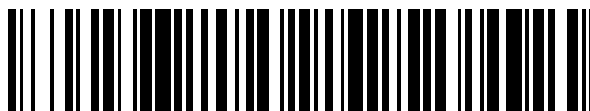


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 244**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)
G01N 15/02 (2006.01)
G01N 15/00 (2006.01)
G06K 9/00 (2006.01)
G06T 7/00 (2007.01)
G01M 11/02 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2007 PCT/SE2007/000656**
87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2017 WO08010761**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2007 E 07808762 (4)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2041549**

54 Título: **Aparato de medición, método y programa informático**

30 Prioridad:

19.07.2006 SE 0601575
20.04.2007 SE 0700958

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.02.2018

73 Titular/es:

HEMOCUE AB (100.0%)
P.O. BOX 1204
262 23 ANGELHOLM, SE

72 Inventor/es:

OLESEN, TOM y
LINDBERG, STELLAN

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 656 244 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

Aparato de medición, método y programa informático

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un aparato de medición y a un método para la enumeración de glóbulos blancos en una muestra de sangre. La presente invención se refiere además a un programa informático para analizar una muestra de sangre.

10

Antecedentes de la invención

La determinación del recuento de glóbulos blancos a menudo es importante en relación con el tratamiento de un paciente. Este análisis puede ser necesario para diagnosticar por ejemplo leucemia, o enfermedades infecciosas o inflamatorias o para monitorizar tratamientos. Es deseable permitir que los resultados del análisis se obtengan lo más rápidamente posible con el fin de minimizar los tiempos de espera para los pacientes y permitir que un médico tome una decisión de tratamiento y diagnóstico directamente cuando está realizando un primer examen del paciente. Por tanto, sería preferible proporcionar un método de análisis que el médico o una enfermera pueda realizar rápidamente sin necesidad de enviar la prueba a un laboratorio. La determinación del recuento de glóbulos blancos es una de las pruebas más habituales que se realizan en pacientes al establecer un diagnóstico. Por tanto, resultaría muy ventajoso disponer de un método rápido y sencillo de realización del análisis.

Actualmente, un recuento de glóbulos blancos se obtiene normalmente a través de un procedimiento manual mediante la tinción de una muestra de sangre y la observación microscópica de la muestra en una cámara de recuento especial, por ejemplo una cámara de Bürker. La cámara de recuento está dotada de una retícula que divide la cámara en volúmenes pequeños bien definidos. Se permite que los glóbulos blancos sedimenten en el fondo de la cámara de recuento con el fin de permitir que el microscopio enfoque todas las células en la cámara y, por tanto, de facilitar el recuento. Por tanto, es necesario que la muestra sedimente durante varios minutos antes de realizar el recuento. Entonces puede determinarse el recuento de glóbulos blancos contando el número de células sanguíneas por recuadro en la retícula. El recuento de glóbulos blancos lo obtiene manualmente un analista, que es necesario que tenga experiencia en la realización del análisis con el fin de poder realizar un análisis fiable.

Este análisis requiere mucho tiempo. Además, puesto que se realiza manualmente, los resultados del análisis pueden variar dependiendo de la persona que realiza el análisis.

Hay un número limitado de métodos de análisis automatizados existentes para determinar el recuento de glóbulos blancos. El recuento de glóbulos blancos puede determinarse por medio del principio de Coulter, que se basa en determinar el tamaño celular y de ese modo el tipo celular detectando una impedancia. Un método para contar glóbulos blancos mediante el principio de Coulter se describe en el documento US 5.262.302. El aparato de medición según el principio de Coulter es caro y, por tanto, representa una inversión considerable. Por tanto, un hospital o laboratorio será reacio a invertir en más de un aparato. Esto implica que será necesario realizar el análisis en una ubicación centralizada y será necesario que un paciente espere a los resultados del análisis.

El principio de Coulter es el método de análisis automatizado, predominante, que está usándose actualmente. Sin embargo, se han descrito algunos otros métodos. Uno de tales métodos para determinar el recuento de glóbulos blancos se da a conocer en el documento US 5.585.246. En este caso, tiene que prepararse una muestra de sangre mediante mezclado con un tinte fluorescente y un complejo de ligando que marca los glóbulos blancos. La muestra se introduce en un capilar y se irradia por una fuente de láser que explora la muestra en el capilar. Se mide la fluorescencia con el fin de determinar el número de glóbulos blancos. Se da a conocer un método similar en el documento WO 97/02482, usando un tinte fluorescente y una fuente de láser que explora un capilar. Este método está adaptado para la enumeración de glóbulos blancos en productos de aféresis que contienen un número limitado de glóbulos blancos. En este caso, el capilar es bastante grueso y es necesario esperar hasta que los glóbulos blancos han sedimentado en el fondo del capilar antes de que pueda explorarse el capilar.

El documento US 6.350.613 da a conocer un método para realizar la fórmula leucocitaria en una muestra de sangre completa anticoagulada quiescente en una cámara de muestra que tiene un grosor a través del plano variable debido a paredes de cámara de muestra opuestas convergentes.

El documento US 4.761.075 da a conocer un sistema de análisis celular automático para analizar automáticamente un gran número de portaobjetos de muestra preparados para muestras celulares.

El documento US 2003/0113925 da a conocer un método para identificar y cuantificar células incluyendo glóbulos blancos basándose en la morfología de su núcleo usando tinciones, tinciones que absorben la radiación electromagnética a longitudes de onda predeterminadas junto con biodiscos ópticos. El biodisco óptico usado en este método tiene cámaras, que tienen cada una múltiples zonas de captura.

65

5 En el documento WO 99/45384, se muestra una cámara que contiene una muestra que tiene un grosor variable. El grosor variable separa diferentes compuestos de la sangre. La muestra de sangre se tiñe con un colorante para destacar de manera diferencial al menos tres tipos diferentes de glóbulos blancos en la muestra de sangre. Los glóbulos blancos pueden enumerarse usando un instrumento de exploración óptico para visualizar una parte de la cámara.

10 En el documento WO 98/50777, se da a conocer un método para la evaluación del número de células somáticas en leche. El método comprende aplicar un volumen de una muestra en un compartimento de muestra y transmitir señales electromagnéticas, que han pasado del compartimento de muestra, sobre una serie de elementos de detección. Se procesan las intensidades de las señales electromagnéticas detectadas y se correlacionan los resultados con el número de células presentes en la muestra.

15 Existe todavía la necesidad de acelerar y simplificar los métodos automatizados existentes para determinar el recuento de glóbulos blancos de manera que pueda proporcionarse el análisis por cualquier usuario, sin requerir una formación especial, y de manera que los aparatos de medición puedan ser relativamente económicos. Esto implicaría que puede proporcionarse el análisis en el punto de atención. Además, puesto que el recuento de glóbulos blancos es un análisis realizado con frecuencia de este tipo, cualquier mejora en el método de análisis tendría un gran impacto positivo sobre la atención del paciente. Un método de análisis que proporcione la posibilidad de obtener resultados en el punto de atención sería particularmente ventajoso.

20 Además, puede resultar ventajoso obtener la fórmula leucocitaria, es decir examinar la distribución de tipos diferentes de glóbulos blancos en una muestra de sangre. Esta fórmula leucocitaria puede revelar si las células están presentes en una distribución normal, o si algún tipo de célula está aumentado o disminuido. La información puede ser útil en el diagnóstico de tipos específicos de enfermedad. Por ejemplo, un aumento de los neutrófilos indica una infección bacteriana, mientras que un aumento de los linfocitos es habitual en infecciones virales agudas.

30 La fórmula leucocitaria también puede obtenerse mediante la observación microscópica y el recuento manual de células sanguíneas teñidas en una cámara de Bürker. También existen algunos métodos automatizados. Por ejemplo, puede obtenerse la fórmula leucocitaria con el principio de Coulter analizando la forma y el tamaño del impulso eléctrico generado por una célula que atraviesa un campo eléctrico. La forma y el tamaño del impulso pueden relacionarse con el tipo de glóbulo blanco que está detectándose. Se describe un método de este tipo en el documento US 4.528.274.

35 En el documento US 5.123.055, se describe otro método para identificar tipos diferentes de glóbulos blancos. Este método requiere que se analicen secuencialmente varios parámetros de tamaño y color con el fin de diferenciar los tipos de glóbulos blancos.

40 Todavía se desea acelerar y simplificar los métodos automatizados existentes para determinar la fórmula leucocitaria. Resultaría particularmente ventajoso proporcionar un método de análisis rápido, sencillo y relativamente económico de manera que pueda proporcionarse el análisis en el punto de atención.

Sumario de la invención

45 Un objeto de la invención es proporcionar un análisis para determinar la enumeración volumétrica de glóbulos blancos en una muestra de sangre y determinar la fórmula leucocitaria.

Por tanto, según un aspecto de la invención, se proporciona un aparato de medición para la enumeración de glóbulos blancos en una muestra de sangre.

50 El aparato comprende un soporte, que está dispuesto para alojar un dispositivo de adquisición de muestras que comprende una cavidad de medición que contiene una muestra, en el que la cavidad de medición está adaptada para contener una muestra de sangre teñida y hemolizada, y en el que la cavidad de medición tiene una profundidad uniforme de 50-200 micrómetros, un sistema de obtención de imágenes adaptado para adquirir una pluralidad de imágenes digitales ampliadas de la muestra a diferentes niveles en una dirección de profundidad de campo en la muestra proporcionando una lente principal que puede moverse entre posiciones bien definidas a lo largo del eje óptico, en el que el sistema de obtención de imágenes está dispuesto para obtener dichas imágenes digitales con una profundidad de campo en el intervalo de 2-30 micrómetros. El aparato comprende además un analizador de imágenes, que está dispuesto para analizar cada imagen digital adquirida para identificar glóbulos blancos teñidos y determinar el número de glóbulos blancos en la muestra, en el que el analizador de imágenes está dispuesto para analizar cada imagen digital adquirida para identificar glóbulos blancos de los que se obtienen imágenes enfocados y determinar los tipos y el número de estos glóbulos blancos, distinguiéndose los tipos según el tamaño y/o la forma de los glóbulos blancos teñidos, mediante lo cual se determina la proporción de tipos diferentes de glóbulos blancos en la muestra. El analizador de imágenes está dispuesto además para determinar, para un glóbulo blanco específico, el número de dichas imágenes en las que se obtiene una imagen de dicho glóbulo blanco contando desde una imagen en la que se determina que el glóbulo blanco está desenfocado en un primer sentido, hasta una imagen en la que se determina que el glóbulo blanco está desenfocado en un segundo sentido, siendo dichos

sentidos primero y segundo opuestos en perpendicular a un plano de enfoque, y para determinar, basándose en el número de imágenes contado, el radio de curvatura de dicho glóbulo blanco.

5 El sistema de obtención de imágenes puede comprender un medio de ampliación y al menos un medio de adquisición de imágenes digitales.

10 Según una realización que no forma parte de la presente invención, el aparato está adaptado para la enumeración de glóbulos blancos en una muestra de sangre, la cavidad de medición está adaptada para contener una muestra de sangre teñida y hemolizada, y en el que el analizador de imágenes está dispuesto para analizar cada imagen digital adquirida para identificar glóbulos blancos teñidos y determinar el número de glóbulos blancos en la muestra, en el que el analizador de imágenes está dispuesto para analizar cada imagen digital adquirida para identificar glóbulos blancos de los que se obtienen imágenes enfocados y determinar los tipos y el número de estos glóbulos blancos, distinguiéndose los tipos según las características geométricas de los glóbulos blancos, mediante lo cual se determina la proporción de tipos diferentes de glóbulos blancos en la muestra.

15 Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método para la enumeración de glóbulos blancos en una muestra de sangre, comprendiendo dicho método: adquirir una muestra de sangre en una cavidad de medición de un dispositivo de adquisición de muestras, mezclándose la muestra de sangre con un reactivo, que comprende un agente hemolizante para lisar glóbulos rojos en la muestra y un agente de tinción para teñir glóbulos blancos en la muestra de sangre, en el que la cavidad de medición tiene una profundidad uniforme de 50-200 micrómetros, adquirir una pluralidad de imágenes digitales de una ampliación de la muestra irradiada en la cavidad de medición a diferentes niveles en una dirección de profundidad de campo en la muestra moviendo una lente principal entre posiciones bien definidas a lo largo del eje óptico, en el que dicha pluralidad de imágenes digitales se obtienen con una profundidad de campo en el intervalo de 2-30 micrómetros, analizar digitalmente cada imagen digital para identificar los glóbulos blancos teñidos y determinar el número de glóbulos blancos en la muestra, y analizar digitalmente cada imagen digital adquirida para identificar glóbulos blancos de los que se obtienen imágenes enfocados y determinar los tipos y el número de estos glóbulos blancos, distinguiéndose los tipos según el tamaño y/o la forma de los glóbulos blancos teñidos, mediante lo cual se determina la proporción de tipos diferentes de glóbulos blancos en la muestra, en el que el análisis de imágenes comprende, para un glóbulo blanco específico, determinar el número de dichas imágenes en las que se obtiene una imagen de dicho glóbulo blanco contando desde una imagen en la que se determina que el glóbulo blanco está desenfocado en un primer sentido, hasta una imagen en la que se determina que el glóbulo blanco está desenfocado en un segundo sentido, siendo dichos sentidos primero y segundo opuestos en perpendicular a un plano de enfoque, y en el que determinar el radio de curvatura de dicho glóbulo blanco basándose en el número de imágenes contado.

35 Según una realización que no forma parte de la presente invención, el método está adaptado para la enumeración de glóbulos blancos en una muestra de sangre. El método comprende adquirir una muestra de sangre en una cavidad de medición de un dispositivo de adquisición de muestras. La muestra de sangre se mezcla con un reactivo, que comprende un agente hemolizante para lisar los glóbulos rojos en la muestra de sangre y un agente de tinción para teñir los glóbulos blancos en la muestra de sangre. El agente de tinción preferiblemente tiñe de manera selectiva glóbulos blancos y no tiñe otras células en la muestra de sangre. El método comprende además adquirir una pluralidad de imágenes digitales de una ampliación de la muestra en la cavidad de medición. El método comprende además analizar digitalmente cada imagen digital para identificar glóbulos blancos teñidos y determinar el número de glóbulos blancos en la muestra, y analizar digitalmente cada imagen digital para identificar glóbulos blancos de los que se obtienen imágenes enfocados y determinar los tipos y el número de estos glóbulos blancos, distinguiéndose los tipos según el tamaño y/o la forma de las células teñidas, mediante lo cual se determina la proporción de tipos diferentes de glóbulos blancos en la muestra de sangre.

50 El aparato de medición y el método de la invención permiten ambos un análisis sencillo de una muestra de sangre completa. Para ello, el aparato de medición está dispuesto para adquirir una pluralidad de imágenes digitales de una muestra de sangre, muestra que se ha mezclado con un agente de tinción para teñir los glóbulos blancos. La tinción de los glóbulos blancos implica que pueden distinguirse los glóbulos blancos en una imagen digital y pueden distinguirse tipos diferentes de glóbulos blancos según el tamaño y/o la forma de las células en la misma imagen digital o en otra.

55 Por tanto, el aparato de medición y el método están dispuestos tanto para determinar una enumeración volumétrica de todos los glóbulos blancos dentro de la muestra de sangre como para determinar la fórmula leucocitaria.

60 Aunque muchos métodos existentes pueden contar diferentes células sanguíneas e incluso subgrupos de células sanguíneas, el aparato de medición según la invención está adaptado específicamente para el análisis de glóbulos blancos. El reactivo comprende un agente hemolizante que lisará los glóbulos rojos en la muestra de sangre. Esto elimina las posibilidades de enumerar los glóbulos rojos en la muestra. Por otro lado, el lisado de los glóbulos rojos simplifica la distinción e identificación de los glóbulos blancos dentro de la muestra de sangre.

