

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 927**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

G06T 7/00 (2006.01)

G06T 7/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.04.2009 PCT/US2009/040057**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2009 WO09126800**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2009 E 09731372 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2269033**

54 Título: **Procedimiento para medir el área de una muestra dispuesta dentro de una cámara de análisis**

30 Prioridad:

09.04.2008 US 43567

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

24.01.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LALPURIA, NITEN, V. y
WARDLAW, STEPHEN, C.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 597 927 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 para medir el área de una muestra dispuesta dentro de una cámara de análisis

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. CAMPO TÉCNICO

10 La presente invención se refiere a procedimientos para el análisis de muestras de fluidos biológicos en general, y a aparatos y procedimientos para determinar el área rellenada por la muestra dentro de una cámara de análisis en particular.

2. Información de antecedentes

15 Los médicos, veterinarios y científicos han examinado fluidos biológicos de animales y seres humanos, especialmente la sangre, con el fin de determinar las cantidades componentes, así como para identificar la presencia de partículas inusuales que no se observan en sujetos sanos. Los componentes generalmente medidos, cuantificados e identificados incluyen glóbulos rojos (eritrocitos), glóbulos blancos (leucocitos) y plaquetas.

20 El documento US 2007/0243117 A1 divulga una cámara desechable para el análisis de fluidos biológicos. El documento WO 2005/029413 A1 divulga un procedimiento y un aparato para determinar el área o confluencia de una muestra.

25 Técnicas de examen de sangre conocidas, descritas en detalle en textos médicos, como Hematología Clínica de Wintrobe, 12ª edición, por lo general dividen los procedimientos de investigación en procedimientos manuales, por centrifugado, y por impedancia. Los procedimientos manuales típicamente implican la creación de un volumen determinado con precisión de una muestra de sangre o fluido que se diluye cuantitativamente y se recuenta visualmente en una cámara de recuento. Los procedimientos de examen manuales incluyen el examen de un frotis periférico donde las cantidades relativas de los tipos de partículas se determinan mediante inspección visual. Los procedimientos de examen por centrifugación implican centrifugar la muestra, causando que la muestra se separe en capas componentes de acuerdo con las densidades relativas de los componentes. Las capas componentes se pueden teñir para mejorar la visibilidad o la detección. Los procedimientos de impedancia implican el examen de un volumen exacto de sangre que se trata de acuerdo con el material en partículas que se está midiendo; por ejemplo, la lisis de los eritrocitos para la enumeración de las células nucleadas y la dilución volumétrica de la muestra en un fluido conductor. El proceso implica típicamente monitorizar una corriente o tensión aplicada a la muestra que pasa a través de un paso estrecho para determinar el efecto que las partículas tienen en la corriente/tensión cuando las partículas pasan a través del mismo en fila de a uno. Otras técnicas implican el análisis de la intensidad y el ángulo de dispersión de la luz incidente a las partículas que pasan a través de un haz de luz en fila de a uno.

40 Todos los procedimientos anteriormente mencionados, a excepción del frotis periférico o la separación por centrifugado, requieren dispensar un volumen exacto de muestra. Las imprecisiones en el volumen de la muestra darán como resultado errores cuantitativos de la misma magnitud en el análisis asociado. Con la excepción de los procedimientos por centrifugado, todos los procedimientos mencionados anteriormente también requieren que la muestra se mezcle con uno o más reactivos o diluyentes líquidos, y también requieren la calibración del instrumento para obtener resultados precisos. En el caso de los frotis periféricos, se necesita un alto grado de práctica para examinar adecuadamente el frotis. Una cantidad de los procedimientos anteriormente mencionados genera grandes volúmenes de residuos contaminados, lo que es caro de gestionar.

SUMARIO DE LA INVENCION

50 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para determinar el área de una cámara de análisis cubierta por una muestra de fluido biológico que reside en reposo dentro de la cámara. Este procedimiento se define en la reivindicación 1.

55 Una cámara de análisis que tiene un par de paneles transparentes separados por una altura uniforme proporciona un vehículo conveniente para el análisis de la muestra. Para muchos análisis, es útil (o necesario) conocer el volumen de la muestra que se está analizando, pero es difícil dispensar una cantidad de la muestra conocida con precisión. Para evitar el problema de dispensar cantidades de muestra conocidas con precisión, sería útil medir el área de la película generada en la cámara de análisis antes mencionada y multiplicar esa área por la altura de la cámara para determinar el volumen de muestra añadido. Si la sangre (u otro fluido biológico) se distribuyera en formas geométricamente perfectas, esto sería relativamente fácil, pero las muestras, al dispersarse a través de la cámara desde su punto de aplicación, a menudo atrapan burbujas de aire o tienen bordes serpenteantes. La tarea de determinar el área de una muestra dentro de una cámara es particularmente problemática para muestras de sangre que tienen un bajo número de glóbulos rojos, donde el plasma relativamente claro se separará de la mayoría de la muestra, y esta área relativamente incolora puede no estar incluida en los cálculos de área, si la coloración del área de la muestra es el único criterio utilizado para el cálculo del área. El presente procedimiento proporciona una

forma precisa de determinación del área de una muestra y por lo tanto del volumen en una cámara de altura uniforme, y de ese modo proporciona una solución a los problemas asociados con la dispensación de un volumen de muestra preciso.

- 5 El presente procedimiento y las ventajas asociadas con el mismo se harán más fácilmente evidentes a la vista de la descripción detallada proporcionada a continuación, incluyendo los dibujos adjuntos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 10 La FIG. 1 es una vista en sección esquemática de una cámara de análisis que contiene una muestra de sangre. La FIG. 2 es una vista en sección esquemática de un modo de realización de una cámara de análisis. La FIG. 3 es una vista en sección esquemática de un modo de realización de una cámara de análisis. La FIG. 4 es una vista en sección esquemática de un modo de realización de una cámara de análisis. La FIG. 5 es una vista plana esquemática de una cámara de análisis. La FIG. 6 es una imagen esquemática de una muestra de sangre dispuesta dentro de una cámara, iluminada para resaltar los glóbulos rojos dispuestos dentro de la muestra. La FIG. 7 es una imagen esquemática de una muestra de sangre dispuesta dentro de una cámara, como se muestra en la FIG. 6, iluminada para resaltar las interfaces entre la muestra y el aire dentro de la muestra. La FIG. 8 es una imagen esquemática de una muestra dispuesta dentro de una cámara, como se muestra en las FIGS. 6 y 7, con la región que contiene la muestra enmascarada digitalmente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

- 25 La presente invención proporciona uno o más procedimientos para determinar el área de una muestra de fluido biológico que reside en reposo dentro de una cámara de análisis. Dependiendo del análisis, la propia área de la muestra puede proporcionar información útil y deseable. En otros análisis, el área se puede utilizar para determinar el volumen de la muestra dentro de la cámara; por ejemplo, cuando se conoce o es determinable la altura de la cámara, el volumen de la muestra se puede determinar utilizando el área y la altura conocida o determinable de la cámara.

