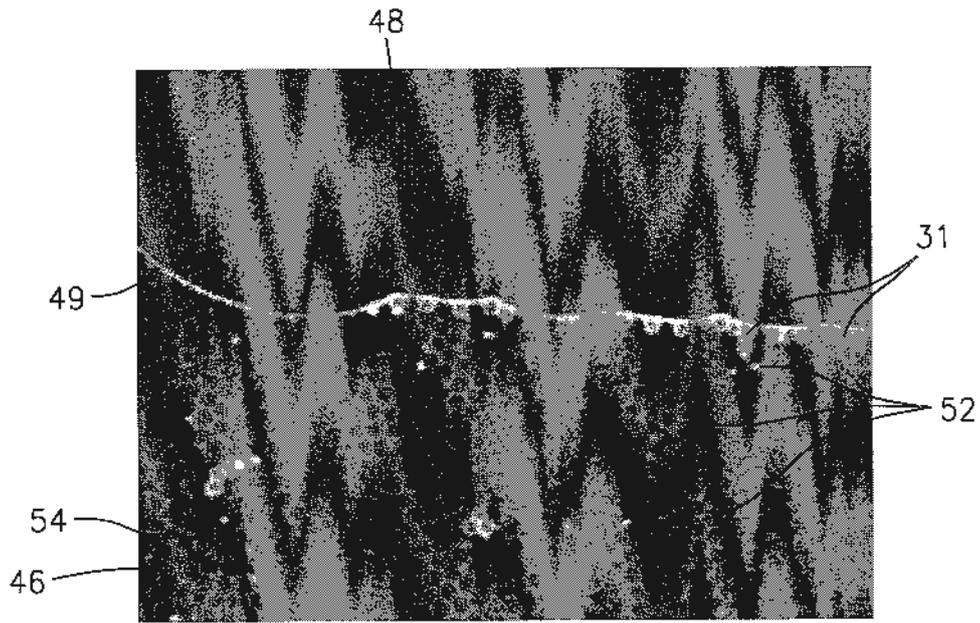
FIG. 5



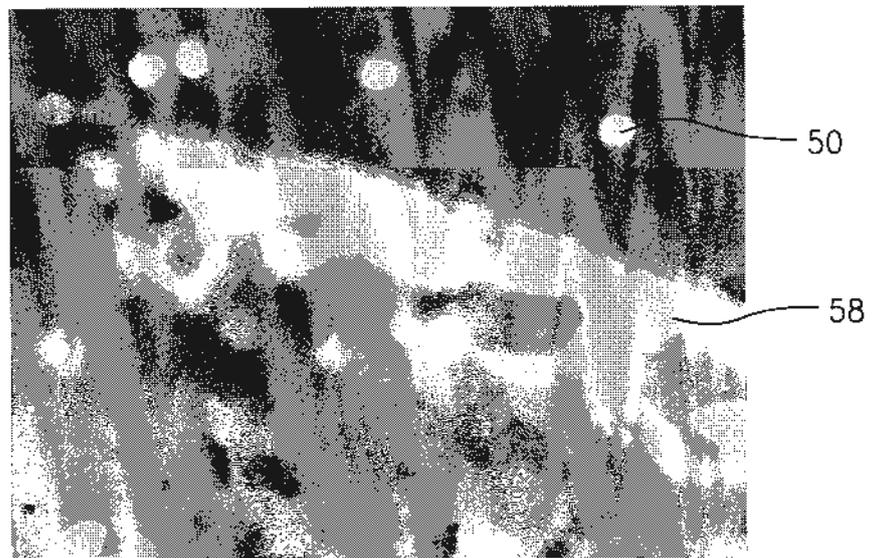
**FIG. 6**  
(Leucocitos y plaquetas)