65 Además, el aparato de medición está adaptado específicamente para analizar cada imagen digital de manera que se identifiquen las células de las que se obtienen imágenes enfocadas. Esto permite que se adquiera una imagen de una

- muestra relativamente gruesa, al tiempo que solo se cuentan las células que están enfocadas. Esta característica es particularmente útil considerando que la enumeración del número total de glóbulos blancos se realiza más fácilmente que la identificación del tipo de glóbulos blancos, puesto que la tipificación requiere más detalles de la célula que va a analizarse. Por tanto, garantizando que solo se cuentan las células que están enfocadas, puede realizarse la
- 5 identificación del tipo de glóbulos blancos en una muestra que puede usarse simultáneamente para determinar la enumeración volumétrica estadísticamente fiable de los glóbulos blancos en la muestra.
- El aparato de medición y el método de la invención proporcionan un análisis muy sencillo de una muestra de sangre completa. El análisis no requiere un aparato de medición complicado ni que un operario realice etapas avanzadas.
- 10 Por tanto, puede realizarse en conexión directa con el examen de un paciente, sin necesidad de un técnico cualificado. Se requiere meramente que se adquiera una muestra de sangre y se mezcle con un agente de tinción. Entonces, la muestra de sangre puede colocarse en el soporte del aparato de medición y, en respuesta directa a ello, el aparato de medición puede presentar los resultados de análisis.
- 15 De hecho, puede permitirse que se mezcle la muestra de sangre con el reactivo en la cavidad de medición. Por tanto, no habrá necesidad de realizar una preparación de muestras manualmente. En el plazo de algunos minutos o menos, la reacción de la muestra de sangre con el reactivo habrá hemolizado los glóbulos rojos y teñido los glóbulos blancos de manera que la muestra esté lista para la medición óptica para adquirir una pluralidad de imágenes digitales. La muestra de sangre puede mezclarse con el reactivo, por ejemplo, mediante dispersión o difusión del
- 20 reactivo dentro de la muestra de sangre o haciendo vibrar o moviendo activamente el dispositivo de adquisición de muestras de modo que se produzca una agitación en la cavidad de medición.
- El aparato de medición puede comprender además una fuente de radiación electromagnética, que está dispuesta para irradiar la muestra contenida en la cavidad de medición del dispositivo de adquisición de muestras.
- 25 El sistema de obtención de imágenes está dispuesto para adquirir una pluralidad de imágenes digitales de la muestra moviendo una lente principal entre posiciones bien definidas a lo largo del eje óptico, en el que el analizador de imágenes está dispuesto para analizar cada imagen digital adquirida para identificar glóbulos blancos teñidos y determinar el número de glóbulos blancos en la muestra, en el que el analizador de imágenes está dispuesto para
- 30 analizar cada imagen digital adquirida para identificar glóbulos blancos de los que se obtienen imágenes enfocados y determinar los tipos y el número de estos glóbulos blancos, distinguiéndose los tipos según el tamaño y/o la forma de los glóbulos blancos teñidos, mediante lo cual se determina la proporción de tipos diferentes de glóbulos blancos en la muestra.
- 35 Mediante la adquisición de una pluralidad de imágenes digitales a diferentes niveles en la dirección de profundidad de campo en la muestra, es posible analizar un volumen de muestra relativamente grande incluso cuando se usa una alta ampliación. Una alta ampliación hace que sea difícil, debido a la pequeña profundidad de campo resultante, visualizar el volumen completo en una imagen. Puesto que el nivel de ampliación afecta a la profundidad de campo, la etapa de adquirir una pluralidad de imágenes digitales permite el uso de una mayor ampliación, que hace posible
- 40 a su vez diferenciar, en cada imagen, entre clases diferentes de glóbulos blancos dependiendo, entre otras cosas, de la forma, el número o el tamaño de los núcleos.
- Según otra realización que no forma parte de la presente invención, el sistema de obtención de imágenes está dispuesto para proporcionar información sobre la dirección de luz en la imagen adquirida para facilitar el enfoque,
- 45 mediante lo cual se permite que se desplace el enfoque en la imagen adquirida. Esto implica que puede usarse una única imagen tanto para la enumeración del número total de glóbulos blancos en la muestra analizando toda la profundidad de la muestra de una vez, como para determinar la proporción de tipos diferentes de glóbulos blancos en la muestra de sangre analizando las células en la imagen cuando se muestra la imagen enfocándose una parte del grosor de la muestra de sangre. Puede obtenerse una imagen que comprende información de dirección de luz en
- 50 la imagen usando una serie de pequeñas lentes (por ejemplo, una lente compuesta) que proporcionan la capacidad para realizar un seguimiento de los rayos en la imagen adquirida de manera que pueden enfocarse diferentes partes de la imagen.
- El sistema de obtención de imágenes puede estar dispuesto para adquirir unas imágenes digitales primera y
- 55 segunda de la muestra usando diferentes ajustes ópticos, y en el que el analizador de imágenes está dispuesto para analizar la primera imagen digital adquirida para determinar el número de glóbulos blancos en la muestra y el analizador de imágenes está dispuesto para analizar la segunda imagen digital adquirida para determinar la proporción de tipos diferentes de glóbulos blancos en la muestra.
- 60 Por tanto, el aparato de medición está adaptado específicamente para adquirir dos imágenes digitales usando diferentes ajustes ópticos. Esto implica que los ajustes ópticos pueden optimizarse y adaptarse para determinar, en primer lugar, el número de glóbulos blancos dentro de un volumen y, en segundo lugar, determinar una proporción de tipos diferentes de glóbulos blancos.
- 65 El sistema de obtención de imágenes puede comprender dos partes al menos parcialmente independientes, que dirigen luz desde una muestra irradiada hasta unas partes primera y segunda del sistema de obtención de

imágenes.

5 La acción para determinar si un glóbulo blanco está enfocado o no puede realizarse haciendo uso del hecho de que el citoplasma de la célula puede actuar como lente que refracta la luz. Para un glóbulo blanco del que se obtienen imágenes enfocadas, los núcleos aparecen como sombras oscuras mientras que el citoplasma circundante es casi invisible. Los núcleos aparecen como zonas con intensidad de luz significativamente menor mientras que el citoplasma deja inalterada la intensidad de luz.

10 Para un glóbulo blanco del que se obtienen imágenes demasiado cerca del sistema de obtención de imágenes, (demasiado cerca como para estar enfocado) los núcleos aparecen como sombras oscuras mientras que el citoplasma circundante actúa como lente y refracta la luz, lo que da como resultado un círculo oscuro alrededor de los núcleos. Los núcleos aparecen como una zona con intensidad de luz significativamente menor con relación a una imagen enfocada de los núcleos y el citoplasma aparece con baja intensidad de luz.

15 Para un glóbulo blanco del que se obtienen imágenes demasiado lejos del sistema de obtención de imágenes, (demasiado lejos como para estar enfocado) los núcleos aparecen como sombras oscuras mientras que el citoplasma circundante actúa como lente y refracta la luz, dando como resultado un círculo brillante alrededor de los núcleos. Los núcleos aparecen como una zona con intensidad de luz significativamente menor con relación a una imagen enfocada de los núcleos mientras que el citoplasma aparece con alta intensidad de luz.

20 Alternativamente, la identificación de las células de las que se obtienen imágenes enfocadas puede realizarse analizando los bordes de las células de las que se obtienen imágenes con el fin de evaluar si se obtienen imágenes de la célula enfocada basándose en una pendiente de intensidad en el borde. Las células que no están enfocadas mostrarán una lenta disminución de la intensidad en los bordes, mientras que se obtendrán imágenes de las células enfocadas con un borde nítido representado como una gran disminución de la intensidad en el borde de la célula. Por tanto, analizando cómo varía la intensidad en un borde de una célula de la que se obtienen imágenes, puede determinarse si se obtienen imágenes de la célula enfocada o no.

30 Un modo alternativo para determinar el tipo de célula es determinando en el analizador de imágenes, para un glóbulo blanco específico, el número de dichas imágenes en las que se obtiene una imagen de dicho glóbulo blanco contando desde una imagen en la que se determina que el glóbulo blanco está desenfocado en un primer sentido hasta una imagen en la que se determina que el glóbulo blanco está desenfocado en un segundo sentido.

35 El analizador de imágenes está dispuesto para determinar, basándose en el número de imágenes contado, una característica geométrica relacionada con el tamaño de dicho glóbulo blanco.

40 El sistema de obtención de imágenes con los ajustes ópticos usados para adquirir dicha pluralidad de imágenes digitales puede tener un poder de ampliación de 1-50x, más preferiblemente 1-20x, más preferiblemente 3-20x, más preferiblemente 5-20x y más preferiblemente de aproximadamente 10x.

El sistema de obtención de imágenes puede estar dispuesto para obtener dicha pluralidad de imágenes digitales con una profundidad de campo en el intervalo de 2-60 micrómetros, más preferiblemente en el intervalo de 2-30 micrómetros, más preferiblemente de aproximadamente 8-10 micrómetros.

45 Tal como se usa en este contexto, "profundidad de campo" implica una longitud en una dirección a lo largo del eje óptico del que se obtienen imágenes con un enfoque suficiente como para permitir el análisis de imágenes para identificar células situadas dentro de esta longitud. Esta "profundidad de campo" puede ser mayor que una profundidad de campo convencional definida por los ajustes ópticos. Con un poder de ampliación aumentado, se reduce la profundidad de campo.

50 La fuente de radiación electromagnética puede estar dispuesta para irradiar una longitud de onda correspondiente a un pico en la absorbancia del agente de tinción. Por consiguiente, los glóbulos blancos teñidos que contienen una acumulación de agente de tinción se detectarán mediante una indicación de baja transmitancia de luz en las imágenes digitales.

55 La fuente de radiación electromagnética puede comprender una fuente de láser. La fuente de láser puede proporcionar luz de una longitud de onda bien definida que ajusta la absorbancia del agente de tinción. Además, la fuente de láser puede proporcionar luz colimada, lo que minimiza las alteraciones de la luz parásita, de manera que se distinguirá de manera nítida un punto de baja transmitancia de luz.

60 La fuente de radiación electromagnética puede comprender alternativamente un diodo emisor de luz. Esta fuente de luz todavía puede proporcionar condiciones de irradiación suficientes para distinguir de manera apropiada los glóbulos blancos de otra materia en la muestra.

65 El analizador de imágenes puede estar dispuesto para identificar zonas de alta absorbancia de luz con el fin de determinar el número de glóbulos blancos en la muestra. El analizador de imágenes puede estar dispuesto además

para identificar puntos negros u oscuros en la imagen. Puesto que los agentes de tinción pueden acumularse en los núcleos de los glóbulos blancos, la absorbancia de la luz puede tener picos en puntos independientes. Estos puntos formarán puntos negros en la imagen digital y pueden clasificarse como glóbulos blancos.

5 El analizador de imágenes puede estar dispuesto para distinguir tipos diferentes de glóbulos blancos analizando la forma y el tamaño de zonas identificadas de alta absorbancia de luz en cada imagen digital. Puesto que tipos diferentes de glóbulos blancos tienen tamaños diferentes, puede identificarse el tipo de un glóbulo blanco determinando el tamaño de la célula sanguínea. Además, los tipos diferentes pueden teñirse de diferente manera proporcionando diferentes formas de las zonas identificadas en la imagen digital. Esto también puede usarse con el fin de identificar el tipo de glóbulos blancos. Puede obtenerse la fórmula leucocitaria que especifica la proporción de tres tipos diferentes de glóbulos blancos analizando el tamaño de las células sanguíneas. La fórmula leucocitaria que distingue cinco tipos diferentes de glóbulos blancos puede requerir que se investiguen características adicionales de las células sanguíneas. Por ejemplo, puede examinarse el número de núcleos de cada célula, la intensidad de radiación transmitida a través de la célula sanguínea o la forma de la célula sanguínea.

15 El agente de tinción puede estar dispuesto para teñir selectivamente los núcleos de los glóbulos blancos. Esto implica que los glóbulos blancos pueden identificarse como puntos coloreados y, por tanto, distinguirse y contarse fácilmente en una imagen digital. Además, el tamaño de los puntos de tinción puede usarse para identificar el tipo de los glóbulos blancos, ya que tipos diferentes de glóbulos blancos tienen tamaños diferentes.

20 El agente de tinción puede ser uno cualquiera del grupo de hematoxilina, azul de metileno, verde de metileno, azul de metileno, acetato de violeta de cresilo, azul de toluidina, violeta de genciana, análogos de Sudan, galocianina y análogos de fucsina, o cualquier combinación de los mismos. Sin embargo, debe apreciarse que el agente de tinción no se limita a este grupo, sino que pueden contemplarse muchas otras sustancias.

25 El agente hemolizante puede ser una sal de amonio cuaternario, una saponina, un ácido biliar, tal como ácido desoxicólico, una digitoxina, un veneno de serpiente, un glucopiranosido o un detergente no iónico de tipo Triton. Sin embargo, debe apreciarse que el agente hemolizante no se limita a este grupo, sino que pueden contemplarse muchas otras sustancias.

30 El aparato de medición puede comprender además una lente de objetivo que es común para los diferentes ajustes ópticos. Esto implica que pueden obtenerse las imágenes digitales mediante la obtención de imágenes a lo largo de la misma trayectoria óptica de manera que las imágenes se centran en el mismo punto en la cavidad de medición. Esto hace que el aparato de medición sea compacto.

35 Según una realización, el sistema de obtención de imágenes puede comprender dos partes al menos parcialmente independientes, que dirigen luz desde una muestra irradiada hasta unas partes primera y segunda del sistema de obtención de imágenes. Esto implica que la trayectoria de la luz desde la muestra hasta el sistema de obtención de imágenes puede definirse dentro de una configuración óptica fija. Por tanto, el aparato de medición puede ser robusto e insensible al impacto.

40 El sistema de obtención de imágenes puede comprender además un divisor de haz para dirigir luz desde la lente de objetivo hacia las partes primera o segunda del sistema de obtención de imágenes. Esto implica que las imágenes digitales primera y segunda pueden obtenerse simultáneamente, mediante lo cual el análisis puede realizarse de forma muy rápida.

45 La primera parte del sistema de obtención de imágenes puede estar dispuesta para recibir luz directamente desde el divisor de haz, es decir ningún elemento óptico está dispuesto entre la primera parte del sistema de obtención de imágenes y el divisor de haz. Alternativamente, puede disponerse que la luz pase directamente desde la lente de objetivo hasta la primera parte del sistema de obtención de imágenes. Entonces, con el fin de obtener la segunda imagen digital, puede insertarse un espejo en la trayectoria de la luz para desviar la luz en su lugar hasta la segunda parte del sistema de obtención de imágenes.

50 El sistema de obtención de imágenes puede comprender además una lente ocular entre el divisor de haz y la parte del sistema de obtención de imágenes adaptada para adquirir imágenes digitales. Por tanto, la lente ocular puede proporcionar una ampliación adicional de la muestra con el fin de distinguir entre tipos diferentes de glóbulos blancos. Preferiblemente, se usan paquetes de lente y el paquete de lente ocular se moverá entonces en un plano principal virtual principal dentro del paquete de lente de objetivo para cambiar la relación entre el plano de imagen y el paquete de lente de objetivo para permitir una ampliación adicional.

55 El sistema de obtención de imágenes puede comprender además un elemento óptico entre el divisor de haz y la parte del sistema de obtención de imágenes adaptada para adquirir imágenes digitales para afectar a las células no enfocadas del sistema de obtención de imágenes, mediante lo cual se facilita la identificación de glóbulos blancos de los que se obtienen imágenes enfocados.

60 El elemento óptico permite que se adquiera una imagen de un grosor de muestra mucho mayor que la profundidad

de campo del sistema de obtención de imágenes. El elemento óptico garantiza que las células que están desenfocadas puedan omitirse de la consideración con el fin de aumentar la certidumbre de la medición. Puesto que el elemento óptico afecta a la obtención de imágenes de células desenfocadas, las células enfocadas se identificarán fácilmente. El elemento óptico puede implementarse como filtro espacial que afecta a la obtención de imágenes de una célula de manera que el borde de la célula comprenderá una intensidad en exceso mayor que la intensidad de fondo, cuando se obtienen imágenes de la célula absorbiendo luz.

Según una realización alternativa, el sistema de obtención de imágenes puede comprender además un elemento de codificación de frente de onda entre el divisor de haz y la segunda parte del sistema de obtención de imágenes. Un elemento de codificación de frente de onda distorsiona intencionadamente los rayos de luz haciéndolos pasar a través de una lámina de onda con forma de silla de montar, que es relativamente plana en la parte central, pero con bordes festoneados. Esto provoca una aberración óptica específica, la imagen tiene aspecto borroso, pero el desenfoque es el mismo a lo largo de un gran intervalo de distancias. Este elemento de codificación de frente de onda aumenta por tanto la profundidad que puede analizarse a lo largo del eje óptico. Las distorsiones en la imagen están determinadas principalmente por la forma del elemento de codificación de frente de onda de desenfoque, que se conoce de manera precisa. Por tanto, un ordenador puede eliminar la borrosidad punto a punto. Un ordenador puede decodificar la imagen usando lo que es esencialmente un filtro digital, y crea por tanto una imagen que es nítida a lo largo de una gran profundidad de campo. De este modo, puede aumentarse la profundidad de campo del sistema de obtención de imágenes, permitiendo una mayor profundidad de una muestra de la que van a obtenerse imágenes enfocada.