- 30 El presente (los presentes) procedimiento(s) se puede realizar con una cámara de análisis que es operable para albergar en reposo una muestra de fluido biológico (por ejemplo, una muestra de sangre entera anticoagulada sustancialmente sin diluir) para su análisis. La cámara está típicamente dimensionada para contener entre 0,2 ml y 1,0 ml de muestra, pero el procedimiento no se limita al uso con cualquier volumen de la cámara particular y el volumen de la cámara puede variar para adaptarse a la aplicación de análisis. En aquellos casos en los que se lleva a cabo el presente procedimiento en una muestra de sangre entera dispuesta dentro de una cámara, la muestra típicamente está "sustancialmente sin diluir", lo que significa que la muestra de sangre o bien no ha diluido en absoluto o no se ha diluido intencionadamente, pero se han añadido algunos reactivos a la misma para los propósitos del análisis. En la medida en que la adición de los reactivos diluya la muestra de sangre, en todo caso, dicha dilución no tiene impacto clínicamente significativo en los análisis realizados. Un ejemplo de un reactivo que puede utilizarse con la muestra de sangre es un anticoagulante (por ejemplo, EDTA, heparina), que normalmente se añade en forma seca y no está destinado a diluir la muestra. Los anticoagulantes no son necesarios para todos los análisis de sangre, sin embargo. En determinadas circunstancias (por ejemplo, un análisis muy rápido, tal como puede ocurrir cuando la sangre se extrae de una punción en el dedo del paciente o en el talón de un neonato), puede que no sea necesario añadir el agente anticoagulante. El término "en reposo" se utiliza aquí para describir que la muestra se deposita dentro de la cámara para su análisis, y no se mueve intencionadamente respecto a la cámara durante el análisis. En la medida en que está presente movimiento dentro de la muestra de sangre, este será predominantemente debido al movimiento browniano de los componentes formados de la muestra de sangre, movimiento que no imposibilita la utilización del dispositivo de esta invención.

- 50 A continuación, con referencia a las FIGS. 1-3, un ejemplo de una cámara de análisis 10 aceptable es una que incluye un primer panel 12 que tiene una superficie interior 14, y un segundo panel 16 que tiene una superficie interior 18. Los paneles 12, 16 son paralelos entre sí, y dentro de esas porciones las superficies interiores 14, 18 están separadas una de otra por una altura 20, altura que puede ser conocida o medible. Se prefiere una cámara de análisis que tiene paneles paralelos 12, 16 por al menos la razón de que la altura uniforme de la cámara facilita una determinación del volumen de muestra. No se requieren paneles de cámara paralelos para determinar el área de la muestra, o para determinar el volumen de muestra, sin embargo; por ejemplo, se podría utilizar una cámara que tiene un panel dispuesto en un ángulo conocido no paralelo en relación con el otro panel.

- 60 La cámara 10 mostrada en las FIGS. 1-3 incluye al menos tres separadores 26 dispuestos entre los paneles 12, 16. Los separadores 26 pueden ser de cualquier estructura que se pueda disponer entre los paneles 12, 16, operable para separar entre sí los paneles 12, 16. Las alturas 28 de los separadores 26 normalmente no son exactamente iguales entre sí (por ejemplo, debido a tolerancias de fabricación), pero están dentro de la tolerancia aceptable comercialmente para medios de separación utilizados en aparatos de análisis similares. Cuentas esféricas son un ejemplo de un separador 26 aceptable y están disponibles comercialmente por parte de, por ejemplo, Bangs Laboratories de Fishers, Indiana, EE.UU.

En el modo de realización mostrado en la FIG. 2, los separadores 26 consisten en un material que tiene una mayor flexibilidad que uno o ambos del primer panel 12 y el segundo panel 16. Como se puede observar en la FIG. 2, los separadores 26 más grandes son comprimidos hasta el punto en el que la mayoría de los separadores 26 están tocando las superficies interiores de los paneles 12, 16, lo que hace que la altura de la cámara sea tan solo ligeramente menor que los diámetros promedio del separador 26. En el modo de realización mostrado en la FIG. 3, los separadores 26 consisten en un material que tiene menos flexibilidad que uno o ambos del primer panel 12 y el segundo panel 16. En la FIG. 3, el primer panel 12 está formado de un material más flexible que los separadores 26 esféricos y el segundo panel 16, y se superpondrá a los separadores 26 de una forma de tienda de campaña. En este modo de realización, aunque pequeñas regiones locales de la cámara 10 puede desviarse de la altura 20 deseada de la cámara, la altura 20 promedio de la cámara 10 será muy similar a la del diámetro promedio del separador 26. El análisis indica que la altura 20 promedio de la cámara puede ser controlada al uno por ciento (1%) o mejor en alturas de cámara de menos de cuatro micras utilizando este modo de realización. Sin perjuicio de las características de flexibilidad descritas anteriormente, los separadores 26 y los paneles 12, 16 se pueden hacer de una variedad de materiales, siempre que los paneles 12, 16 sean suficientemente transparentes. Películas de plástico transparentes que consisten en acrílico o poliestireno son ejemplos de paneles 12, 16 aceptables, y perlas esféricas de poliestireno, policarbonato, silicona, y similares, son separadores 26 aceptables. Haciendo referencia a la FIG. 4, el panel 12 que ha de ser dispuesto verticalmente por encima del otro incluye una pluralidad de orificios 30 dispuestos a intervalos regulares (por ejemplo, al menos algunos de los cuales puede actuar como una salida de aire), y los paneles 12, 16 están unidos entre sí en puntos. En algunos modos de realización, el material de unión 32 forma una pared de la cámara exterior operable para contener lateralmente la muestra 34 dentro de la cámara de análisis 10. En otros modos de realización, uno o ambos paneles 12, 16 puede tener una superficie modificada hidrófobamente que funciona como una pared de la cámara para contener lateralmente la muestra dentro de la cámara de análisis 10. El material de unión o la superficie modificada hidrófobamente puede incluir un colorante sensible que se puede utilizar para identificar la ubicación de la periferia de la cámara. Ejemplos de una cámara de análisis aceptable se describen en mayor detalle en la publicación de la solicitud de patente US 2007/0243117, 2007/0087442, y en la patente US 6.723.290. El presente procedimiento no está, sin embargo, limitado a estos modos de realización particulares de cámara.