**FIG. 7**  
(Sangre / línea de cola)



**FIG. 8**  
(Interfaz muestra / aire)



**FIG. 9**  
(Área de entrada de la cámara)

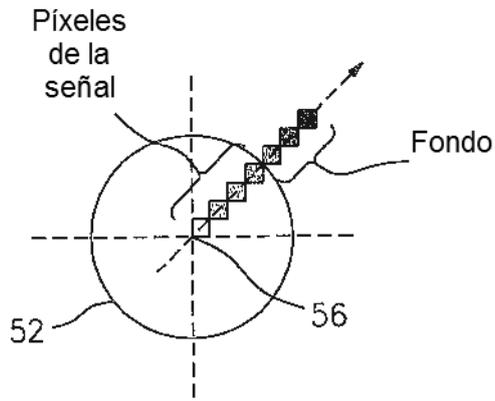


FIG. 10

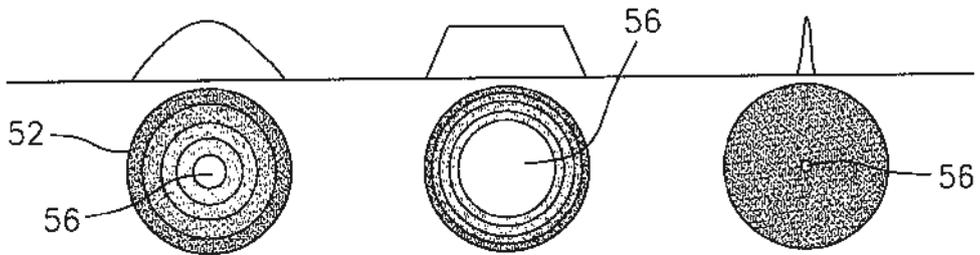


FIG. 11a

FIG. 11b

FIG. 11c

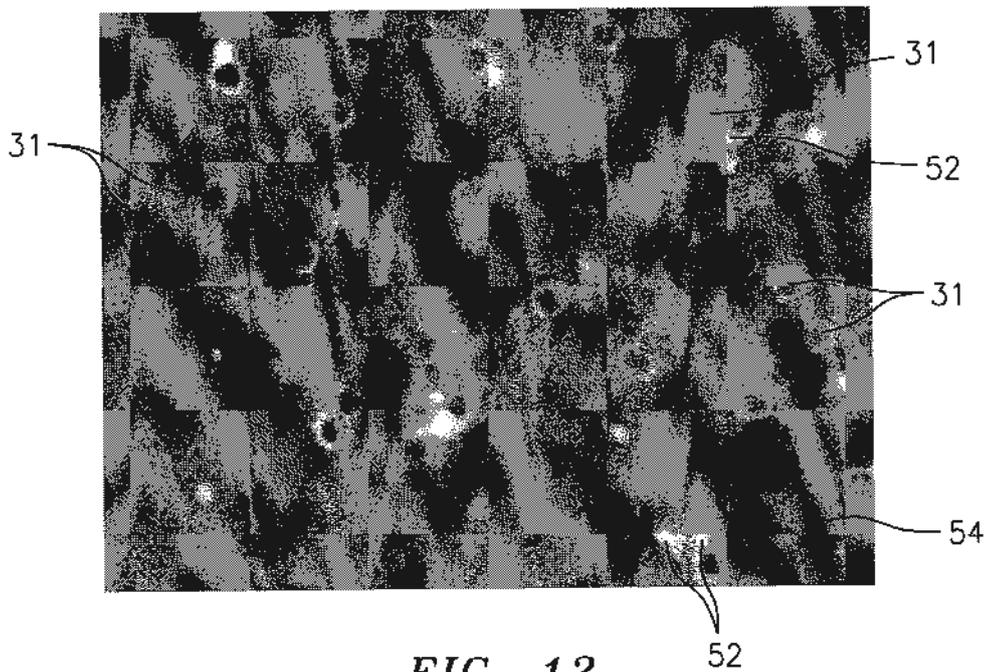
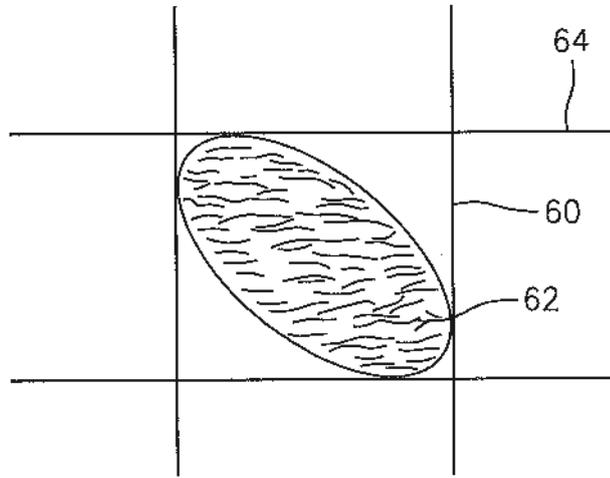
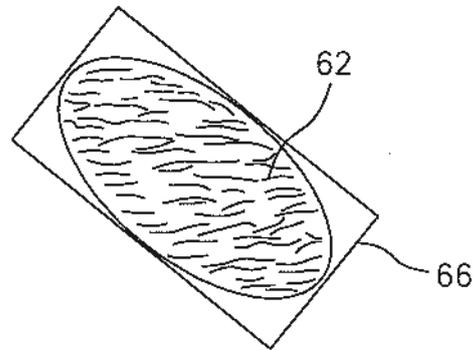