Según otra realización, una parte del sistema de obtención de imágenes está dispuesta para adquirir las imágenes tanto primera como segunda y al menos parte del sistema de ampliación del sistema de obtención de imágenes puede conmutarse con el fin de adquirir las imágenes digitales primera y segunda usando diferentes ajustes ópticos. Esto implica que solo es necesario que el aparato de medición comprenda una única parte del sistema de obtención de imágenes. Además, permite que se usen varios ajustes ópticos diferentes proporcionando, por ejemplo, una lente principal que puede moverse entre posiciones bien definidas a lo largo del eje óptico.

El sistema de obtención de imágenes puede disponerse teniendo un mayor poder de ampliación en los ajustes ópticos usados para adquirir la segunda imagen digital que en los ajustes ópticos usados para adquirir la primera imagen digital. Esto implica que pueden visualizarse mejor detalles en la segunda imagen digital, mediante lo cual pueden distinguirse más fácilmente entre sí tipos diferentes de glóbulos blancos.

El sistema de obtención de imágenes con los ajustes ópticos usados para adquirir la primera imagen digital puede tener un poder de ampliación de 1-50x, más preferiblemente 1-20x, más preferiblemente 3-20x, más preferiblemente 3-10x y más preferiblemente de aproximadamente 4x. Dentro de estos intervalos de poder de ampliación, los glóbulos blancos se amplían suficientemente para poder detectarse, mientras que el sistema de obtención de imágenes puede estar dispuesto para obtener imágenes del grosor de muestra con un enfoque suficiente con el fin de evaluar el número de células sanguíneas dentro de la imagen. Por tanto, el sistema de obtención de imágenes puede tener una profundidad de campo que cubre el grosor de muestra. Sin embargo, no es necesario obtener imágenes de todo el grosor de muestra dentro de la profundidad de campo del sistema de obtención de imágenes, usando una definición convencional de profundidad de campo. Todavía pueden contarse correctamente las células de las que se obtienen imágenes ligeramente desenfocadas usando un análisis de imágenes inteligente. Un bajo poder de ampliación implica que puede obtenerse una gran "profundidad de campo". Por tanto, puede permitirse un gran grosor de muestra y puede analizarse un gran volumen. Sin embargo, si se usa un bajo poder de ampliación, los glóbulos blancos pueden ser difíciles de detectar porque se obtienen imágenes de cada célula sanguínea sobre muy pocos píxeles, tales como 3-4 píxeles. Puede usarse un menor poder de ampliación aumentando el número de píxeles en la imagen adquirida, es decir, mejorando la resolución de la imagen digital. De este modo, es posible usar un poder de ampliación óptica de 1-4x, al tiempo que se permite todavía que se detecten los glóbulos blancos.

El sistema de obtención de imágenes con los ajustes ópticos usados para adquirir la segunda imagen digital puede tener un poder de ampliación de 1-50x, más preferiblemente 1-20x, más preferiblemente 3-20x, más preferiblemente 5-20x y más preferiblemente de aproximadamente 10x. Dentro de estos intervalos de poder de ampliación, los glóbulos blancos se amplían suficientemente con el fin de distinguir entre tipos diferentes de glóbulos blancos. Puede usarse un menor poder de ampliación usando un elemento óptico para destacar las células de las que se obtienen imágenes enfocadas y facilitar la identificación de estas células.

El sistema de obtención de imágenes puede estar dispuesto para obtener la primera imagen con una profundidad de campo de al menos el grosor de la cavidad de medición del dispositivo de adquisición de muestras. Esto implica que se obtiene un enfoque suficiente de todo el grosor de la muestra de manera que puede analizarse simultáneamente todo el grosor de la cavidad de medición en la imagen digital de la muestra. Por tanto, no hay necesidad de esperar a que los glóbulos blancos sedimenten en la cavidad de medición, mediante lo cual se reduce el tiempo para realizar un análisis. Sin embargo, puede haber la necesidad de esperar a una reacción que provoca que se hemolice los glóbulos rojos y esperar a que cesen los movimientos provocados por la introducción de la muestra en la cavidad de medición. Estos tiempos de espera serían muy cortos, del orden de 30 segundos o menos. Al elegir no enfocar de manera muy nítida sobre una parte específica de la muestra, se obtiene un enfoque suficiente de todo el grosor de la

muestra para permitir identificar el número de glóbulos blancos en la muestra. Esto implica que un glóbulo blanco puede estar algo borroso y todavía considerarse que está enfocado en la profundidad de campo. Por tanto, el volumen analizado de la muestra puede definirse bien mediante el grosor de la cavidad de medición y el tamaño de la imagen digital especificando el área de la sección transversal de la cavidad de medición de la que se obtienen imágenes.

El sistema de obtención de imágenes está dispuesto para obtener la primera imagen con una profundidad de campo en el intervalo de 50-200 micrómetros. Esta profundidad de campo puede adaptarse para corresponder a la profundidad o el grosor de la cavidad de medición. Una profundidad de al menos 50 micrómetros permite que se analice un mayor volumen de sangre a lo largo de un área de sección transversal pequeña, evitando por tanto la compresión de las células sanguíneas de la muestra en una monocapa. Por tanto, puede analizarse un volumen suficientemente grande de la muestra de sangre con el fin de proporcionar valores fiables del recuento de glóbulos blancos usando una imagen relativamente pequeña de la muestra de sangre. Además, es difícil lograr una profundidad de campo que supere los 200 micrómetros al tiempo que se obtiene una imagen digital con una ampliación suficiente. Incluso es difícil lograr una profundidad de campo que supere los 170 micrómetros.

El sistema de obtención de imágenes puede estar dispuesto para obtener la segunda imagen con una profundidad de campo en el intervalo de 2-30 micrómetros. Esto puede lograrse mediante la obtención de imágenes de una parte del grosor de la cavidad de medición. En tal caso, solo se obtienen imágenes de esta parte del grosor de la cavidad de medición enfocada. La segunda imagen digital se analiza entonces teniendo en cuenta solo glóbulos blancos de los que se obtienen imágenes con enfoque suficiente con el fin de determinar su tipo. Puesto que se usa la segunda imagen digital para determinar la proporción de tipos diferentes de glóbulos blancos, no es importante obtener imágenes de un volumen bien definido. Por tanto, es posible obtener imágenes primera y segunda apropiadas mediante la obtención de imágenes de la misma parte de la cavidad de medición. Sin embargo, la segunda imagen puede adquirirse alternativamente obteniendo imágenes de una parte diferente de la cavidad de medición, mediante lo cual esta parte puede tener un grosor correspondiente a la profundidad de campo del sistema de obtención de imágenes para obtener la segunda imagen.

El analizador de imágenes puede estar dispuesto para ampliar electrónicamente cada imagen adquirida. Mientras se está ampliando la muestra para adquirir una imagen digital ampliada de la muestra, la propia imagen digital adquirida puede ampliarse electrónicamente para simplificar la distinción entre objetos de los que se obtienen imágenes muy próximos entre sí en la imagen digital adquirida.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un dispositivo de adquisición de muestras para la enumeración de glóbulos blancos en una muestra de sangre. El dispositivo de adquisición de muestras comprende una cavidad de medición para recibir una muestra de sangre. La cavidad de medición tiene unos grosores fijos predeterminados primero y segundo definidos entre las paredes internas de la cavidad de medición, en la que el primer grosor está adaptado para determinar la enumeración volumétrica total de glóbulos blancos en la muestra de sangre y el segundo grosor está adaptado para determinar la proporción de tipos diferentes de glóbulos blancos dentro de la muestra de sangre. El dispositivo de adquisición de muestras comprende además un reactivo, que está dispuesto en forma seca sobre una superficie que define la cavidad de medición. El reactivo comprende un agente hemolizante para lisar glóbulos rojos en la muestra de sangre, y un agente de tinción para teñir selectivamente glóbulos blancos en la muestra de sangre.

El dispositivo de adquisición de muestras proporciona la posibilidad de obtener directamente una muestra de sangre completa dentro de la cavidad de medición y proporcionarla para su análisis. No hay necesidad de preparación de las muestras. De hecho, la muestra de sangre puede aspirarse dentro de la cavidad de medición directamente de un dedo de un paciente en el que se ha realizado una punción. Dotar el dispositivo de adquisición de muestras de un reactivo permite una reacción dentro del dispositivo de adquisición de muestras que hace que la muestra quede lista para el análisis. La reacción se inicia cuando la muestra de sangre entra en contacto con el reactivo. Por tanto, no hay necesidad de preparar manualmente la muestra, lo que hace que el análisis sea especialmente adecuado para realizarse directamente en una sala de reconocimiento mientras que el paciente está esperando.

Puesto que el reactivo se proporciona en forma seca, el dispositivo de adquisición de muestras puede transportarse y almacenarse durante largo tiempo sin afectar a la capacidad de uso del dispositivo de adquisición de muestras. Por tanto, el dispositivo de adquisición de muestras con el reactivo puede fabricarse y prepararse mucho antes de realizar el análisis de una muestra de sangre.

Aunque muchos métodos existentes pueden contar diferentes células sanguíneas e incluso subgrupos de células sanguíneas, el dispositivo de adquisición de muestras según la invención está adaptado específicamente para realizar la enumeración de glóbulos blancos. El reactivo comprende un agente hemolizante que lisará los glóbulos rojos en la muestra de sangre. Esto elimina la posibilidad de enumerar los glóbulos rojos en la muestra. Por otra parte, el lisado de los glóbulos rojos simplifica la distinción e identificación de los glóbulos blancos dentro de la muestra de sangre.

El agente de tinción proporciona el marcaje de los glóbulos blancos individuales. Esto permite que los glóbulos

blancos se visualicen o se detecten individualmente. Por ejemplo, los glóbulos blancos pueden detectarse explorando la cavidad de medición u obteniendo una imagen de la cavidad de medición.

El dispositivo de adquisición de muestras proporciona además un primer grosor de la cavidad de medición adaptado específicamente para facilitar la determinación de un recuento volumétrico de glóbulos blancos. La cavidad de medición puede tener un grosor suficiente para permitir que se analice un volumen bastante grande de la muestra de sangre y permitir por tanto una buena estadística para determinar el recuento volumétrico de glóbulos blancos. El recuento de glóbulos blancos puede obtenerse por tanto sumando el número de glóbulos blancos detectados individualmente en un volumen definido.

El dispositivo de adquisición de muestras también proporciona un segundo grosor de la cavidad de medición adaptado específicamente para facilitar la distinción entre tipos diferentes de glóbulos blancos. A este respecto, el segundo grosor puede ser más delgado que el primer grosor permitiendo que se obtengan imágenes de todo el segundo grosor dentro de una profundidad de campo de una mayor ampliación. Tal mayor ampliación puede ser necesaria cuando se distingue entre tipos diferentes de glóbulos blancos en comparación con la obtención de imágenes con el fin de determinar meramente el número total de glóbulos blancos, independientemente del tipo, dentro de la muestra de sangre.

El dispositivo de adquisición de muestras puede comprender un elemento de cuerpo que tiene dos superficies planas que forman paredes internas para definir dicha cavidad de medición. Las superficies planas pueden estar dispuestas a una distancia predeterminada entre sí para determinar una profundidad de muestra para una medición óptica. Esto implica que el dispositivo de adquisición de muestras proporciona una profundidad bien definida para la medición óptica, que puede usarse para determinar de manera precisa el recuento de glóbulos blancos por unidad volumétrica de la muestra de sangre. Un volumen de una muestra analizada estará bien definido por la profundidad de la cavidad de medición y un área de la muestra de la que están obteniéndose imágenes. Por tanto, el volumen bien definido podría usarse para asociar el número de glóbulos blancos con el volumen de la muestra de sangre de manera que se determine el recuento volumétrico de glóbulos blancos.

La cavidad de medición tiene preferiblemente una profundidad uniforme de 50-200 micrómetros. Una profundidad de al menos 50 micrómetros implica que la cavidad de medición no fuerza a realizar un frotis de la muestra de sangre para dar lugar a una monocapa lo que permite de ese modo que se analice un volumen de sangre mayor a lo largo de un área de sección transversal pequeña. Por tanto, puede analizarse un volumen suficientemente grande de la muestra de sangre con el fin de obtener valores fiables del recuento de glóbulos blancos usando una imagen relativamente pequeña de la muestra de sangre. La primera profundidad es más preferiblemente de al menos 100 micrómetros, lo que permite que se analice un área de sección transversal incluso más pequeña o un volumen de muestra más grande. Además, la primera profundidad de al menos 50 micrómetros y más preferiblemente de 100 micrómetros también simplifica la fabricación de la cavidad de medición que tiene una profundidad bien definida entre dos superficies planas.

Para la mayoría de las muestras dispuestas en una cavidad que tiene un grosor de no más de 200 micrómetros, el recuento de glóbulos blancos es tan bajo que solo habrá desviaciones menores debidas a los glóbulos blancos que se disponen solapándose entre sí. Sin embargo, el efecto de tales desviaciones estará relacionado con el recuento de glóbulos blancos y por tanto, al menos en cierto grado, pueden manejarse por medio de la corrección estadística de los resultados al menos para los valores grandes del recuento de glóbulos blancos. Esta corrección estadística puede basarse en calibraciones del aparato de medición. Las desviaciones serán incluso menores para una cavidad de medición que tenga un primer grosor de no más de 170 micrómetros, e incluso menos para una cavidad de medición que tiene un primer grosor de no más de 150 micrómetros, mediante lo cual puede usarse una calibración más sencilla. Este grosor puede incluso no requerir ninguna calibración para las células sanguíneas solapantes.

Además, el primer grosor de la cavidad de medición es suficientemente pequeño como para permitir que el aparato de medición obtenga una imagen digital de manera que pueda analizarse simultáneamente toda la profundidad de la cavidad de medición. Puesto que va a usarse un sistema de ampliación en el aparato de medición, no es sencillo obtener una gran profundidad de campo. Por tanto, el primer grosor de la cavidad de medición preferiblemente no superará los 150 micrómetros con el fin de que se analice simultáneamente todo el grosor en una imagen digital. La profundidad de campo puede disponerse para manejar un primer grosor de la cavidad de medición de 170 micrómetros o incluso de 200 micrómetros.

La cavidad de medición tiene preferiblemente un segundo grosor uniforme de 20-60 micrómetros. Este segundo grosor de la cavidad de medición permitirá que se obtengan imágenes de todo el segundo grosor dentro de una profundidad de campo de una ampliación necesaria para distinguir entre tipos diferentes de glóbulos blancos. Además, el segundo grosor todavía puede permitir que se obtengan imágenes de un volumen suficiente permitiendo que se analice un número sustancial de glóbulos blancos. Esto permitirá que se determine la proporción de tipos diferentes de glóbulos blancos con una buena certidumbre estadística. Normalmente, se desea analizar el tipo de 200 glóbulos blancos.

El dispositivo de adquisición de muestras puede estar dotado de un reactivo que se ha aplicado a la superficie

disuelto en un líquido volátil que se ha evaporado para dejar el reactivo en forma seca.

Se ha conseguido que el reactivo se disuelva ventajosamente en un líquido volátil antes de insertarse dentro de la cavidad de medición. Esto implica que el líquido puede evaporarse de manera eficaz del espacio estrecho de la cavidad de medición durante la fabricación y la preparación del dispositivo de adquisición de muestras. El reactivo puede estar dispuesto preferiblemente en forma seca en la parte de la cavidad de medición del primer grosor.

El reactivo puede disolverse preferiblemente en un disolvente orgánico y más preferiblemente puede disolverse en metanol. Tales disolventes son volátiles y pueden usarse de manera apropiada para secar el reactivo sobre una superficie de la cavidad de medición.

El dispositivo de adquisición de muestras puede comprender además una entrada de muestras que comunica la cavidad de medición con el exterior del dispositivo de adquisición de muestras, en el que la entrada está dispuesta para adquirir una muestra de sangre. La entrada de muestras puede estar dispuesta para introducir una muestra de sangre mediante una fuerza capilar y la cavidad de medición puede introducir además la sangre desde la entrada en la cavidad. Además, el dispositivo de adquisición de muestras puede estar dispuesto para introducir en primer lugar la muestra en la parte de la cavidad de medición del primer grosor. Parte de la muestra puede transportarse entonces adicionalmente por la fuerza capilar hacia la parte de la cavidad de medición del segundo grosor. Como resultado, la muestra de sangre puede adquirirse fácilmente dentro de la cavidad de medición moviendo simplemente la entrada de muestras en contacto con la sangre. Entonces, las fuerzas capilares de la entrada de muestras y la cavidad de medición introducirán una cantidad bien definida de sangre dentro de la cavidad de medición. Alternativamente, la muestra de sangre puede aspirarse o introducirse en la cavidad de medición por medio de la aplicación de una fuerza de bombeo externa al dispositivo de adquisición de muestras. Según otra alternativa, la muestra de sangre puede adquirirse en una pipeta y luego introducirse en la cavidad de medición por medio de la pipeta.