El análisis de la muestra dispuesta en reposo dentro de la cámara 10 se realiza utilizando un dispositivo de análisis que es operable para iluminar y obtener imágenes de al menos una parte de la muestra y realizar un análisis de la imagen. La imagen se produce de una manera que permite que uno o ambos de la absorbancia de la luz a través de, y las emisiones fluorescentes desde, al menos, una porción de la muestra se determinen por unidad de imagen. El término "por unidad de imagen" tiene el significado de una unidad incremental de la cual la imagen de la muestra puede ser diseccionada. Un píxel que generalmente se define como el elemento más pequeño de una imagen que puede ser procesado de forma individual dentro de un sistema de formación de imágenes particular, es un ejemplo de una unidad de imagen, y una unidad de imagen también puede incluir un pequeño número de píxeles en una unidad colectiva. El aumento de un dispositivo de formación de imágenes también puede ser descrito en términos lineales (por ejemplo, micras por píxel en el plano focal), donde la dimensión lineal es a lo largo de un eje particular de una cuadrícula ortogonal aplicada a la imagen. Por consiguiente, el área real de la muestra capturada por píxeles del sensor en el plano focal es una función del factor de aumento aplicado por el dispositivo de formación de imágenes. Por lo tanto, el aumento del dispositivo de visualización debe ser conocido o determinable. Por consiguiente, el volumen asociado con ese píxel es el área de la imagen por píxel multiplicada por la altura de la cámara conocida. Por ejemplo si el aumento fue de 0,5 micras por píxel, una imagen que ocupa 200 píxeles tendría un área de 50 micras cuadradas y un volumen de 50 micras cuadradas multiplicado por la altura de la cámara.

A continuación con referencia a la FIG. 5, un ejemplo de un dispositivo de análisis 44 que se puede adaptar para su uso con el presente procedimiento incluye un iluminador de muestra 46, un disector de imagen 48, y un analizador programable 50. El iluminador de muestra 46 produce selectivamente luz a lo largo de ciertas longitudes de onda deseadas utilizando ya sea una fuente que emite luz a lo largo de determinadas longitudes de onda deseadas (por ejemplo, LEDs) o que emite luz a lo largo de un rango de longitud de onda amplio. Un iluminador 46 capaz de funcionar para producir luz a aproximadamente 413 nm y aproximadamente 540 nm es particularmente útil para el análisis de muestras de sangre debido a la absorción sustancial de luz que se produce dentro de la hemoglobina en estas longitudes de onda (es decir, un alto coeficiente de extinción molar (ϵ) en longitudes de onda anteriormente mencionadas). La absorción de la luz es un tipo de "interacción" entre las longitudes de onda de la luz y la muestra. El iluminador de muestra 46 se puede configurar para producir la luz en un modo de transmitancia, o en un modo de epi-iluminación, o ambos, con respecto a la cámara 10, y el iluminador de muestra 46 es operable para iluminar parte, o la totalidad, de la muestra que reside dentro de la cámara 10. En el modo de transmitancia, una parte de fuente de luz del iluminador de muestra 46 se coloca en un lado de la muestra que reside dentro de la cámara 10 y se dirige la luz a través de la muestra en reposo dispuesta entre los paneles de la cámara, y después de ello al disector de imagen 48.

Un ejemplo de un disector de imagen 48 aceptable es un dispositivo de acoplamiento de carga (CCD) que convierte una imagen de la luz que pasa a través de la muestra en un formato electrónico de datos (es decir, una señal). Los sensores de imagen del tipo de semiconductor complementario de óxido metálico ("CMOS") son otro ejemplo de un sensor de imagen que se puede utilizar, y la presente invención no se limita a cualquiera de estos ejemplos.

El analizador programable 50 incluye una unidad de procesamiento central (CPU) y está conectado (al menos electrónicamente y/u ópticamente) al iluminador de muestra 46 y el disector de imagen 48. La CPU está adaptada (por ejemplo, programada) para llevar a cabo de forma selectiva las funciones necesarias para llevar a cabo el presente procedimiento. Debe tenerse en cuenta que la funcionalidad de analizador programable puede implementarse utilizando hardware, software, firmware, o una combinación de los mismos. Una persona experta en la técnica sería capaz de programar la unidad de procesamiento para llevar a cabo la funcionalidad descrita en el presente documento sin excesiva experimentación. La patente US 6.866.823 titulada "Aparato para analizar fluidos biológicos" y publicada el 15 de marzo de 2005, describe un dispositivo de análisis de este tipo.

El dispositivo de análisis 44 está adaptado para: 1) iluminar la muestra dispuesta dentro de la cámara de análisis con una o más longitudes de onda operables para resaltar interfaces entre la muestra y el aire y al menos un componente dentro de la muestra; 2) obtener imágenes de la muestra a lo largo de las longitudes de onda, y producir señales de imagen representativas de la interacción de las longitudes de onda con la muestra; y 3) determinar al menos una interfaz entre la muestra y el aire, usando las señales de imagen.

En algunos modos de realización, el dispositivo de análisis 44 está adaptado además para determinar al menos una región de muestra y al menos una región fuera de la muestra, separadas una de otra por una o más interfaces aire-muestra. Cada región de muestra contiene al menos un componente de la muestra. Cada región fuera de la muestra no contiene un componente de la muestra. La relación espacial que implica regiones de muestra, regiones fuera de la muestra, e interfaces aire-muestra puede ser descrita de tal manera que una región de muestra está dispuesta en un primer lado de una interfaz aire-muestra y una región fuera de la muestra se dispone en un segundo lado de la misma interfaz aire-muestra, en la que los lados primero y segundo son "opuestos" uno al otro. También hay que señalar que las geometrías de las zonas de muestra y zonas de fuera de la muestra pueden variar ampliamente y rara vez se limitan a una sola línea de demarcación; por ejemplo, las muestras a menudo contienen burbujas de aire, etc. En consecuencia, las regiones de muestra y las regiones fuera de la muestra también pueden ser descritas como complementándose entre sí dentro de la cámara de análisis. Como se indicó anteriormente, los componentes dentro de una muestra de sangre incluyen, pero no están limitados a, glóbulos rojos (eritrocitos), glóbulos blancos (leucocitos) y plaquetas. Si un colorante sensible se mezcla con plasma, tinte que hace que la presencia de plasma sea fácilmente discernible, entonces el plasma puede también ser considerado como un componente de una muestra de sangre. En estos modos de realización, el dispositivo de análisis 44 está adaptado además para determinar un área de la cámara que contiene la muestra, utilizando al menos una de una región de muestra y una región fuera de la muestra.