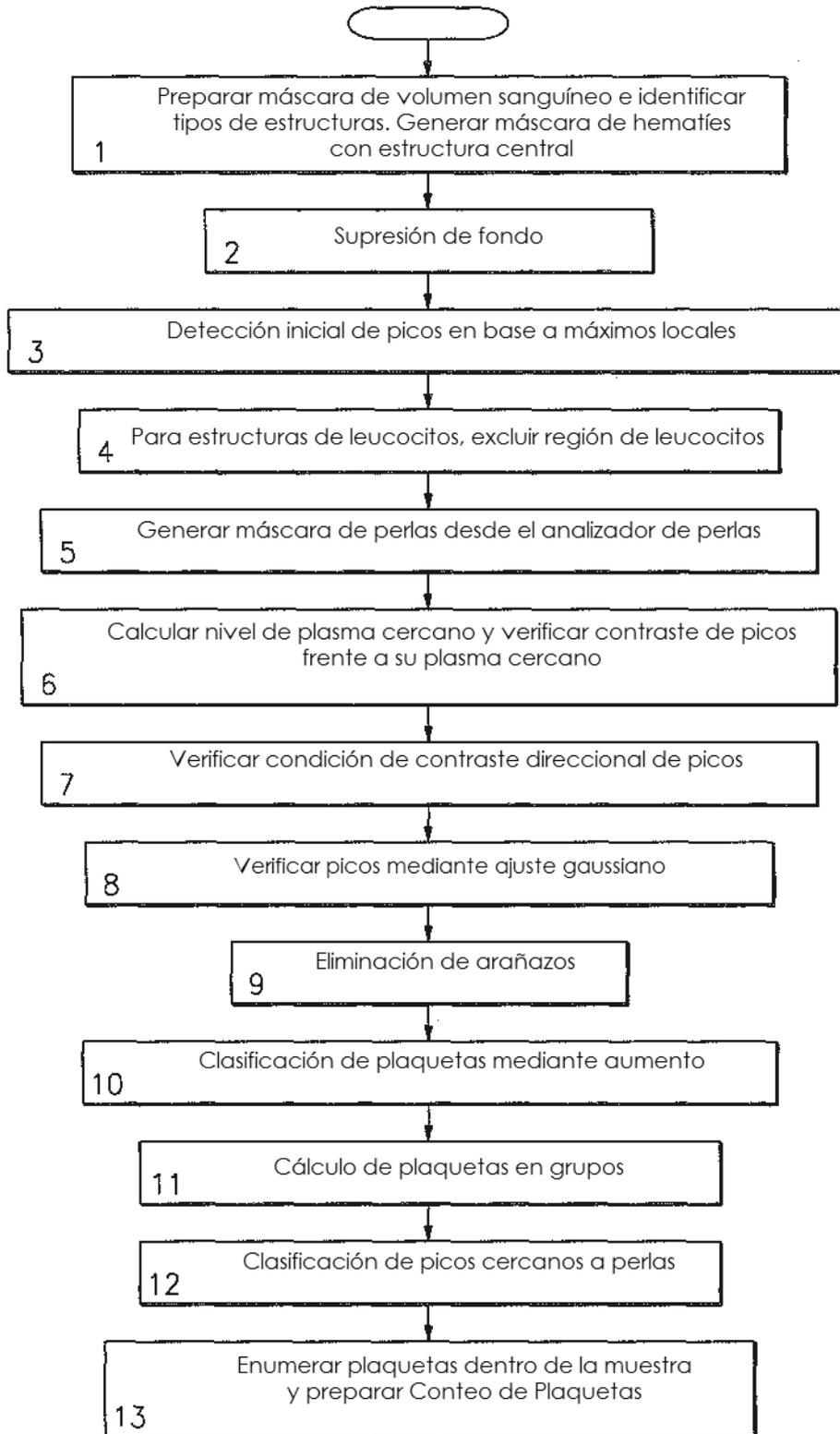
FIG. 12



*FIG. 13*



*FIG. 14*



**FIG. 15**