El dispositivo de adquisición de muestras puede ser desechable, es decir está dispuesto para usarse sólo una vez. El dispositivo de adquisición de muestras proporciona un kit para realizar un recuento de glóbulos blancos, puesto que el dispositivo de adquisición de muestras puede alojar una muestra de sangre y contiene todos los reactivos necesarios con el fin de presentar la muestra para el recuento de células. Esto se permite particularmente puesto que el dispositivo de adquisición de muestras está adaptado para usarse solo una vez y puede formarse sin considerar las posibilidades de limpiar el dispositivo de adquisición de muestras y volver a aplicar un reactivo. Además, el dispositivo de adquisición de muestras puede moldearse en material de plástico y de ese modo fabricarse a un precio bajo. Por tanto, todavía puede ser rentable usar un dispositivo de adquisición de muestras desechable.

La invención también se refiere a un producto de programa informático, presentado en un medio legible por ordenador, para el análisis de una muestra de sangre, que comprende: código informático para analizar digitalmente una pluralidad de imágenes de una muestra de sangre teñida y hemolizada para determinar el número de glóbulos blancos en la muestra, en el que la muestra de sangre se adquiere en una cavidad de medición de un dispositivo de adquisición de muestras, en el que la cavidad de medición tiene una profundidad uniforme de 50-200 micrómetros, en el que la pluralidad de imágenes digitales de una muestra irradiada en la cavidad de medición se adquiere a diferentes niveles en una dirección de profundidad de campo en la muestra moviendo una lente principal entre posiciones bien definidas a lo largo del eje óptico con una profundidad de campo en el intervalo de 2-30 micrómetros; código informático para analizar digitalmente cada imagen de la muestra para identificar uno o más tipos de glóbulos blancos en una zona enfocada de la muestra, asociándose cada tipo de glóbulo blanco con el tamaño y/o la forma; y código informático para emitir información correspondiente al número y los tipos de glóbulos blancos en la muestra, código informático para analizar digitalmente, para un glóbulo blanco específico, el número de dichas imágenes en las que se obtiene una imagen de dicho glóbulo blanco contando desde una imagen en la que se determina que el glóbulo blanco está desenfocado en un primer sentido, hasta una imagen en la que se determina que el glóbulo blanco está desenfocado en un segundo sentido, siendo opuestos dichos sentidos primero y segundo en perpendicular a un plano de enfoque, y determinar el radio de curvatura de dicho glóbulo blanco basándose en el número de imágenes contado.

Breve descripción de los dibujos

Ahora se describirá la invención en detalle adicional a modo de ejemplo haciendo referencia a los dibujos adjuntos.

La figura 1 es una vista esquemática de un dispositivo de adquisición de muestras.

La figura 2 es un diagrama de bloques esquemático de un aparato de medición según una primera realización.

La figura 3 es un diagrama de bloques esquemático de un aparato de medición según una segunda realización.

La figura 4 es un diagrama de flujo de un método según una primera realización de la invención.

La figura 5 es una vista esquemática de una disposición para una lente móvil según una realización que no forma parte de la invención.

La figura 6 es una vista esquemática de una disposición según una realización de la invención.

La figura 7 ilustra una muestra de la que se obtienen imágenes en tres capas diferentes.

La figura 8a ilustra un glóbulo blanco en vista de cámara cuando la célula se sitúa desenfocada con respecto a un aparato de medición según la figura 10.

La figura 8b ilustra un glóbulo blanco en vista de cámara cuando la célula se sitúa enfocada con respecto a un aparato de medición según la figura 10.

La figura 8c ilustra un glóbulo blanco en vista de cámara cuando la célula se sitúa desenfocada con respecto a un aparato de medición según la figura 10.

La figura 9a ilustra las intensidades registradas de una sección transversal de una célula que va a analizarse, cuando la célula se sitúa desenfocada con respecto a un aparato de medición según la figura 10.

La figura 9b ilustra las intensidades registradas de una sección transversal de una célula que va a analizarse, cuando la célula se sitúa enfocada con respecto a un aparato de medición según la figura 10.

La figura 9c ilustra las intensidades registradas de una sección transversal de una célula que va a analizarse, cuando la célula se sitúa desenfocada con respecto a un aparato de medición según la figura 10.

La figura 10 es una vista esquemática de un aparato de medición según una tercera realización.

La figura 11 es un diagrama de flujo de un método según una segunda realización de la invención.

La figura 12 es una vista esquemática de un aparato de medición según una cuarta realización.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

En referencia ahora a la figura 1, se describirá un dispositivo 10 de adquisición de muestras según una primera realización. El dispositivo 10 de adquisición de muestras es preferiblemente desechable y va a tirarse tras haberse usado para el análisis. Esto implica que el dispositivo 10 de adquisición de muestras no requiere un manejo complicado. El dispositivo 10 de adquisición de muestras está formado preferiblemente de material de plástico y puede fabricarse mediante moldeo por inyección. Esto hace que la fabricación del dispositivo 10 de adquisición de muestras sea sencilla y económica, mientras que el coste del dispositivo 10 de adquisición de muestras puede mantenerse bajo.

El dispositivo 10 de adquisición de muestras comprende un elemento 12 de cuerpo, que tiene una base 14, que un operario puede tocar sin producir ninguna interferencia en los resultados del análisis. La base 14 también puede tener salientes 16 que pueden ajustar un soporte en el aparato de análisis. Los salientes 16 pueden disponerse de manera que el dispositivo 10 de adquisición de muestras se coloque correctamente en el aparato de análisis.

El dispositivo 10 de adquisición de muestras comprende además una entrada 18 de muestras. La entrada 18 de muestras está definida entre paredes opuestas dentro del dispositivo 10 de adquisición de muestras, estando dispuestas las paredes tan cerca entre sí que puede crearse una fuerza capilar en la entrada 18 de muestras. La entrada 18 de muestras se comunica con el exterior del dispositivo 10 de adquisición de muestras para permitir que la sangre entre en el dispositivo 10 de adquisición de muestras. El dispositivo 10 de adquisición de muestras comprende además una cámara para contar glóbulos blancos en forma de una cavidad 20 de medición dispuesta entre paredes opuestas dentro del dispositivo 10 de adquisición de muestras. La cavidad 20 de medición está dispuesta en comunicación con la entrada 18 de muestras. Las paredes que definen la cavidad 20 de medición están dispuestas más cerca entre sí que las paredes de la entrada 18 de muestras, de manera que una fuerza capilar puede introducir sangre desde la entrada 18 de muestras en la cavidad 20 de medición.

La cavidad 20 de medición tiene una primera parte 20a que tiene un primer grosor y una segunda parte 20b que tiene un segundo grosor más pequeño. La primera parte 20a está en comunicación con la entrada 18 de muestras, mientras que la segunda parte 20b está en comunicación con la primera parte 20a. Por tanto, una fuerza capilar puede introducir sangre desde la primera parte 20a de la cavidad 20 de medición en la segunda parte 20b.

Las paredes de la primera parte 20a de la cavidad 20 de medición están dispuestas a una distancia entre sí de 50-200 micrómetros. La primera parte 20a es preferiblemente de 100 micrómetros de grosor. Además, la primera parte es preferiblemente de no más de 150 micrómetros de espesor. La distancia es generalmente uniforme a lo largo de toda la primera parte 20a. El grosor de la primera parte 20a define el volumen de sangre que está examinándose.

Puesto que el resultado del análisis va a compararse con el volumen de la muestra de sangre que está examinándose, es necesario que el grosor de la cavidad 20 de medición sea muy preciso, es decir sólo se permiten variaciones muy pequeñas en el grosor entre primeras partes 20a de de diferentes dispositivos 10 de adquisición de muestras. El grosor se elige para permitir que se analice un volumen de muestra relativamente grande en un área pequeña de la cavidad de manera que puede contarse un número de glóbulos blancos suficiente. La primera parte 20a de la cavidad 20 de medición está adaptada específicamente para determinar un recuento volumétrico de glóbulos blancos totales en una muestra de sangre. El grosor completo de la primera parte 20a puede elegirse para permitir que se obtengan imágenes de la misma dentro de una profundidad de campo de un sistema de obtención de imágenes. Entonces, puede analizarse una imagen y el número de glóbulos blancos presentes en la imagen puede contarse para determinar el recuento volumétrico de glóbulos blancos.

El dispositivo 10 de adquisición de muestras normalmente está adaptado para medir recuentos de glóbulos blancos por encima de $0,5 \times 10^9$ células/litro de sangre. A recuentos de glóbulos blancos mucho menores, el volumen de muestra será demasiado pequeño como para permitir que se cuenten cantidades estadísticamente significativas de glóbulos blancos. Además, cuando el recuento de glóbulos blancos supera 12×10^9 células/litro de sangre, el efecto de las células sanguíneas que se disponen solapándose entre sí comenzará a ser significativo en el recuento de glóbulos blancos medido. A este recuento de glóbulos blancos, los glóbulos blancos cubrirán aproximadamente el 8% de la sección transversal de la muestra que está analizándose, si el grosor de la primera parte 20a es de 140 micrómetros. Por tanto, con el fin de obtener recuentos de glóbulos blancos correctos, será necesario tener en cuenta este efecto. Por tanto, puede usarse una corrección estadística de valores del recuento de glóbulos blancos por encima de 12×10^9 células/litro de sangre. Esta corrección estadística aumentará para recuentos de glóbulos blancos crecientes, puesto que el efecto de las células sanguíneas solapantes será mayor para recuentos de glóbulos blancos mayores. La corrección estadística puede determinarse por medio de la calibración de un aparato de medición. Como alternativa, la corrección estadística puede determinarse a nivel general para configurar los aparatos de medición que van a usarse en relación con el dispositivo 10 de adquisición de muestras. Esta corrección estadística es de magnitud similar a las correcciones estadísticas que se realizan actualmente en los aparatos de análisis que usan el principio de Coulter. Se contempla que el dispositivo 10 de adquisición de muestras pueda usarse para analizar recuentos de glóbulos blancos de hasta 50×10^9 células/litro de sangre.

La segunda parte 20b de la cavidad 20 de medición está adaptada específicamente para determinar la proporción de tipos diferentes de glóbulos blancos en una muestra de sangre. Han de obtenerse imágenes de todo el grosor de la segunda parte 20a dentro de una profundidad de campo de un sistema de obtención de imágenes. Entonces, puede analizarse una imagen y puede contarse el número de glóbulos blancos de cada tipo presente en la imagen con el fin de determinar la proporción de tipos diferentes de glóbulos blancos.

Las paredes de la segunda parte 20b de la cavidad 20 de medición están dispuestas a una distancia entre sí de 20-60 micrómetros. La distancia es generalmente uniforme a lo largo de toda la segunda parte 20b. Puesto que el análisis pretende principalmente comparar el número de tipos diferentes de glóbulos blancos entre sí, no resulta crítico conocer el volumen exacto que está analizándose. Por tanto, no es necesario que el grosor de la segunda parte 20b sea tan preciso como el grosor de la primera parte 20a. Es necesario que el grosor de la segunda parte 20b permita que se analice una cantidad suficiente de glóbulos blancos con el fin de obtener resultados estadísticamente significativos. Además, tal como se estableció anteriormente, el grosor de la segunda parte 20b debe adaptarse para que se obtengan imágenes del mismo en su totalidad dentro de una profundidad de campo de un sistema de obtención de imágenes. Por tanto, se obtienen imágenes de todos los glóbulos blancos dentro de la muestra enfocados y el análisis de la muestra no está dificultado por ruido en la imagen de partes de la muestra de la que se obtienen imágenes desenfocadas. La segunda parte 20b es más delgada que la primera parte 20a con el fin de permitir que se use una mayor ampliación al tiempo que se permite que se obtengan imágenes de toda la segunda parte dentro de una profundidad de campo del sistema de obtención de imágenes. La mayor ampliación puede ser necesaria para permitir no solamente el recuento del número total de glóbulos blancos sino también para determinar el tipo de glóbulos blancos.

La superficie de una pared de la cavidad 20 de medición se recubre al menos parcialmente con un reactivo 22. El reactivo 22 puede estar liofilizado, secado por calor o secado al vacío y puede aplicarse a la superficie de la cavidad 20 de medición. Cuando se adquiere una muestra de sangre dentro de la cavidad 20 de medición, la sangre entrará en contacto con el reactivo 22 seco e iniciará una reacción entre el reactivo 22 y la sangre.

El reactivo 22 se aplica insertando el reactivo 22 dentro de la cavidad 20 de medición usando una pipeta o dispensador. El reactivo 22 se disuelve en un líquido volátil, por ejemplo un disolvente orgánico tal como metanol, cuando se inserta dentro de la cavidad 20 de medición. El disolvente con el reactivo 22 puede llenar la cavidad 20 de medición. Entonces, se realiza el secado de manera que el disolvente se evaporará y el reactivo 22 se unirá a las superficies de la cavidad 20 de medición.

Puesto que el reactivo va a secarse sobre una superficie de un espacio estrecho, el líquido tendrá una superficie muy pequeña en contacto con la atmósfera ambiental, mediante lo cual la evaporación del líquido se hace más difícil. Por tanto, resulta ventajoso usar un líquido volátil, tal como metanol, lo que permite que el líquido se evapore de manera eficaz del espacio estrecho de la cavidad de medición.

Según un método de fabricación alternativo, el dispositivo 10 de adquisición de muestras puede formarse uniendo dos piezas entre sí, mediante lo cual una pieza forma la pared inferior de la cavidad 20 de medición y la otra pieza forma la pared superior de la cavidad 20 de medición. Esto permite que un reactivo 22 se seque sobre una superficie abierta antes de que las dos piezas se unan entre sí. Por tanto, el reactivo 22 puede disolverse en agua, puesto que no es necesario que el disolvente sea volátil.

El reactivo 22 comprende un agente hemolizante de glóbulos rojos y un agente de tinción de glóbulos blancos. El agente hemolizante puede ser una sal de amonio cuaternario, una saponina, un ácido biliar, tal como ácido desoxicólico, una digitoxina, un veneno de serpiente, un glucopiranosido o un detergente no iónico de tipo Triton. El agente de tinción puede ser hematoxilina, azul de metileno, verde de metileno, azur de metileno, acetato de violeta de cresilo, azul de toluidina, violeta de genciana, un análogo de Sudan, galocianina o un análogo de fucsina, o cualquier combinación de los mismos. Cuando una muestra de sangre entra en contacto con el reactivo 22, el agente hemolizante actuará para lisar los glóbulos rojos de manera que los glóbulos rojos lisados se mezclan con el plasma sanguíneo. Además, el agente de tinción se acumulará en los núcleos de los glóbulos blancos. El reactivo 22 debe contener cantidades suficientes de agente de tinción para teñir claramente todos los núcleos de los glóbulos blancos. Por tanto, a menudo habrá un exceso de agente de tinción, que se entremezclará en el plasma sanguíneo. El exceso de agente de tinción dará un nivel de agente de tinción de fondo bajo, homogéneo en el plasma sanguíneo. El agente de tinción acumulado en los glóbulos blancos podrá distinguirse del nivel de fondo de agente de tinción.

El reactivo 22 también puede comprender otros constituyentes, que pueden ser activos, es decir, que toman parte en la reacción química con la muestra de sangre, o no activos, es decir, que no toman parte en la reacción química con la muestra de sangre. Los constituyentes activos pueden disponerse, por ejemplo, para catalizar la acción de hemólisis o tinción. Los constituyentes no activos pueden disponerse, por ejemplo, para mejorar la unión del reactivo 22 a la superficie de una pared de la cavidad 20 de medición.

En el plazo de algunos minutos o incluso de menos de un minuto, la muestra de sangre habrá reaccionado con el reactivo 22, de manera que los glóbulos rojos se habrán lisado y el agente de tinción se habrá acumulado en los núcleos de los glóbulos blancos.