En otros modos de realización, el dispositivo de análisis está adaptado para: 1) localizar componentes dentro de la muestra, y proporcionar un enmascaramiento digital que enmascare una de las regiones de muestra o de fuera de la muestra; y 2) determinar un área de la cámara que contiene la muestra, utilizando el área enmascarada. El término enmascaramiento digital tal como se utiliza aquí se refiere a un proceso de obtención de imágenes binario en el que a todas las unidades de imagen (por ejemplo, píxeles) en un área identificada (por ejemplo, una región de muestra) se les asigna un valor particular para distinguir aquellas unidades de imagen de las unidades de imagen que contiene los valores de la imagen representativos de la muestra iluminada de la que obtiene la imagen. Las unidades de imagen enmascaradas, que son fácilmente distinguibles, pueden ser procesadas a continuación; por ejemplo, sumadas para determinar un área.

En otros modos de realización, la presente invención incluye un colorante depositado sobre al menos una superficie interior de la cámara. El colorante (por ejemplo, un colorante fluorescente tal como naranja de acridina) mezclado con la muestra se puede detectar usando iluminación, y se puede utilizar para determinar las interfaces aire-muestra. En aquellos casos en donde se utiliza un colorante fluorescente, la señal sensible es una emisión fluorescente a una longitud de onda particular, creada por una fuente de luz de excitación del colorante fluorescente a otra longitud de onda. La creación de la emisión fluorescente puede ser descrita como un resultado de la "interacción" de la luz utilizada para iluminar la muestra.

Los siguientes ejemplos del presente procedimiento se describen en el contexto del presente procedimiento aplicado a una muestra de sangre entera anticoagulada colocada entre los dos paneles transparentes de una cámara, paneles que están separados por una altura uniforme. Estos ejemplos se proporcionan para ilustrar la utilidad del presente procedimiento, y el presente procedimiento no se debe interpretar como limitado a los mismos y, en particular, debe interpretarse como limitado a la determinación del área de una muestra de sangre entera.

En un modo de realización del procedimiento, la muestra se ilumina y se obtiene la imagen usando una pluralidad de longitudes de onda de luz. Una o más de las longitudes de onda elegidas resaltará uno o más componentes diana dentro de la imagen de la muestra. Para sangre entera, puede ser usada una longitud de onda que es o bien alrededor de 415 nm o alrededor de 540 nm para resaltar eficazmente los eritrocitos porque la luz en estas longitudes de onda es bien absorbida por la hemoglobina contenida en los glóbulos rojos. Los eritrocitos "resaltados" pueden identificarse utilizando un valor umbral de densidad óptica que es indicativo de la absorción de luz asociada con la hemoglobina. Unidades de imagen que cumplen o superan el valor predeterminado de densidad óptica (o menor que el umbral si se utilizan técnicas de exclusión) se identifican como alineadas con un eritrocito.

Como alternativa a la utilización de absorción de luz por la hemoglobina, ciertos glóbulos rojos y otros componentes (por ejemplo, leucocitos y plaquetas) se pueden resaltar con un colorante fluorescente (por ejemplo, naranja de acridina) u otro colorante sensible mezclado con la muestra. Una ventaja de utilizar eritrocitos como un componente "diana" dentro de una muestra de sangre es que en términos relativos, los eritrocitos son los componentes más abundantes dentro de la muestra de sangre y, en consecuencia más probable que se encuentre en cualquier región particular que contiene la muestra. La FIG. 6 es una imagen de una muestra de sangre 52 dispuesta dentro de una cámara, en la que los eritrocitos 22 se han resaltado. La imagen incluye un par de partículas separadoras 26, un eritrocito 22, y una pluralidad de bolsas de aire 54.

En este modo de realización, la muestra 52 también se ilumina con una o más longitudes de onda elegidas para resaltar la interfaz 56 entre la muestra 52 y el aire. Cuando la muestra 52 se ilumina con esta longitud de onda, los contenidos de la muestra 52 son típicamente relativamente incoloros pero la interfaz entre la muestra y el aire esté claramente indicada por la refracción de la luz en la longitud de onda que se produce en la interfaz aire-muestra 56. Una amplia variedad de longitudes de onda se puede utilizar para identificar la interfaz aire-muestra. Cuando el fluido biológico que se analiza es sangre entera, una longitud de onda igual o superior a 600 nm, y más preferiblemente de aproximadamente 700 nm, funciona bien para resaltar las interfaces aire-muestra. La FIG. 7 es la imagen de la muestra de sangre mostrada en la FIG. 6, con las interfaces aire-muestra 56 ahora resaltadas.

Como se indicó anteriormente, una amplia variedad de longitudes de onda se puede utilizar para identificar la interfaz aire-muestra 56. En algunos casos, las longitudes de onda utilizadas para resaltar las interfaces 56 también se pueden utilizar para resaltar los componentes diana (por ejemplo, eritrocitos 22) dentro de la muestra 52. Como resultado, se pueden obtener imágenes de la muestra 52 con luz a una sola longitud de onda, obviando así la necesidad de proporcionar luz a dos longitudes de onda diferentes.

Muestras de fluidos biológicos dispuestas dentro de una cámara de análisis rara vez tienen interfaces aire-muestra 56 perfectamente rectas o curvas. Es mucho más típico que una muestra 52 tenga una interfaz aire-muestra con una geometría irregular, no uniforme. Una variedad de técnicas se pueden utilizar para localizar las interfaces aire-muestra dentro de las cámaras, y la presente invención no se limita a ninguna técnica particular. Por ejemplo, una técnica de segmentación se puede utilizar para identificar las unidades de imagen (por ejemplo, píxel) dentro de la imagen que tienen una o más características particulares (por ejemplo, una unidad de imagen que tiene una intensidad de luz de x%); es decir, utilizar las características como elementos identificadores. Los píxeles que tienen esas características predeterminadas que son indicativas de una interfaz aire-muestra 56 se identifican y se asignan con relación a la cámara de muestra, identificando de este modo su posición dentro de la imagen. Los píxeles que tienen características que son indicativas de un componente diana (por ejemplo, eritrocito 22) también se identifican y localizan.