En referencia ahora a la figura 2, se describirá una primera realización de un aparato 30 de medición para el análisis de glóbulos blancos en una muestra de sangre. El aparato 30 comprende un soporte 32 de muestras para alojar un dispositivo 10 de adquisición de muestras con una muestra de sangre. El soporte 32 de muestras está dispuesto para alojar el dispositivo 10 de adquisición de muestras de manera que la cavidad 20 de medición del dispositivo 10 de adquisición de muestras se coloque correctamente dentro del aparato 30. El aparato 30 comprende una fuente 34 de luz para iluminar la muestra de sangre dentro del dispositivo 10 de adquisición de muestras. La fuente 34 de luz puede ser una lámpara incandescente, que irradia luz en todo el espectro visible. El agente de tinción que se acumula en los núcleos de los glóbulos blancos absorberá luz de longitudes de onda específicas, de manera que los núcleos de los glóbulos blancos aparecerán en una imagen digital de la muestra. Si se adquiere una imagen de color, los glóbulos blancos aparecerán como puntos de color específicamente. Si se adquiere una imagen en blanco y negro, los glóbulos blancos aparecerán como puntos oscuros contra un fondo más claro.

La fuente 34 de luz puede ser alternativamente un láser o un diodo emisor de luz. Esto puede usarse para aumentar el contraste en la imagen de manera que los glóbulos blancos puedan detectarse más fácilmente. En este caso, la fuente 34 de luz se dispone para irradiar radiación electromagnética de una longitud de onda que corresponde a un pico de absorción del agente de tinción. La longitud de onda debe escogerse además de manera que la absorción de los compuestos sanguíneos distintos a los glóbulos blancos en la sangre sea relativamente baja. Además, las paredes del dispositivo 10 de adquisición de muestras deben ser esencialmente transparentes a la longitud de onda. Por ejemplo, cuando se usa azul de metileno como agente de tinción, la fuente 34 de luz puede disponerse para irradiar con luz que tiene una longitud de onda de 667 nm.

El aparato 30 comprende además un sistema 36 de obtención de imágenes, que está dispuesto en el lado opuesto del soporte 32 de muestras en relación con la fuente 34 de luz. Por tanto, el sistema 36 de obtención de imágenes está dispuesto para recibir la radiación que se ha transmitido a través de la muestra de sangre. En esta realización, el sistema 36 de obtención de imágenes comprende un medio 38 de ampliación que está dividido en dos partes independientes. Una primera parte 38a del medio 38 de ampliación está dispuesta para recibir radiación que se ha transmitido a través de la muestra de sangre en la primera parte 20a de la cavidad 20 de medición. El sistema de obtención de imágenes comprende además un primer medio 40 de adquisición de imágenes, que está dispuesto para obtener imágenes de la primera parte 20a de la cavidad 20 de medición ampliada por la primera parte 38a del medio 38 de ampliación. La primera parte 38a del medio 38 de ampliación está dispuesta para proporcionar un poder de ampliación de 1-50x, más preferiblemente 1-20x y lo más preferiblemente 1-4x. Dentro de estos intervalos de poder de ampliación, es posible distinguir los glóbulos blancos. La imagen puede adquirirse con una resolución mejorada para permitir que se use un poder de ampliación menor. Además, la profundidad de campo de la primera parte 38a del medio 38 de ampliación puede estar dispuesta para incluir el grosor de la cavidad 20 de medición.

La primera parte 38a del medio 38 de ampliación comprende una lente o sistema 42 de lentes de objetivo, que se dispone cerca del soporte 32 de muestras, y una lente o sistema 44 de lentes oculares, que se dispone a una distancia de la lente 42 de objetivo. Cada uno de la lente o el sistema 42 de lentes de objetivo y la lente o el sistema 44 de lentes oculares puede incluir una o una pluralidad de lentes individuales u otros componentes ópticos. La lente 42 de objetivo proporciona una primera ampliación de la muestra, que se amplía adicionalmente por la lente 44 ocular. El medio 38 de ampliación puede comprender lentes adicionales para lograr una ampliación y obtención de imágenes apropiadas de la muestra. La primera parte 38a del medio 38 de ampliación se dispone de manera que la muestra en la primera parte 20a de la cavidad 20 de medición cuando se coloca en el soporte 32 de muestras se enfocará sobre un plano de imagen en el primer medio 40 de adquisición de imágenes.

El primer medio 40 de adquisición de imágenes se dispone para adquirir una primera imagen digital de la muestra. El primer medio 40 de adquisición de imágenes puede ser cualquier clase de cámara digital, tal como una cámara CCD o CMOS. La referencia a una cámara digital tal como se describe en el presente documento debe considerarse solamente como una realización de una parte de análisis de imágenes. El tamaño de píxel de la cámara digital establece una restricción en el sistema 36 de obtención de imágenes de manera que el círculo de confusión en el plano de imagen puede no superar el tamaño de píxel dentro de la profundidad de campo. Sin embargo, los glóbulos blancos todavía pueden detectarse aunque estén algo borrosos y, por tanto, puede permitirse que el círculo de confusión supere el tamaño de píxel aunque se considera que está dentro de la profundidad de campo, tal como se define en este contexto. Tal como se usa en el presente documento, "profundidad de campo" implicará por tanto una longitud en una dirección a lo largo del eje óptico de la que se obtienen imágenes con un enfoque suficiente como para permitir el análisis de imágenes para identificar células situadas dentro de esta longitud. Esta "profundidad de campo" puede ser diferente de una profundidad de campo convencional definida por los ajustes ópticos y puede depender del análisis de imágenes específico que vaya a realizarse.

La cámara 40 digital adquirirá una primera imagen digital de la muestra en la primera parte 20a de la cavidad 20 de medición, en la que todo el grosor de muestra está suficientemente enfocado en la primera imagen digital para contar los glóbulos blancos. El sistema 36 de obtención de imágenes definirá una zona de la primera parte 20a de la cavidad 20 de medición, de la que se obtendrán imágenes en la primera imagen digital. La zona de la que se obtienen imágenes junto con el grosor de la primera parte 20a de la cavidad 20 de medición define el volumen de la muestra de la que se obtienen imágenes.

Una segunda parte 38b del medio 38 de ampliación está dispuesta para recibir radiación que se ha transmitido a través de la muestra de sangre en la segunda parte 20b de la cavidad 20 de medición. El sistema de obtención de imágenes comprende además un segundo medio 41 de adquisición de imágenes, que está dispuesto para obtener imágenes de la segunda parte 20b de la cavidad 20 de medición ampliada por la segunda parte 38b del medio 38 de ampliación. La segunda parte 38b del medio 38 de ampliación está dispuesta para proporcionar un poder de ampliación de 5-200x, más preferiblemente 5-100x y lo más preferiblemente 5-20x. Dentro de estos intervalos de poder de ampliación, es posible distinguir entre glóbulos blancos. La imagen puede adquirirse con una resolución mejorada para permitir que se use un poder de ampliación menor. Además, la profundidad de campo de la segunda parte 38b del medio 38 de ampliación todavía puede disponerse para incluir el grosor de la cavidad 20 de medición.

Como la primera parte 38a, la segunda parte 38b del medio 38 de ampliación también comprende una lente o sistema 43 de lentes de objetivo, que está dispuesto cerca del soporte 32 de muestra, y una lente o sistema 45 de lentes oculares, que está dispuesto a una distancia de la lente 43 de objetivo. De nuevo, cada uno de la lente o el sistema 43 de lentes de objetivo y la lente o el sistema 45 de lentes oculares puede incluir una o una pluralidad de lentes u otros componentes ópticos. La lente 43 de objetivo proporciona una primera ampliación de la muestra, que se amplía adicionalmente por la lente 45 ocular. El medio 38 de ampliación puede comprender además lentes u otros componentes ópticos para lograr una ampliación y obtención de imágenes apropiadas de la muestra. La segunda parte 38b del medio 38 de ampliación está dispuesta de manera que la muestra en la segunda parte 20b de la cavidad 20 de medición cuando se coloca en el soporte 32 de muestra se enfocará sobre un plano de imagen del segundo medio 41 de adquisición de imágenes.

El segundo medio 41 de adquisición de imágenes está dispuesto para adquirir una segunda imagen digital de la muestra. El segundo medio 41 de adquisición de imágenes puede ser cualquier clase de cámara digital, tal como una cámara CCD o CMOS. Puesto que la segunda imagen va a usarse para determinar tipos diferentes de glóbulos blancos, el círculo de confusión en el plano de imagen puede no superar el tamaño de píxel dentro de la profundidad de campo. La cámara 41 digital adquirirá una segunda imagen digital de la muestra en la segunda parte 20a de la cavidad 20 de medición, en la que todo el grosor de muestra está suficientemente enfocado en la segunda imagen digital para identificar el tipo de los glóbulos blancos presentes.

El sistema 36 de obtención de imágenes puede estar dispuesto para la obtención de imágenes de muestras de sangre en dispositivos 10 de adquisición de muestras sin necesidad de ajustar el sistema 36 de obtención de imágenes. Preferiblemente, el sistema 36 de obtención de imágenes está dispuesto dentro de un alojamiento que mantiene el sistema de obtención de imágenes en una relación fija con respecto al soporte de muestra.

El aparato 30 comprende además un analizador 46 de imágenes. El analizador 46 de imágenes está conectado a las

- 5 cámaras 40, 41 digitales primera y segunda para recibir imágenes digitales primera y segunda adquiridas por las cámaras 40, 41 digitales. El analizador 46 de imágenes se dispone para identificar patrones en la primera imagen digital que corresponden a un glóbulo blanco para el recuento del número de glóbulos blancos que están presentes en la imagen digital. Por tanto, el analizador 46 de imágenes puede disponerse para identificar puntos oscuros en un fondo más claro. El analizador 46 de imágenes puede disponerse para ampliar electrónicamente primero la imagen digital antes de analizar la imagen digital. Esto implica que el analizador 46 de imágenes puede distinguir más fácilmente glóbulos blancos de los que están obteniéndose imágenes que están cerca entre sí, aun cuando la ampliación electrónica de la imagen digital hará que la imagen digital sea algo borrosa.
- 10 El analizador 46 de imágenes puede incluir un procesador adaptado para recibir información de imágenes de las cámaras 40, 41 digitales primera y segunda. El procesador puede estar configurado con algoritmos o software de análisis de imágenes, por ejemplo, cuya naturaleza precisa puede adaptarse para realizar análisis tal como se describe en el presente documento.
- 15 El analizador 46 de imágenes puede calcular el número de glóbulos blancos por volumen de sangre dividiendo el número de glóbulos blancos que están identificados en la primer imagen digital entre el volumen de la muestra de sangre, que está bien definido tal como se describió anteriormente. El recuento volumétrico de glóbulos blancos puede presentarse en una pantalla del aparato 30.
- 20 El analizador 46 de imágenes está dispuesto además para identificar patrones en la segunda imagen digital que corresponden a un glóbulo blanco para contar el número de glóbulos blancos que están presentes en la imagen digital. El analizador 46 de imágenes analizará además la forma y el tamaño de cada glóbulo blanco detectado con el fin de determinar el tipo del glóbulo blanco. Por tanto, el analizador 46 de imágenes puede estar dispuesto para identificar puntos oscuros en un fondo más claro como glóbulos blancos. El analizador 46 de imágenes puede estar
25 dispuesto para ampliar electrónicamente primero la imagen digital antes de analizar la imagen digital. Esto implica que el analizador 46 de imágenes puede distinguir más fácilmente glóbulos blancos de los que están obteniéndose imágenes que están cerca entre sí, aun cuando la ampliación electrónica de la imagen digital hará que la imagen digital sea algo borrosa. El analizador 46 de imágenes determinará entonces el tipo del glóbulo blanco según diversos criterios físicos, siendo uno importante el tamaño del glóbulo blanco del que se obtienen imágenes. Según
30 la bibliografía, los linfocitos tienen un diámetro de aproximadamente 5-11 micrómetros, los granulocitos tienen un diámetro de aproximadamente 8-15 micrómetros y los monocitos tienen un diámetro de aproximadamente 16-25 micrómetros. Puesto que los tamaños esperados en algunos casos se solapan, se usa preferiblemente información adicional para discriminar entre diferentes tipos de glóbulo blanco entre sí. Tal información puede ser, por ejemplo, la forma y/o el tamaño del núcleo. Por ejemplo, los granulocitos pueden identificarse mediante la presencia de dos o
35 más puntos dentro de una célula correspondientes a un núcleo segmentado. Esto puede usarse para mejorar la evaluación realizada mediante la clasificación por tamaño.
- Puede obtenerse un recuento de glóbulos blancos diferenciados en cinco partes, en el que los granulocitos se diferencian adicionalmente como eosinófilos, neutrófilos y basófilos, usando características físicas adicionales.
40 Además, el recuento en tres partes de glóbulos blancos puede mejorarse usando estas características físicas adicionales. Por tanto, el análisis puede examinar además la forma de las células sanguíneas detectadas. Por tanto, el análisis puede examinar además la intensidad de la radiación transmitida a través de las células sanguíneas detectadas.
- 45 El analizador 46 de imágenes puede calcular el número de glóbulos blancos de cada tipo. Normalmente, el analizador 46 de imágenes puede contar y clasificar un determinado número, por ejemplo, 1000 glóbulos blancos. El porcentaje o la proporción de cada tipo de glóbulos blancos puede determinarse entonces como el número de glóbulos blancos clasificados como pertenecientes al tipo divididos entre el número total de glóbulos blancos analizados. Puede determinarse una medida estadísticamente significativa analizando aproximadamente 200
50 glóbulos blancos por tipo. Sin embargo, se desea que se analice un mayor número de glóbulos blancos por tipo con el fin de mejorar la estadística. Además, el analizador 46 de imágenes puede estar dispuesto para analizar glóbulos blancos de los que se obtienen imágenes con un enfoque suficiente como para clasificarse apropiadamente. Además, cuando dos glóbulos blancos o más están muy cerca entre sí, puede ser difícil separarlos correctamente, y por tanto tales glóbulos blancos pueden obviarse por completo por el analizador 46 de imágenes. Por otro lado,
55 puesto que el sistema 36 de obtención de imágenes está dispuesto para obtener imágenes de todo el grosor de la segunda parte 20b de la cavidad 20 de medición enfocado, el analizador 46 de imágenes puede determinar una enumeración volumétrica de cada tipo de glóbulos blancos solamente a partir de la segunda imagen digital.
- 60 El analizador 46 de imágenes puede realizarse como una unidad de procesamiento, que comprende códigos para realizar el análisis de imágenes.

65 En referencia ahora a la figura 3, se describirá una segunda realización de un aparato 130 de medición para el análisis de glóbulos blancos en una muestra de sangre. El aparato 130 comprende un soporte 132 de muestra para alojar un dispositivo 110 de adquisición de muestras con una muestra de sangre. El aparato 130 está dispuesto para alojar dispositivos 110 de adquisición de muestras, en los que la cavidad 120 de medición tiene un grosor uniforme a lo largo de toda la zona de la que se obtienen imágenes. Por tanto, la cavidad 120 de medición tiene un grosor

correspondiente a la primera parte 20a de la cavidad 20 de medición del dispositivo 10 de adquisición de muestras según la realización descrita anteriormente con referencia a la figura 1. El soporte 132 de muestra está dispuesto para alojar el dispositivo 110 de adquisición de muestras de manera que la cavidad 120 de medición del dispositivo 110 de adquisición de muestras se sitúe correctamente dentro del aparato 130. El aparato 130 comprende una fuente 134 de luz para iluminar la muestra de sangre dentro del dispositivo 110 de adquisición de muestras de modo correspondiente a la fuente 34 de luz de la primera realización.

El aparato 130 comprende además un sistema 136 de obtención de imágenes, que está dispuesto en un lado opuesto del soporte 132 de muestra con relación a la fuente 134 de luz. Por tanto, el sistema 136 de obtención de imágenes está dispuesto para alojar radiación que se ha transmitido a través de la muestra de sangre. En esta realización, el sistema 136 de obtención de imágenes está dispuesto para adquirir unas imágenes digitales primera y segunda a lo largo de la misma trayectoria óptica de manera que las imágenes se centran en el mismo punto en la cavidad 120 de medición. Todavía se adquieren las imágenes digitales primera y segunda de la muestra usando diferentes ajustes ópticos. Esto puede lograrse de varios modos diferentes, tal como se describirá a continuación.