Las posiciones relativas de la una o más interfaces aire-muestra 56 y los componentes diana (por ejemplo, eritrocitos 22) definen dónde se encuentra la muestra 52 y dónde no. Una vez que los límites de la(s) región(es) de la muestra 58 y la(s) región(es) fuera de la muestra 60 están definidas, el área de cada región 58, 60 se puede determinar sumando el área asociada con cada unidad de imagen situada dentro de esa región 58, 60 en particular. Si se suman las áreas de la unidad de imagen dentro de la(s) región(es) de la muestra 58, entonces el área total de las regiones de muestra 58 representa el área total de la muestra 52 dispuesta dentro de la cámara. Debe apreciarse que en las FIGS. 6-8, la muestra se ve ocupando una sola región de muestra 58. En muchos casos, las muestras de fluido pueden asumir una pluralidad de regiones de muestra 58 independientes dentro de una cámara particular.

En otra realización, una vez que las interfaces aire-muestra 56 y los componentes diana se localizan, la zona se puede determinar utilizando una técnica de enmascaramiento binario digital que enmascara iterativamente de modo digital unidades de imagen dentro de las regiones de muestra. En un ejemplo de un procedimiento de enmascaramiento binario digital, unidades de imagen contiguas con un componente se enmascaran en un procedimiento iterativo, en direcciones que se extienden hacia fuera del componente hasta que se encuentra una unidad de imagen ya enmascarada, o un límite de la cámara. Además, las unidades de imagen contiguas con una interfaz aire-muestra 56, en el lado del componente de la interfaz también se enmascaran en un procedimiento iterativo, en una dirección que se extiende hacia fuera de la interfaz 56 hasta que se encuentra una unidad de imagen ya enmascarada, o un límite de la cámara. El proceso continúa iterativamente hasta que la totalidad o sustancialmente la totalidad de las unidades de imagen dentro de esa región respectiva de la muestra están enmascaradas. La FIG. 8 ilustra una versión enmascarada de la muestra de sangre mostrada en las FIGS. 6 y 7.

La presente invención no se limita al ejemplo anteriormente descrito de una máscara de procedimiento de enmascaramiento binario digital. El procedimiento de enmascaramiento puede enmascarar alternativamente las regiones utilizando operaciones de procesamiento de imágenes, tales como algoritmos de localización de borde y similares.

El área de la región de muestra se puede determinar posteriormente sumando el área asociada con cada unidad de imagen enmascarada para llegar al área total de la región de muestra particular. El área total de las regiones de muestra representa el área total de la muestra dispuesta dentro de la cámara. El área de las regiones de muestra también se puede determinar usando un procedimiento de contraste si el área total de la cámara representada por

imagen es conocida o determinable. En tales casos, el área de las regiones fuera de la muestra puede ser enmascarada y determinada y luego restada del área de imagen total para llegar al área de la región de muestra. El área total representada por imagen se puede determinar sumando el área por unidad de imagen de toda la imagen. Si el área total representada por imagen se forma simétricamente, el área de una porción del área total representada por imagen puede ser determinada y se puede aplicar posteriormente el multiplicador apropiado para llegar al área total representada por imagen.

En algunos modos de realización, la identificación de las interfaces aire-muestra se puede facilitar mediante la aplicación de una capa seca de colorante sensible dentro de la cámara. Una muestra que entra y viaja dentro de la cámara capta una cantidad desproporcionada del colorante sensible (es decir, el naranja de acridina) en la interfaz aire-muestra. La concentración de colorante sensible en la interfaz aire-muestra pone de manifiesto la interfaz y hace que sea más fácil de identificar.

Como se indicó anteriormente, algunas cámaras de análisis incluyen el separador de partículas 26 para mantener una altura 20 uniforme de la cámara. Tales partículas se pueden formar con características (por ejemplo, teñido) que las hacen discernibles fácilmente dentro de la imagen de la muestra. En el caso de que tales partículas estén dispuestas dentro de una región de muestra, el área de cada una puede tenerse en cuenta en el cálculo del área de la región de muestra (por ejemplo, en la región de enmascarado mostrada en la FIG. 8, el área asociada con las partículas de separación 26 no está incluida en el área enmascarada de la muestra). El volumen de las partículas 26 dentro de un área enmascarada también puede tenerse en cuenta dado el volumen conocido de los separadores.

En un modo de realización alternativo, se puede utilizar una cámara que tiene una parte delimitada por una o más barreras que forman un área conocida dispuesta entre ellas. Las barreras están separadas por una distancia, y se posicionan dentro de la cámara, para aumentar la probabilidad de que el área conocida se llene con la muestra.

Aunque la invención se ha mostrado y descrito con referencia a modos de realización específicos de la misma, debe entenderse por los expertos en la técnica que pueden hacerse diversos cambios de forma y detalle sin apartarse del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para determinar el área de una cámara de análisis (10) cubierta por una muestra de fluido biológico (52) que reside en reposo dentro de la cámara (10), cuya cámara (10) tiene un primer panel (12) con una superficie interior (14), y un segundo panel (16) con una superficie interior (18), ambos de cuyos paneles (12, 16) son transparentes, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - iluminar la muestra (52) que reside dentro de la cámara de análisis (10) con una o más longitudes de onda operables para resaltar las interfaces (56) entre la muestra (52) y el aire, y para resaltar al menos un componente dentro de la muestra (52); obtener imágenes de la muestra (52) a lo largo de la una o más longitudes de onda, y producir señales de imagen representativas de la interacción de la una o más longitudes de onda con la muestra (52); caracterizado por que dicho procedimiento comprende además:
 - determinar una ubicación de al menos una interfaz aire-muestra (56) entre la muestra (52) y el aire, usando las señales de imagen; determinar una ubicación de uno o más componentes (22) dentro de la muestra (52) con relación a la al menos una interfaz aire-muestra (56) usando las señales de imagen;
 - determinar una o más regiones de muestra (58) que contienen al menos un componente (22) y dispuestas en un primer lado de la al menos una interfaz aire-muestra (56), y una o más regiones fuera de la muestra (60) que no contienen un componente y dispuestas en un segundo lado de la al menos una interfaz aire-muestra (56), en el que la ubicación del uno o más componentes (22) con relación a la al menos una interfaz aire-muestra (56) se utiliza para determinar la una o más regiones de muestra (58) y/o la una o más regiones fuera de la muestra (60); y
 - determinar un área de la cámara (10) que contiene la muestra (52), en el que la etapa de determinar un área de la cámara (10) comprende sumar un área asociada con cada unidad de imagen situada dentro de la región de muestra (58) o de la región fuera de la muestra (60).
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de enmascarar o bien la región de muestra (58) que contiene el uno o más componentes (22) en el primer lado de la interfaz aire-muestra (56), o la región fuera de la muestra (60) en el segundo lado de la interfaz aire-muestra (56), segundo lado que es el opuesto al primer lado.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el área de la cámara (10) que contiene la muestra (52) se determina mediante la suma de un área por unidad de imagen en al menos una de las regiones enmascaradas o no enmascaradas.
4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el área de la cámara (10) que contiene la muestra (52) se determina mediante la suma del área de las unidades de imagen en la región fuera de la muestra y restándolas de un área de cámara conocida.
5. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la etapa de enmascarar comprende:
 - a) enmascarar iterativamente unidades de imagen que se extienden hacia fuera desde unidades de imagen alineadas con un componente (22), hasta que se encuentren una o más de las unidades de imagen enmascaradas, interfaz aire-muestra (56), y una barrera lateral de la cámara; y/o
 - b) enmascarar iterativamente unidades de imagen que se extienden hacia fuera desde unidades de imagen alineadas con la al menos una interfaz aire-muestra (56), hasta que se encuentren otras unidades de imagen enmascaradas o una barrera lateral la de cámara.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de enmascarar o bien la una o más regiones de muestra (58) o la una o más regiones fuera de la muestra (60).
7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el área de la cámara (10) que contiene la muestra (52) se determina:
 - a) sumando el área de las unidades de imagen en cada una de la una o más regiones de muestra (58); y/o
 - b) sumando el área de las unidades de imagen en cada una de la una o más regiones fuera de la muestra (60) y restándolas de un área de cámara conocida.
8. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el enmascaramiento incluye un enmascaramiento digital binario de unidades de imagen dentro de la una o más regiones de muestra (58) o regiones fuera de la muestra (60).
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los componentes (22) son al menos uno de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas.