Tal como se muestra en la figura 3, el sistema de obtención de imágenes comprende un medio 138 de ampliación que comprende una parte común y dos partes independientes. Por tanto, el medio 138 de ampliación puede comprender una lente o sistema 142 de lentes de objetivo, que está dispuesto cerca del soporte 132 de muestra y que se comparte para los dos ajustes ópticos para adquirir las dos imágenes digitales primera y segunda. La lente 142 de objetivo proporciona una primera ampliación de la muestra. El sistema 136 de obtención de imágenes puede comprender además un divisor 139 de haz para dirigir luz en dos direcciones diferentes hacia medios 140, 141 de adquisición de imágenes primero y segundo, que pueden ser cualquier clase de cámara digital, tal como una cámara CCD. El medio 138 de ampliación comprende una primera lente o sistema de 144 lentes oculares, que está dispuesto entre el divisor 139 de haz y la primera cámara 140 digital. La lente 142 de objetivo proporciona una primera ampliación de la muestra, que se amplía adicionalmente por la lente 144 ocular. El medio 138 de ampliación puede comprender además lentes o elementos ópticos para lograr una ampliación y obtención de imágenes apropiadas de la muestra en la primera imagen digital.

Puede ser que el medio 138 de ampliación comprenda además una segunda lente o sistema 145 de lentes oculares, que está dispuesto entre el divisor 139 de haz y la segunda cámara 141 digital. La lente 142 de objetivo proporciona una primera ampliación de la muestra, que se amplía adicionalmente por la lente 145 ocular. El medio 138 de ampliación puede comprender además lentes o elementos ópticos para lograr una ampliación y obtención de imágenes apropiadas de la muestra en la segunda imagen digital. La lente 142 de objetivo y la lente 145 ocular pueden implementarse como paquetes de lente y el paquete 145 de lente ocular moverá entonces un plano principal virtual dentro del paquete 142 de lente de objetivo para cambiar la relación entre el plano de imagen y el paquete 142 de lente de objetivo para permitir la ampliación adicional, mientras que el dispositivo 110 de adquisición de muestras no se mueve en relación con el paquete 142 de lente de objetivo. De este modo, pueden obtenerse diferentes ampliaciones en las imágenes digitales primera y segunda.

En particular, el medio 138 de ampliación, tal como se muestra en esta realización, comprende un elemento 147 óptico que realza la obtención de imágenes de glóbulos blancos que se colocan enfocados. Esto aumenta las posibilidades de identificar de qué tipos de células sanguíneas están obteniéndose imágenes enfocados y han de considerarse de ese modo cuando se distingue entre tipos diferentes de glóbulos blancos.

El elemento 147 óptico permite que se adquiera una imagen de un grosor de muestra mucho mayor que la profundidad de campo de la parte del sistema 136 de obtención de imágenes que captura la segunda imagen digital. El elemento 147 óptico garantiza que las células que están desenfocadas puedan omitirse de la consideración con el fin de aumentar la certidumbre de la medición. Puesto que el elemento 147 óptico afecta a la obtención de imágenes de células desenfocadas, se identificarán fácilmente las células enfocadas. El elemento 147 óptico puede implementarse como filtro espacial que afecta a la obtención de imágenes de una célula de manera que el borde de la célula comprenderá una intensidad en exceso mayor que la intensidad de fondo, cuando se obtienen imágenes de la célula absorbiendo luz. Esto puede detectarse fácilmente en el análisis de imágenes y, por tanto, estas células pueden omitirse rápidamente de la consideración.

Según una realización alternativa, el medio de ampliación puede comprender un elemento de codificación de frente de onda entre el divisor 139 de haz y la segunda cámara 141 digital. El elemento de codificación de frente de onda puede reemplazar por tanto al elemento 147 óptico. Un elemento de codificación de frente de onda distorsiona intencionadamente los rayos de luz haciéndolos pasar a través de una lámina de onda con forma de silla de montar, que es relativamente plana en la parte central, pero con bordes festoneados. Esto provoca una aberración óptica específica, la imagen tiene aspecto borroso, pero el desenfoque es el mismo a lo largo de un gran intervalo de distancias. Este elemento de codificación de frente de onda aumenta por tanto la profundidad a lo largo del eje óptico que puede analizarse. Las distorsiones en la imagen están determinadas principalmente por la forma del elemento de codificación de frente de onda de desenfoque, que se conoce de manera precisa. Por tanto, un ordenador puede eliminar la borrosidad punto a punto. Un ordenador puede decodificar la imagen usando lo que es esencialmente un filtro digital, y por tanto, crear una imagen que es nítida a lo largo de una gran profundidad de campo. De este modo, el medio de ampliación puede aumentar la profundidad de campo del sistema de obtención

de imágenes, permitiendo una mayor profundidad de una muestra de la que van a obtenerse imágenes enfocada.

En esta realización, el divisor de haz puede reemplazarse, el sistema 136 de imagen puede comprender un espejo u otro elemento (no mostrado) para dirigir esencialmente toda la luz procedente de la muestra hacia una cámara seleccionada de las dos cámaras 140, 141 digitales. El espejo puede girarse o moverse entonces para desplazar la cámara 140, 141 que está observando la muestra. Esto permite que pase más luz a las cámaras 140, 141 digitales y, por tanto, se proporcionen mejores condiciones de luz para adquirir las imágenes. Sin embargo, las dos imágenes no puede grabarse simultáneamente y el sistema 136 de imagen requerirá partes móviles. Según una alternativa, una de las cámaras puede estar dispuesta para observar la muestra cuando el espejo se retira por completo de la trayectoria óptica.

Según otra alternativa, la lente 142 de objetivo puede proporcionar toda la ampliación necesaria para obtener la primera imagen. Por tanto, puede hacerse pasar luz directamente desde el divisor de haz o el espejo hasta la primera cámara 140 digital.

Según aún otra alternativa, no se comparte ninguna lente de objetivo por los ajustes ópticos primero y segundo. Por tanto, un divisor de haz o espejo puede estar dispuesto cerca del soporte 132 de muestra y el medio 138 de ampliación puede comprender tanto una lente de objetivo como una lente ocular en ambos caminos ópticos entre el divisor de haz y la primera cámara 140 digital y entre el divisor de haz y la segunda cámara 141 digital.

Según una alternativa adicional, las imágenes digitales primera y segunda se obtienen por medio de una cámara digital. En este caso, es necesario conmutar o cambiar el medio 138 de ampliación con el fin de cambiar los ajustes ópticos para obtener las dos imágenes digitales. Por tanto, una lente 242 de objetivo puede moverse entre dos posiciones diferentes bien definidas, tal como se muestra en la figura 5. Por tanto, la lente 242 de objetivo puede estar dispuesta para moverse a lo largo del eje óptico y hará contacto con un tope, por ejemplo un borde del eje óptico que hace contacto son un saliente 250, 252. Por tanto, la distancia entre la lente de objetivo y el dispositivo de adquisición de muestras puede controlarse de manera precisa para controlar la ampliación de una imagen que va a adquirirse.

En cualquiera de las alternativas descritas anteriormente, la primera cámara 140 digital está dispuesta para obtener imágenes de la cavidad 120 de medición con un primer ajuste óptico proporcionado por el medio 138 de ampliación. El medio 138 de ampliación está dispuesto por tanto para proporcionar un poder de ampliación de 1-50x, más preferiblemente 1-20x y lo más preferiblemente 1-4x. Dentro de estos intervalos de poder de ampliación, es posible distinguir los glóbulos blancos. La imagen puede adquirirse con una resolución mejorada para permitir que se use un poder de ampliación menor. Además, la profundidad de campo del medio 138 de ampliación puede disponerse todavía para incluir el grosor de la cavidad 120 de medición.

Tal como se describió con referencia a la primera realización mostrada en la figura 2, la primera cámara 140 digital en la segunda realización está dispuesta para adquirir una primera imagen digital de la muestra. La primera cámara 140 digital observa la muestra de manera que todo el grosor de la cavidad 120 de medición esté dentro de la profundidad de campo definida para la primera realización. El sistema 136 de obtención de imágenes definirá una zona de la cavidad 120 de medición, de la que se obtendrán imágenes en la primera imagen digital. La zona de la que se obtienen imágenes junto con el grosor de la cavidad 120 de medición define el volumen de la muestra de la que se obtienen imágenes.

Además, en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, la segunda cámara 141 digital está dispuesta para obtener imágenes de la cavidad 120 de medición con un segundo ajuste óptico proporcionado por el medio 138 de ampliación. El medio 138 de ampliación está dispuesto para proporcionar un poder de ampliación de 5-200x, más preferiblemente 5-100x y lo más preferiblemente 5-20x. Dentro de estos intervalos de poder de ampliación, es posible distinguir los glóbulos blancos. La imagen puede adquirirse con una resolución mejorada para permitir que se use un poder de ampliación menor. Sin embargo, puesto que la segunda imagen digital observa la misma parte de la cavidad 120 de medición que la primera imagen digital, la mayor ampliación usada en el segundo ajuste óptico puede impedir que se obtengan imágenes de todo el grosor de la cavidad 120 de medición dentro de una profundidad de campo. La segunda imagen digital obtendrá imágenes por tanto de glóbulos blancos enfocados, pero también obtendrá imágenes de glóbulos blancos y otras partes de la muestra de sangre que están desenfocados provocando una alteración borrosa en la imagen. En estas condiciones, el elemento 147 óptico, tal como se describió anteriormente, mejorará las probabilidades de identificar células de las que se obtienen imágenes enfocadas, facilitando que se clasifiquen según el tipo.

El medio 138 de ampliación puede estar dispuesto ventajosamente para colocar una parte superior del grosor de la cavidad 120 de medición enfocada en el plano de imagen de la segunda cámara 141 digital. Esto implica que las alteraciones de las partes de la muestra de sangre que están desenfocadas están cerca de la parte inferior y permanecen relativamente bajas. Sin embargo, puede concebirse que se obtengan imágenes de cualquier parte de la cavidad 120 de medición enfocada en la segunda imagen digital. Además, el medio 138 de ampliación puede estar dispuesto para obtener imágenes normalmente de un grosor de 20-60 micrómetros de la cavidad 120 de medición enfocada.

Según aún otra alternativa que no forma parte de la presente invención, tal como se ilustra en la figura 6, solamente se adquiere una imagen digital. Sin embargo, es necesario que esta imagen digital proporcione información de la dirección de luz que está detectándose. Esto implica que la imagen digital contiene información no solamente de la radiación detectada, sino también de un punto en el espacio desde el que se emitió la radiación detectada. Esta imagen digital puede presentarse entonces de tal modo que puede desplazarse el enfoque de la imagen digital según se desee. Por tanto, puede usarse la imagen digital en primer lugar para contar un número total de glóbulos blancos dentro de toda la profundidad de la cavidad de medición y en segundo lugar, desplazando el enfoque a una parte del grosor, para determinar la proporción de tipos diferentes de glóbulos blancos en la muestra. Esta alternativa puede implementarse tal como se muestra en la figura 6 que comprende una fuente 334 de luz, una lente 342 de objetivo y una cámara 340 digital. Estas partes pueden implementarse de modo similar a lo descrito anteriormente. El aparato comprende además una serie de pequeñas lentes 360 que se proporcionan en la trayectoria óptica entre el dispositivo 110 de adquisición de muestras y la cámara 340 digital. La serie de pequeñas lentes 360 proporciona una posibilidad de realizar un seguimiento de los rayos en la imagen adquirida de manera que pueden enfocarse diferentes partes de la imagen.

Volviendo ahora a la figura 3, el aparato 130 comprende además un analizador 146 de imágenes. El analizador 146 de imágenes se conecta a las cámaras 140, 141 digitales primera y segunda para recibir imágenes digitales primera y segunda adquiridas por las cámaras 140, 141 digitales. Alternativamente, el analizador 146 de imágenes recibe solamente una imagen digital que contiene información de dirección de luz tal como se describió en el párrafo anterior. El analizador 146 de imágenes está dispuesto para analizar las imágenes digitales primera y segunda de modo similar a lo descrito para el analizador 46 de imágenes de la primera realización anterior. Sin embargo, puesto que la segunda imagen digital puede obtenerse mediante la obtención de imágenes solamente de la parte del grosor de la muestra dentro de una profundidad de campo, el analizador 146 de imágenes puede requerir que se manipule la segunda imagen digital con más cuidado. En primer lugar, el analizador 146 de imágenes solo analizará los glóbulos blancos que se identifican de los que se obtienen imágenes de los mismos enfocados. Esto es posible puesto que el analizador 146 de imágenes puede determinar solo la proporción de tipos diferentes de glóbulos blancos y, por tanto, no será necesario conocer exactamente el volumen de la muestra que está analizándose. Las células de las que se obtienen imágenes desenfocadas pueden estar borrosas de tal modo que el analizador 146 de imágenes podría determinar tamaños incorrectos de las células y, por tanto, clasificar incorrectamente las células. Por tanto, garantizando que solo se analizan células de las que se obtienen imágenes enfocadas, se mejora la certidumbre del análisis.

La figura 7 ilustra una muestra 710 de la que se obtienen imágenes en tres capas 720a-c diferentes de la muestra 710. La capa 720b indica un plano de enfoque que va a comentarse en detalle a continuación. Un sistema óptico tiene una profundidad de campo en la que puede considerarse que los objetos están enfocados incluso si no están situados exactamente en el plano de enfoque. En la figura 7, la profundidad de campo del plano 720b de enfoque se indica mediante la zona 720b' sombreada.

Las figuras 8a-c ilustran tres glóbulos blancos diferentes en vista de cámara y las figuras 9a-c ilustran sus distribuciones de luz respectivas.

La figura 8b ilustra un glóbulo blanco del que se obtienen imágenes enfocado. Los núcleos aparecen como sombras oscuras mientras que el citoplasma circundante es casi invisible. En la figura 9b, se muestra la distribución de intensidad de luz. Los núcleos aparecen como partes con intensidad de luz significativamente menor mientras que el citoplasma deja inalterada la intensidad de luz.

La figura 8a ilustra un glóbulo blanco del que se obtienen imágenes demasiado cerca del medio 441 de adquisición de imágenes como para estar enfocado. Los núcleos aparecen como sombras oscuras mientras que el citoplasma circundante actúa como lente y refracta y difunde la luz, lo que da como resultado un círculo oscuro alrededor de los núcleos. En la figura 9a, se muestra la distribución de intensidad de luz. Los núcleos aparecen como una parte con intensidad de luz significativamente menor y el citoplasma aparece con baja intensidad de luz.

La figura 8c ilustra un glóbulo blanco del que se obtienen imágenes demasiado lejos del medio 441 de adquisición de imágenes como para estar enfocado. Los núcleos aparecen como sombras oscuras mientras que el citoplasma circundante actúa como lente y refracta la luz, dando como resultado un círculo brillante alrededor de los núcleos. En la figura 9c, se muestra la distribución de intensidad de luz. Los núcleos aparecen como una parte con intensidad de luz significativamente menor mientras que el citoplasma aparece con alta intensidad de luz.

El analizador 146 de imágenes está dispuesto además para determinar el tamaño de los glóbulos blancos de los que se obtienen imágenes enfocados. Este tamaño determinado puede usarse entonces para clasificar los glóbulos blancos de manera correspondiente a la manera descrita anteriormente con referencia a la primera realización. Puesto que la segunda imagen digital puede estar un poco borrosa y ser difícil de analizar, el analizador 146 de imágenes puede estar dispuesto para contar y clasificar solamente un número relativamente pequeño, pongamos 200, de glóbulos blancos. Esto puede ser suficiente todavía para formar un resultado estadísticamente significativo de la proporción de tipos diferentes de glóbulos blancos en la muestra. Como alternativa, el analizador 146 de

imágenes puede estar dispuesto para realizar la medición de tamaño y la verificación de si se obtienen imágenes de una célula enfocada dentro de la misma etapa de procesamiento de imágenes. Por tanto, se determina el tamaño de cada célula de la que se obtienen imágenes, pero solamente se consideran las células de las que se obtienen imágenes enfocadas cuando se determina la proporción de tipos diferentes de glóbulos blancos en la muestra.

5 El analizador 146 de imágenes puede realizarse como una unidad de procesamiento, que comprende códigos para realizar el análisis de imágenes.