10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la etapa de iluminar la muestra (52) que reside dentro de la cámara de análisis (10) incluye iluminar la muestra (52) con una primera longitud de onda y una segunda longitud de onda, segunda longitud de onda que es diferente de la primera longitud de onda.
- 5 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la iluminación de la muestra (52) utilizando las primeras longitudes de onda hace que las interfaces entre la muestra (52) y el aire sean resaltadas en la imagen.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la segunda longitud de onda es una longitud de onda absorbida por la hemoglobina.
- 10 13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cámara (10) incluye barreras laterales, barreras que incluyen un colorante sensible.
- 15 14. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de determinar un volumen de la muestra (52) dispuesto dentro de la cámara (10) usando el área determinada de la cámara (10) que contiene la muestra (52), y una altura de cámara conocida o determinable.

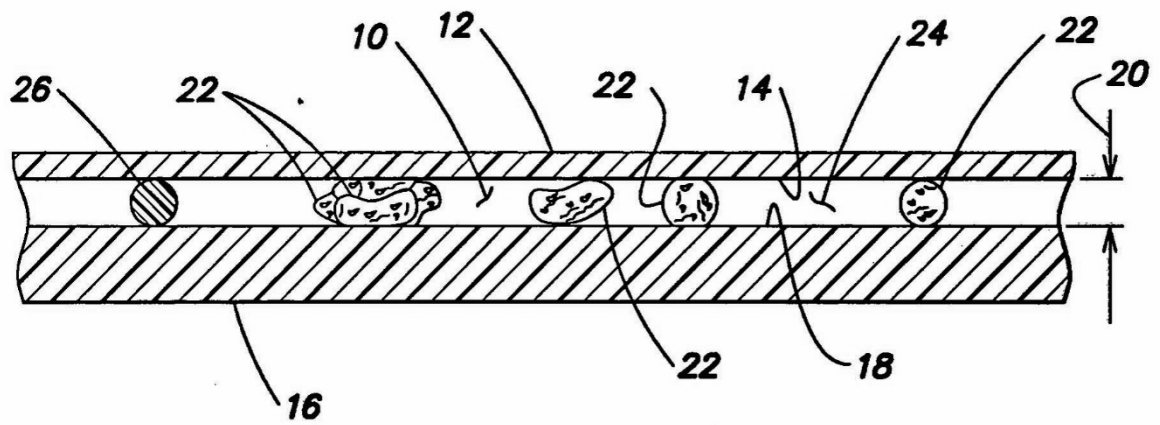


FIG. 1

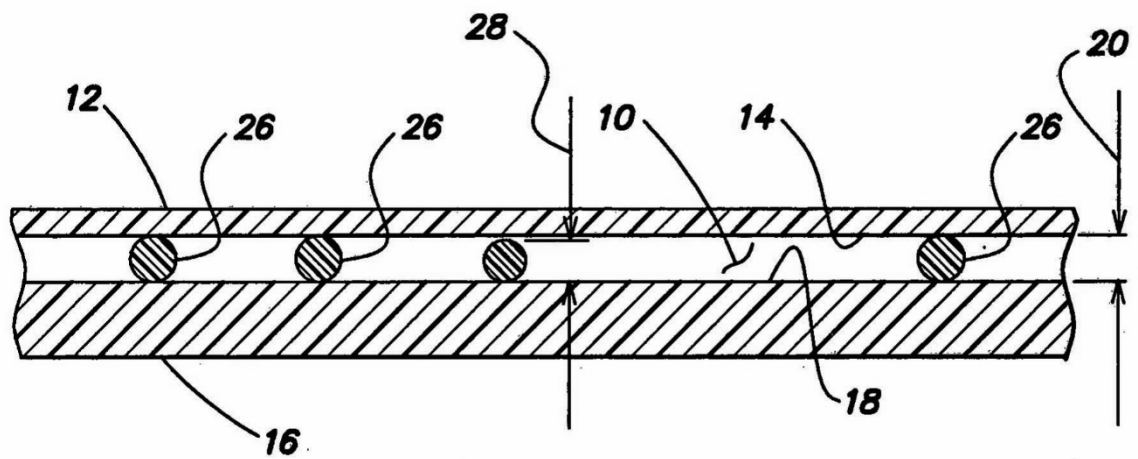


FIG. 2

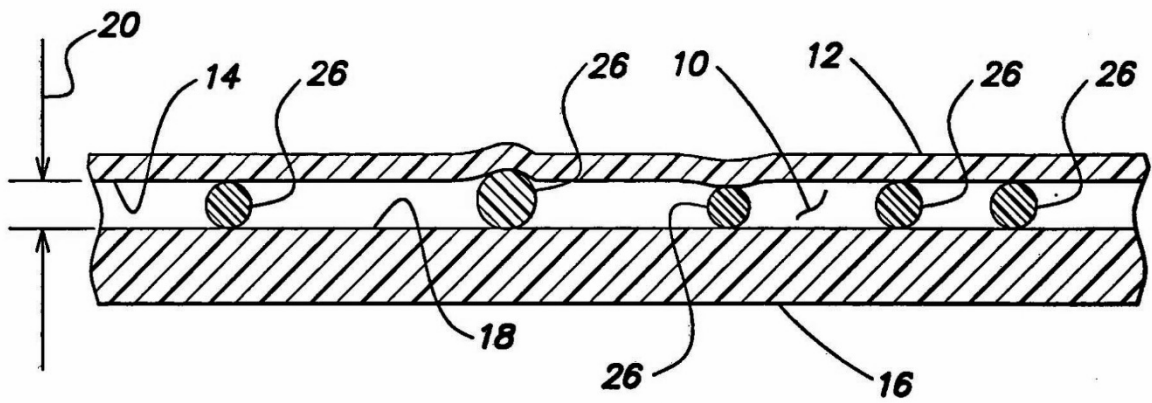


FIG. 3

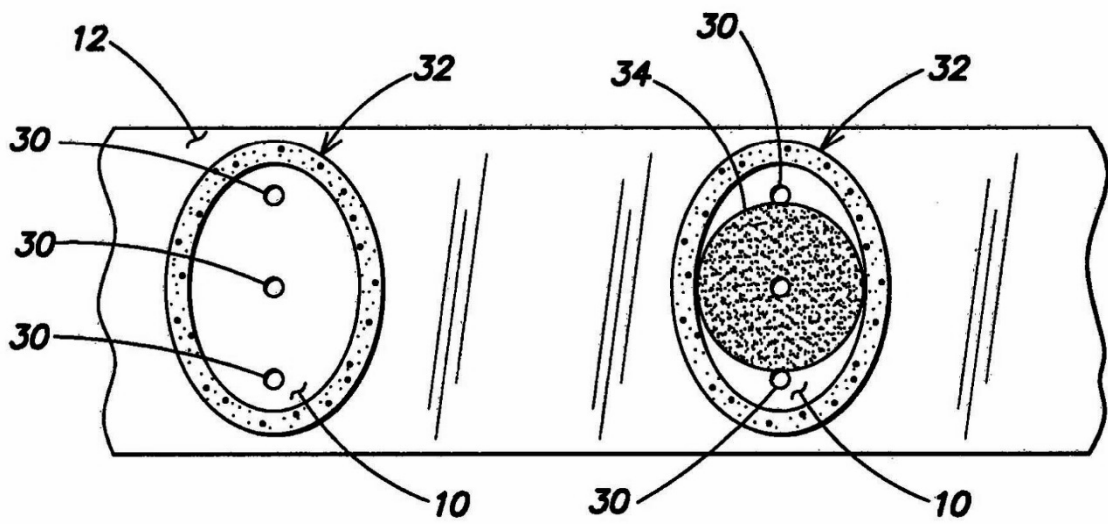


FIG. 4

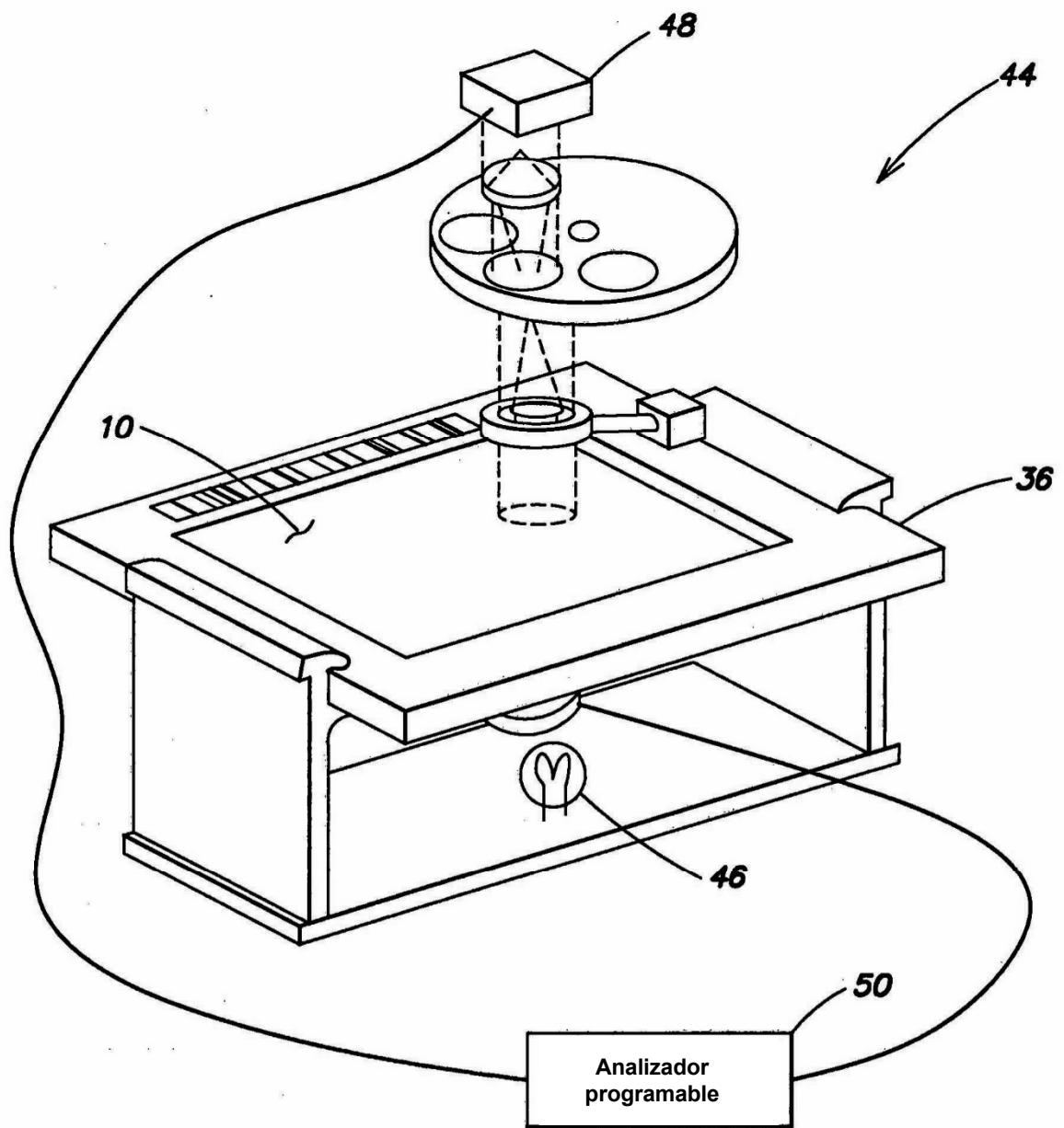


FIG. 5

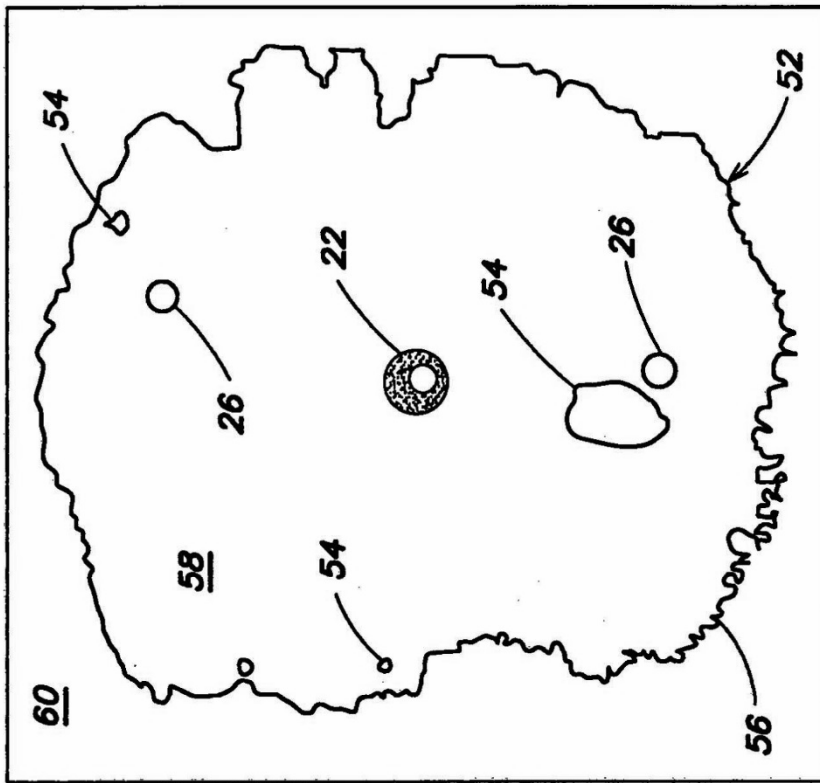


FIG. 7

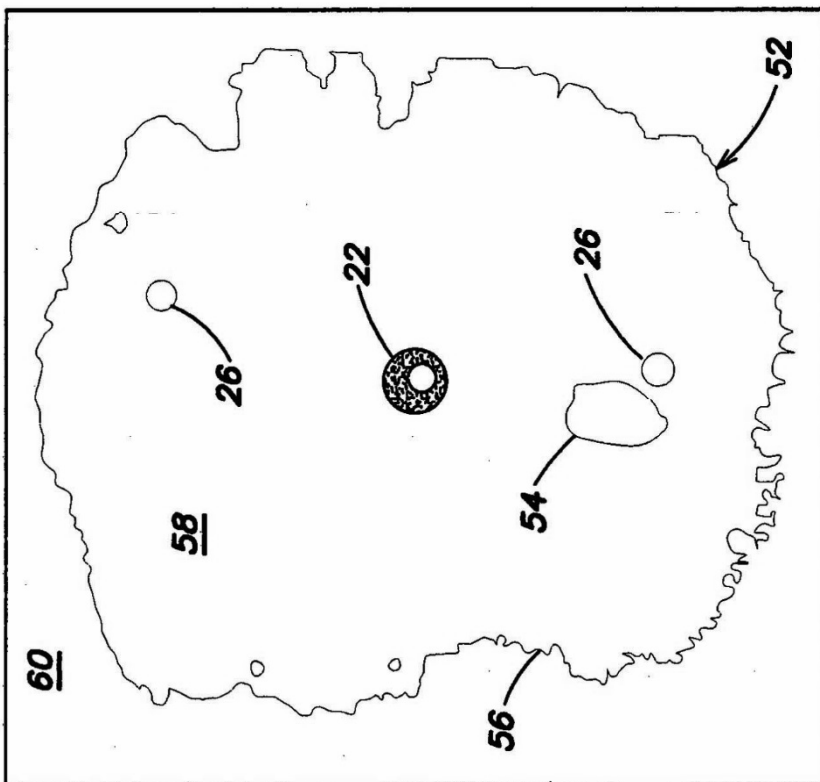


FIG. 6

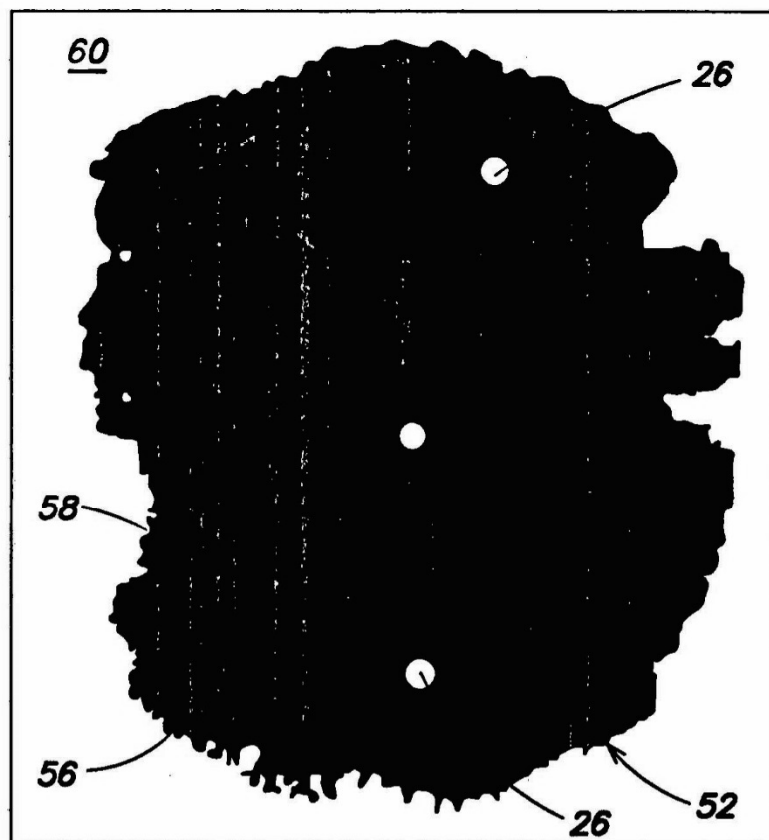


FIG. 8