10 Cuando se usan los principios de las figuras 7-9a-c y la configuración de la figura 10, el aparato 30 puede estar dispuesto para adquirir varias imágenes digitales de la muestra usando diferentes ajustes ópticos. Por ejemplo, las varias imágenes digitales pueden obtener imágenes de diez capas 720a-j diferentes de la muestra 710 tal como se muestra en la figura 10. El analizador de imágenes está dispuesto para determinar, para un glóbulo blanco específico, el número de dichas imágenes en las que se obtiene una imagen de dicho glóbulo blanco. El recuento de imágenes comienza desde una imagen en la que se determina que el glóbulo blanco está desenfocado en un primer sentido, continúa a través de la(s) imagen/imágenes en la(s) que se determina que el glóbulo blanco está enfocado y termina en una imagen en la que se determina que el glóbulo blanco está desenfocado en un segundo sentido. Los sentidos primero y segundo son básicamente opuestos en perpendicular al plano de enfoque. En la figura 8a y la figura 9a, se determina que la célula está desenfocada en un primer sentido. Se determina que el límite para estar desenfocada en este sentido es la imagen en la que se mide el mayor contraste para una célula específica para las diferentes zonas (zona central y de anillo). Para células que están ubicadas incluso más cerca del sistema de obtención de imágenes, se detectará la misma forma básica con un anillo oscuro alrededor de un núcleo oscuro, pero estarán más borrosas y el contraste será menor que en la imagen determinada como límite para estar desenfocada en el primer sentido. De manera similar, se determinará el otro límite identificando en qué imagen se detecta el mayor contraste entre los núcleos oscuros y la luz que encierra los núcleos. En las imágenes con un plano de enfoque incluso más alejado del sistema de obtención de imágenes, las células se detectarán todavía como un núcleo oscuro y un círculo de luz, pero estarán más borrosas y el contraste será menor que en la imagen que se considera el límite para estar desenfocada en el segundo sentido.

30 Esto proporcionará información referente al radio de curvatura del glóbulo blanco respectivo. Un glóbulo blanco comparativamente pequeño proporcionará una distancia focal comparativamente corta y dará como resultado, cuando se cuentan imágenes entre las imágenes de limitación, un número de imágenes comparativamente bajo. También podría decirse que pasan rápidamente de estar enfocadas a desenfocadas. Un glóbulo blanco comparativamente grande proporcionará una mayor distancia focal y la distancia entre la imagen en la que están desenfocadas en un sentido y la imagen en la que están desenfocadas en el otro sentido será comparativamente mayor. También podría decirse que pasan lentamente de estar enfocadas a desenfocadas cuando se comparan las diferentes imágenes adquiridas con imágenes de capas vecinas. Puede observarse que la distancia focal y las imágenes de limitación están relacionadas con una distancia, pero con una distancia especificada en el plano de enfoque para una imagen respectiva, en su lugar puede indicarse una distancia como varias imágenes.

40 La realización de la figura 10 comprende una fuente 434 de luz, un dispositivo 410 de adquisición de muestras, un sistema 438 óptico (con un factor de ampliación de 10x), un diafragma 450 que dirige la luz a un medio 440 de adquisición de imágenes. En referencia a la figura 4, se describirá un método para la enumeración volumétrica de glóbulos blancos. El método comprende adquirir una muestra de sangre en un dispositivo de adquisición de muestras, etapa 102. Se adquiere una muestra de sangre completa sin diluir en el dispositivo de adquisición de muestras. La muestra puede adquirirse de sangre capilar o de sangre venosa. Puede introducirse una muestra de sangre capilar dentro de la cavidad de medición directamente de un dedo de un paciente en el que se ha realizado una punción. La muestra de sangre entra en contacto con un reactivo en el dispositivo de adquisición de muestras que inicia una reacción. Los glóbulos rojos se lisan y un agente de tinción se acumula en los núcleos de los glóbulos blancos. En el plazo de algunos minutos de la adquisición de la muestra de sangre, la muestra está lista para analizarse. Alternativamente, se adquiere una muestra de sangre y se mezcla con un agente hemolizante y un agente de tinción antes de introducirse la muestra en el dispositivo de adquisición de muestras. El dispositivo de adquisición de muestras se coloca entonces en un aparato de análisis, etapa 104. Puede iniciarse un análisis apretando un botón del aparato de análisis. Alternativamente, el aparato inicia automáticamente el análisis detectando la presencia del dispositivo de adquisición de muestras.

55 Se irradia la muestra, etapa 106, y se adquiere una primera y segunda imagen digital de la muestra, etapa 108, usando diferentes ajustes ópticos. La muestra está irradiándose con radiación electromagnética de una longitud de onda correspondiente a un pico de absorción del agente de tinción. Esto implica que las imágenes digitales contendrán puntos negros o más oscuros en las posiciones de los núcleos de los glóbulos blancos.

60 Las imágenes digitales adquiridas se transfieren a un analizador de imágenes, que realiza el análisis de imágenes de las imágenes digitales primera y segunda, etapa 110. El analizador de imágenes cuenta el número de puntos negros en la primera imagen digital con el fin de determinar una enumeración volumétrica de todos los glóbulos blancos en la muestra de sangre. El analizador de imágenes también analiza el tamaño y la forma de un determinado número de puntos negros en la segunda imagen digital con el fin de clasificar los glóbulos blancos y obtener una proporción de tipos diferentes de glóbulos blancos en la muestra de sangre.

Según otra realización ilustrada en la figura 11, la etapa 108b de adquisición de imágenes implica adquirir una pluralidad de imágenes digitales en capas diferentes.

5 En el analizador de imágenes, se analiza la imagen digital respectiva (de cada capa) con el fin de determinar qué glóbulos blancos están enfocados y para estos glóbulos blancos se analiza la imagen para clasificar los glóbulos blancos y obtener una proporción de tipos diferentes de glóbulos blancos en la muestra de sangre.

10 Debe hacerse hincapié en que las realizaciones preferidas descritas en el presente documento no son limitativas en modo alguno y que son posibles muchas realizaciones alternativas dentro del alcance de protección definido por las reivindicaciones adjuntas.

15 El aparato de la figura 10 puede ser una unidad independiente puesto que puede determinarse el número total de glóbulos blancos al tiempo que se determina la clasificación de glóbulos blancos respectivos. Alternativamente, el aparato de la figura 10 puede usarse como medio 41 de adquisición de imágenes en la realización de la figura 2 o como medio 141 de adquisición de imágenes en la realización de la figura 3. Tal diseño se muestra en principio en la figura 12. Esta realización comprende una fuente 534 de luz, un diafragma 550, un dispositivo 510 de adquisición de muestras, un divisor 539 de haz, un primer sistema 538a óptico (con un primer factor de ampliación de aproximadamente 3x) que dirige la luz a un primer medio 540 de adquisición de imágenes y un segundo sistema 20 538b óptico (con un segundo factor de ampliación de aproximadamente 10x) que dirige la luz a un segundo medio 541 de adquisición de imágenes por medio de un espejo. El segundo sistema óptico también comprende medios para cambiar el enfoque 542 o puede ser móvil. De ese modo, el segundo medio 541 de adquisición puede adquirir una pluralidad de imágenes digitales. En una realización, se omite el primer medio 540 de adquisición de imágenes y se determina el número total de glóbulos blancos a partir de las imágenes adquiridas por el segundo medio 541 de 25 adquisición de imágenes.

REIVINDICACIONES

1. Aparato (30; 130) de medición para la enumeración de glóbulos blancos en una muestra de sangre, comprendiendo el aparato:

5 un soporte (32; 132), que está dispuesto para alojar un dispositivo (10; 110; 410; 510) de adquisición de muestras que comprende una cavidad (20; 120) de medición que contiene una muestra, en el que la cavidad (20; 120) de medición está adaptada para contener una muestra de sangre teñida y hemolizada, y en el que la cavidad (20; 120) de medición tiene una profundidad uniforme de 50-200 micrómetros,

10 un sistema (36; 136) de obtención de imágenes adaptado para adquirir una pluralidad de imágenes digitales ampliadas de la muestra a diferentes niveles en una dirección de profundidad de campo en la muestra proporcionando una lente principal que puede moverse entre posiciones bien definidas a lo largo del eje óptico, en el que el sistema (36; 136) de obtención de imágenes está dispuesto para obtener dichas imágenes digitales con una profundidad de campo en el intervalo de 2-30 micrómetros, y

15 un analizador (46; 146) de imágenes, que está dispuesto para analizar cada imagen digital adquirida para identificar glóbulos blancos teñidos y determinar el número de glóbulos blancos en la muestra, en el que el analizador (46; 146) de imágenes está dispuesto para analizar cada imagen digital adquirida para identificar glóbulos blancos de los que se obtienen imágenes enfocados y determinar los tipos y el número de estos glóbulos blancos, distinguiéndose los tipos según el tamaño y/o la forma de los glóbulos blancos teñidos, mediante lo cual se determina la proporción de tipos diferentes de glóbulos blancos en la muestra,

20 en el que el analizador (46; 146) de imágenes está dispuesto para determinar, para un glóbulo blanco específico, el número de dichas imágenes en las que se obtiene una imagen de dicho glóbulo blanco contando desde una imagen en la que se determina que el glóbulo blanco está desenfocado en un primer sentido, hasta una imagen en la que se determina que el glóbulo blanco está desenfocado en un segundo sentido, siendo dichos sentidos primero y segundo opuestos en perpendicular a un plano de enfoque, y

25 en el que el analizador (46; 146) de imágenes está dispuesto para determinar, basándose en el número de imágenes contado, el radio de curvatura de dicho glóbulo blanco.
2. Aparato (30; 130) de medición según la reivindicación 1, que comprende además una fuente (34; 134; 434; 534) de radiación electromagnética, que está dispuesta para irradiar la muestra contenida en la cavidad (20; 120) de medición del dispositivo (10; 110; 410; 510) de adquisición de muestras.
3. Aparato de medición según la reivindicación 1, en el que el sistema (36; 136) de obtención de imágenes está dispuesto para proporcionar información de dirección de luz en la imagen adquirida, mediante lo cual se permite que se desplace el enfoque en la imagen adquirida.
4. Aparato de medición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el analizador (46; 146) de imágenes está dispuesto para analizar bordes de glóbulos blancos de los que se obtienen imágenes con el fin de evaluar si se obtienen imágenes del glóbulo blanco enfocado basándose en una pendiente de intensidad en el borde.
5. Método para la enumeración de glóbulos blancos en una muestra de sangre, comprendiendo dicho método:

50 adquirir una muestra de sangre en una cavidad (20; 120) de medición de un dispositivo (10; 110; 410; 510) de adquisición de muestras, mezclándose la muestra de sangre con un reactivo, que comprende un agente hemolizante para lisar glóbulos rojos en la muestra y un agente de tinción para teñir glóbulos blancos en la muestra de sangre, en el que la cavidad (20; 120) de medición tiene una profundidad uniforme de 50-200 micrómetros,

55 adquirir una pluralidad de imágenes digitales de una ampliación de una muestra irradiada en la cavidad de medición a diferentes niveles en una dirección de profundidad de campo en la muestra moviendo una lente principal entre posiciones bien definidas a lo largo del eje óptico, en el que dicha pluralidad de imágenes digitales se obtienen con una profundidad de campo en el intervalo de 2-30 micrómetros,

60 analizar digitalmente cada imagen digital para identificar los glóbulos blancos teñidos y determinar el número de glóbulos blancos en la muestra,

65 analizar digitalmente cada imagen digital adquirida para identificar glóbulos blancos de los que se obtienen imágenes enfocados y determinar los tipos y el número de estos glóbulos blancos, distinguiéndose los tipos según el tamaño y/o la forma de los glóbulos blancos teñidos, mediante lo cual se determina la proporción de tipos diferentes de glóbulos blancos en la muestra, y determinar, para un glóbulo blanco específico, el número de dichas imágenes en las que se obtiene una imagen de dicho glóbulo blanco contando desde una imagen en la que se determina que el glóbulo blanco está desenfocado en un primer sentido, hasta una imagen en la que se

determina que el glóbulo blanco está desenfocado en un segundo sentido, siendo dichos sentidos primero y segundo opuestos en perpendicular a un plano de enfoque, y determinar el radio de curvatura de dicho glóbulo blanco basándose en el número de imágenes contado.

5 6. Método según la reivindicación 5, en el que se mezcla la muestra con el reactivo en la cavidad de medición.

7. Producto de programa informático, presentado en un medio legible por ordenador, para el análisis de una muestra de sangre, que comprende:

10 código informático para analizar digitalmente una pluralidad de imágenes de una muestra de sangre teñida y hemolizada para determinar el número de glóbulos blancos en la muestra, en el que la muestra de sangre se adquiere en una cavidad (20; 120) de medición de un dispositivo (10; 110; 410; 510) de adquisición de muestras, en el que la cavidad (20; 120) de medición tiene una profundidad uniforme de 50-200 micrómetros, en el que la pluralidad de imágenes digitales de una muestra irradiada en la cavidad (20; 120) de medición se adquiere a diferentes niveles en una dirección de profundidad de campo en la muestra moviendo una lente principal entre posiciones bien definidas a lo largo del eje óptico con una profundidad de campo en el intervalo de 2-30 micrómetros;

15 código informático para analizar digitalmente cada imagen de la muestra para identificar uno o más tipos de glóbulos blancos en una zona enfocada de la muestra, asociándose cada tipo de glóbulo blanco con el tamaño y/o la forma;

20 código informático para analizar digitalmente, para un glóbulo blanco específico, el número de dichas imágenes en las que se obtiene una imagen de dicho glóbulo blanco contando desde una imagen en la que se determina que el glóbulo blanco está desenfocado en un primer sentido, hasta una imagen en la que se determina que el glóbulo blanco está desenfocado en un segundo sentido, siendo dichos sentidos primero y segundo opuestos en perpendicular a un plano de enfoque, y determinar el radio de curvatura de dicho glóbulo blanco basándose en el número de imágenes contado; y

25 código informático para emitir información correspondiente al número y los tipos de glóbulos blancos en la muestra.

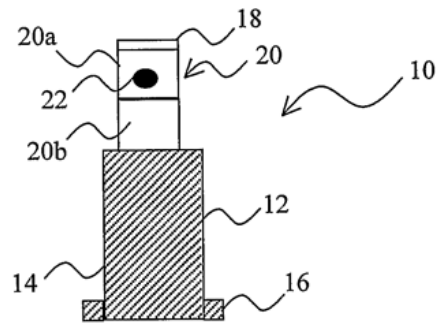


Fig. 1

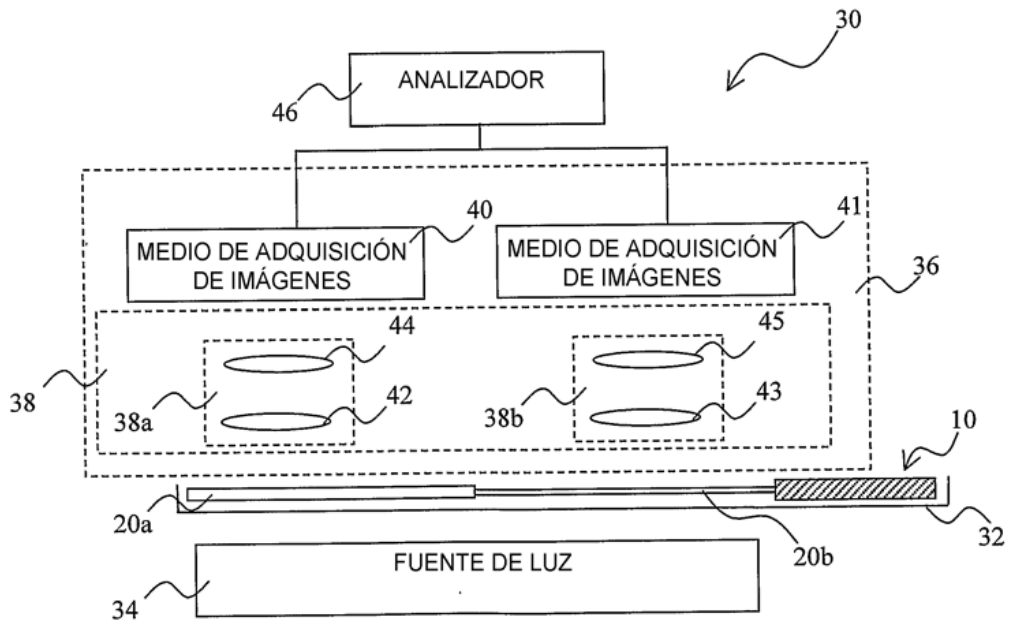


Fig. 2

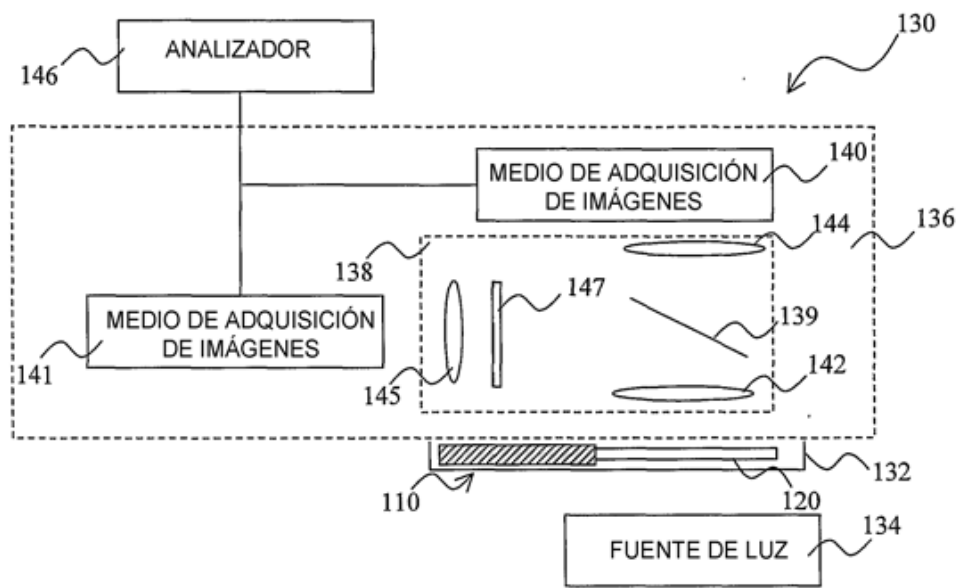


Fig. 3

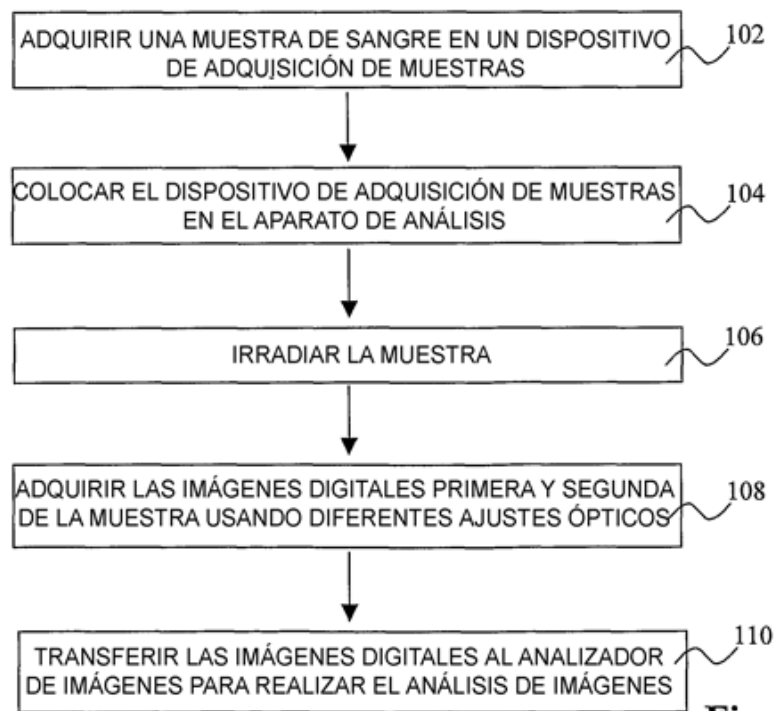


Fig. 4

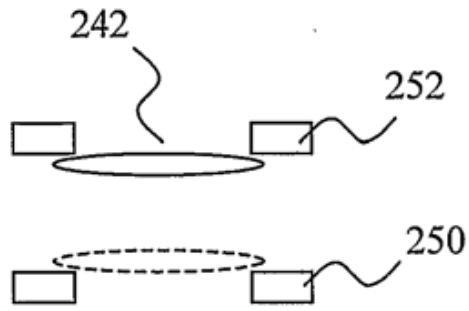


Fig. 5

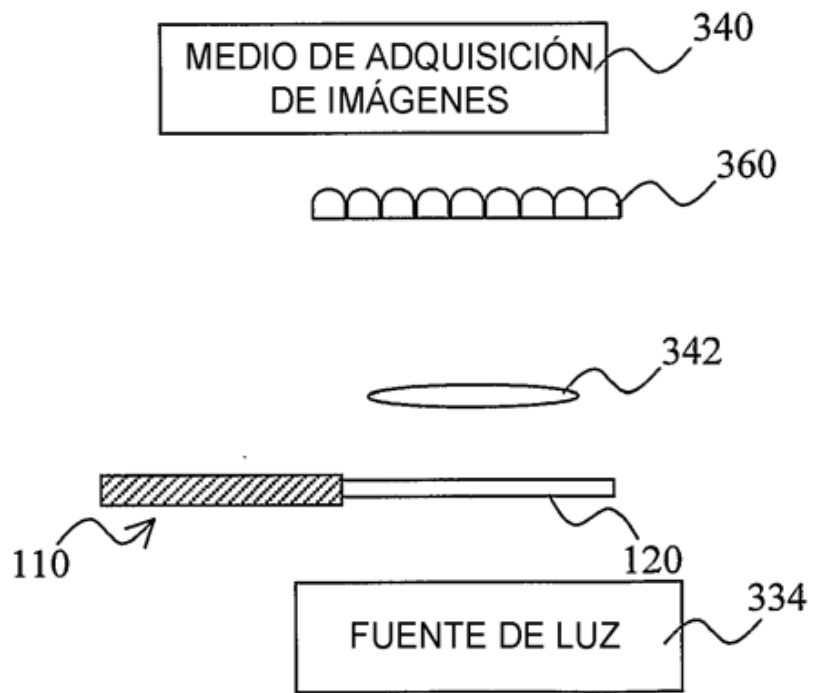
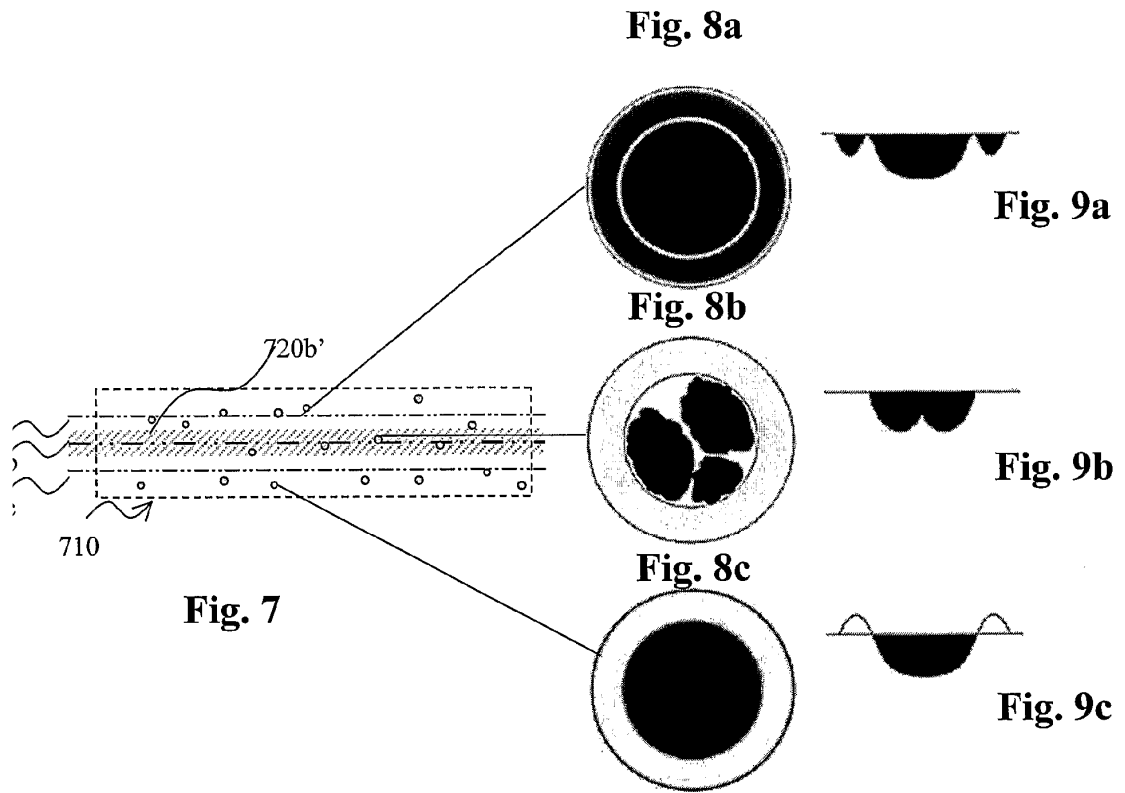


Fig. 6



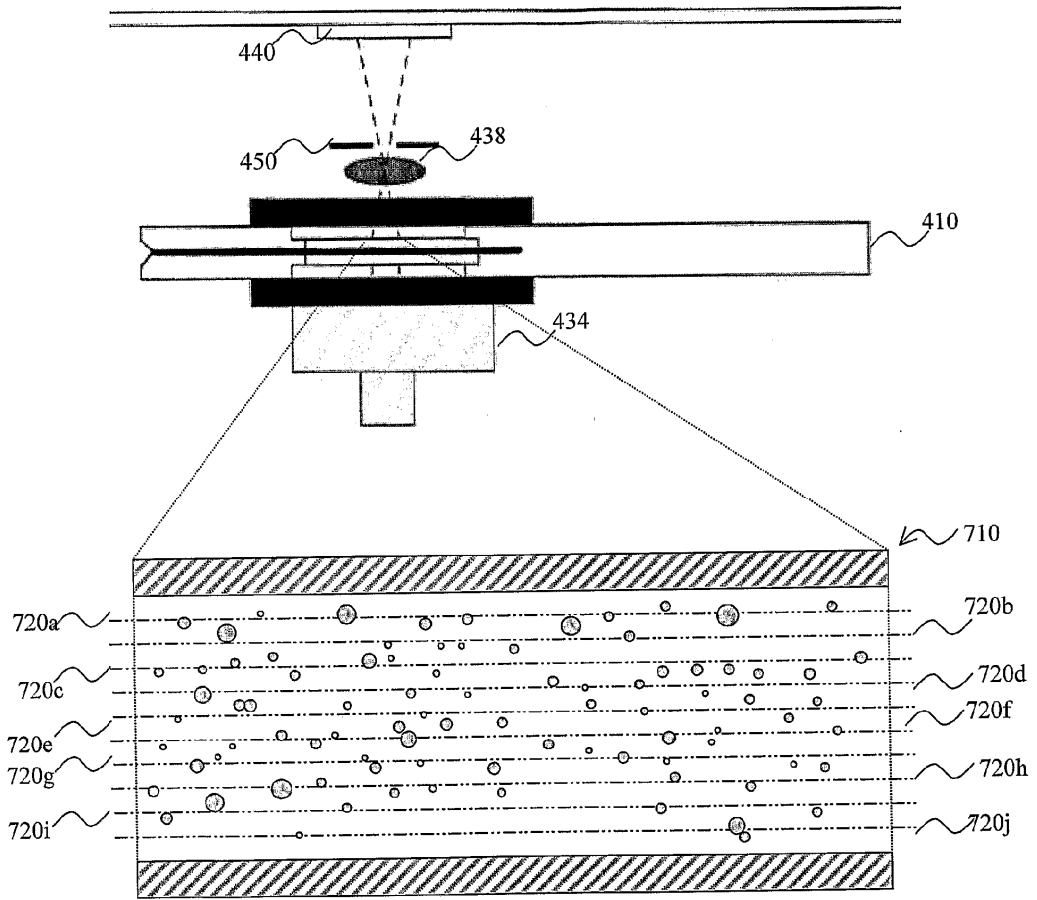


Fig. 10

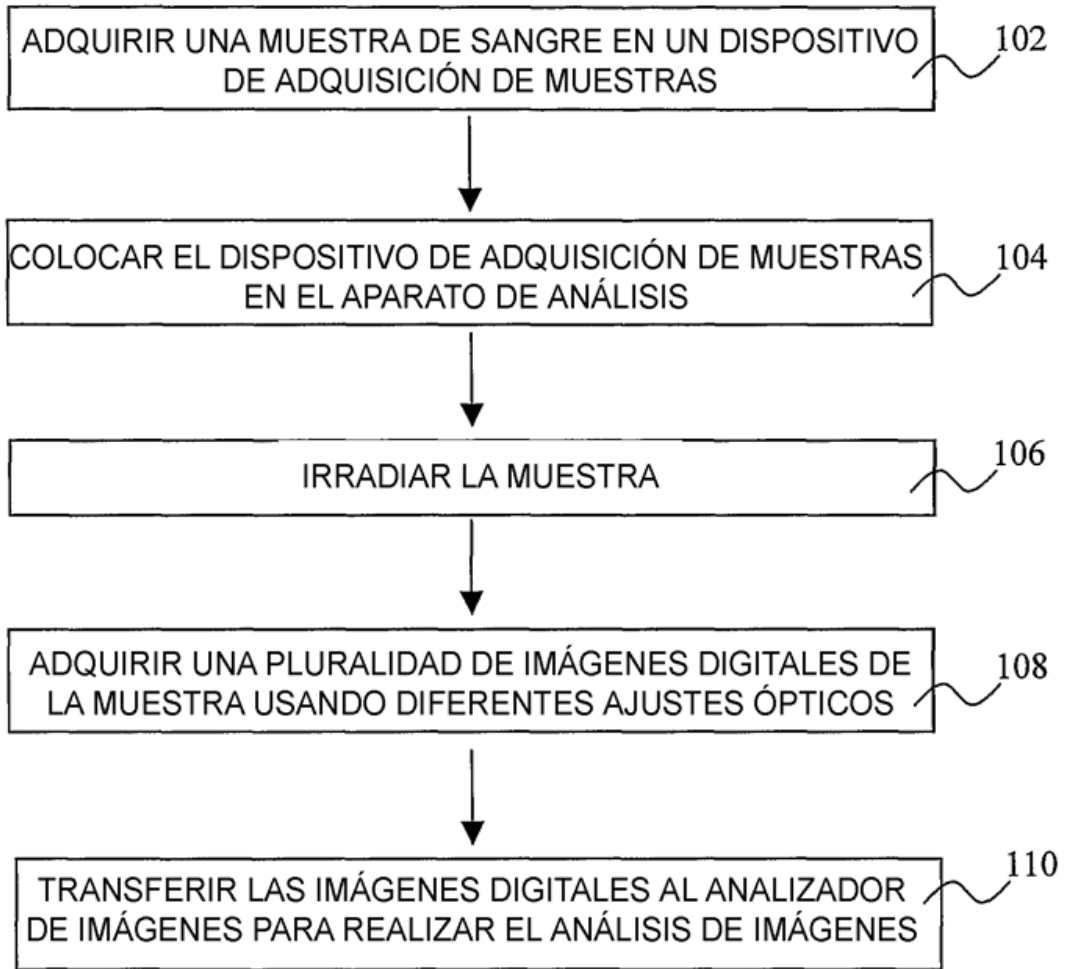


Fig. 11

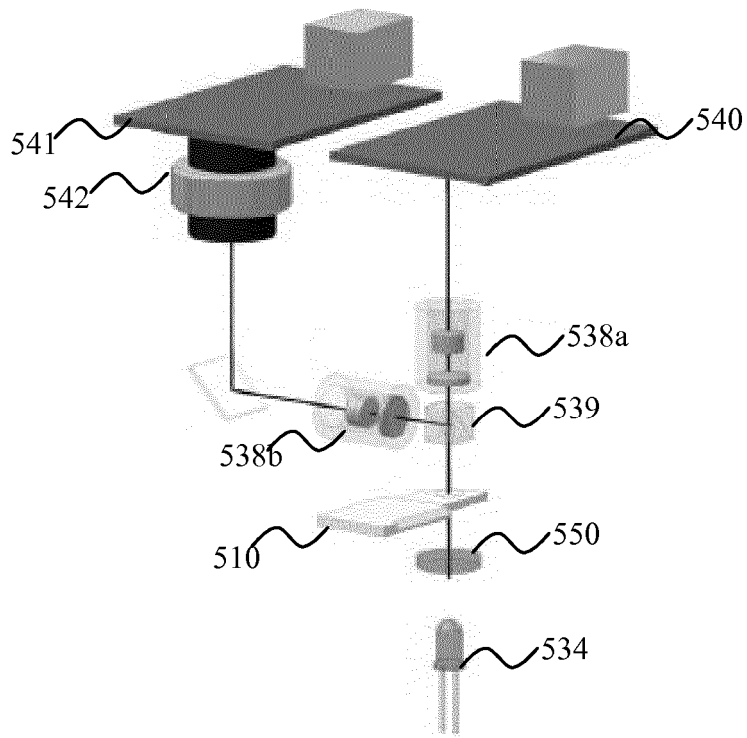


Fig. 12