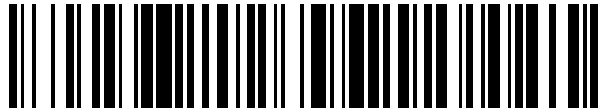


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 846**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2011 PCT/US2011/046787**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2012 WO12019118**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2011 E 11748820 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 2601523**

54 Título: **Método y aparato para análisis automáticos de muestras de sangre completa a partir de imágenes microscópicas**

30 Prioridad:

05.08.2010 US 371020 P

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

25.07.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HERZOG, DAVID;
WANG, ZHIZHOU;
WARDLAW, STEPHEN y
XIE, MIN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 676 846 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método y aparato para análisis automáticos de muestras de sangre completa a partir de imágenes microscópicas

5 Antecedentes de la invención

1. Campo técnico

10 La presente invención se refiere, en general, a métodos y a aparatos para realizar análisis en muestras de sangre completa a partir de imágenes microscópicas y, en particular, a una versión automática de los mismos.

2. Información de antecedentes

15 Los diagnósticos médicos incluyen con frecuencia análisis de una muestra de sangre completa de un paciente. Uno de los diagnósticos más conocidos es un recuento sanguíneo completo (denominado "RSC"), que es un conjunto de ensayos que pueden incluir, además de la enumeración de los componentes celulares, medidas de glóbulos rojos, recuentos de reticulocitos y un recuento diferencial de leucocitos ("RDL"; en ocasiones denominado "diferencial de glóbulos blancos"), que es la identificación y enumeración de los tipos de glóbulos blancos (*WBC*, *white blood cells*) presentes en la muestra sanguínea.

20 Históricamente, los aspectos diferenciales del RSC se han realizado usando métodos distintos de los usados para la enumeración. Por ejemplo, históricamente, la parte de RDL de un RSC, se ha realizado extendiendo una cantidad pequeña de sangre sin diluir en un portaobjetos, tiñendo la extensión fija, seca, y examinando la extensión en un microscopio. Pueden obtenerse resultados razonables de dicha extensión, pero la precisión y fiabilidad de los datos
25 dependen en gran medida de la experiencia y la técnica del auxiliar de laboratorio. Las extensiones de sangre son problemáticas por varias razones; por ejemplo, las células deben estar muertas y fijadas, proceso que impide muchos tipos de tinciones supravitales y análisis cuyos resultados dependen de células vivas, y las extensiones de sangre son laboriosas, de precio prohibitivo y requieren mucho tiempo. Por al menos estas razones, las extensiones de sangre no se prefieren para aplicaciones comerciales.

30 Katz desvela "Image analysis and supervised learning in the automated differentiation of white blood cells from microscope images"; trabajo de fin de máster, 2000, págs. I-VI, 1-67, XP002663452.

35 El documento WO 99/45384 desvela la determinación del diferencial de glóbulos blancos y recuentos de reticulocitos.

El documento WO 99/45385 desvela aparatos para analizar muestras sustancialmente no diluidas de líquidos biológicos.

40 El documento US 2006/024756 desvela métodos y algoritmos para la enumeración celular en un citómetro de bajo coste.

45 Kovalev *et al.* desvelan "Robust recognition of white blood cell images" en Proceedings of the 13th International Conference on Pattern Recognition, vol. 4, 1996, págs. 371-375.

Sabino *et al.* desvelan "A texture approach to leukocyte recognition" en Real-Time Imaging, vol. 10, n.º 4, 1 de agosto de 2004, págs. 205—216.

50 Sinha y Ramakrishnan desvelan "Blood cell segmentation using an EM algorithm" en Proceedings of the third Indian conference on computer vision, graphics and image processing, 16 de diciembre de 2002, 18 de diciembre de 2002.

55 Los intentos de automatizar los análisis de muestras de sangre completa han conseguido cierto éxito, pero típicamente tienen varias desventajas. Por ejemplo, pueden usarse instrumentos de impedancia eléctrica o citometría de flujo óptica para realizar un RDL. La citometría de flujo implica pasar una muestra de sangre diluida a través de un vaso pequeño en el que sensores de impedancia eléctrica u ópticos, pueden evaluar las células constituyentes a medida que pasan en serie a través del vaso. Estos instrumentos requieren típicamente equipamiento de manipulación de líquidos y requieren que la muestra esté diluida.

60 Se necesita un aparato y un método para realizar análisis automáticos en una muestra de sangre completa, incluyendo un RDL, que puedan superar las limitaciones de la técnica anterior, incluyendo el tiempo requerido para realizar el análisis, el nivel de habilidad del operador necesaria para realizar el análisis, y uno que pueda proporcionar mayor versatilidad que métodos y aparatos de la técnica anterior conocidos.

Sumario de la invención

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para identificar al menos un tipo de glóbulo blanco (WBC) en una muestra de sangre completa de acuerdo con la reivindicación 1.

Estos y otros objetivos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a la luz de la descripción detallada de la invención proporcionada posteriormente y como se ilustra en los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

Los principios de la invención se clarifican adicionalmente por referencia a las siguientes figuras, donde:

La FIG. 1 es un diagrama en bloques del método de la presente invención.

La FIG. 2 es una vista en sección esquemática de una cámara.

La FIG. 3 es una vista superior esquemática de un cartucho de muestra de líquido biológico, del tipo que puede incluir una cámara tal como la mostrada en la FIG. 2.

La FIG. 4 es una vista esquemática de un dispositivo de análisis operable para realizar un análisis en una muestra dispuesta en una cámara.

Las FIGS. 5A-5D son imágenes compuestas de un linfocito (5A), un neutrófilo (5B), un eosinófilo (5C) y un monocito (5D).

Las FIGS. 6A-6D son imágenes de luz roja que fluoresce desde un linfocito (6A), un neutrófilo (6B), un eosinófilo (6C) y un monocito (6D).

Las FIGS. 7A-7D son imágenes de luz verde que fluoresce desde un linfocito (7A), un neutrófilo (7B), un eosinófilo (7C) y un monocito (7D).

Las FIGS. 8A-8D son imágenes de densidad óptica a una longitud de onda de luz azul con el límite celular marcado por curvas rojas para un linfocito (8A), un neutrófilo (8B), un eosinófilo (8C) y un monocito (8D).

Las FIGS. 9A-9D son imágenes de células en las que píxeles contiguos que representan fluorescencia de luz roja y verde por encima de una intensidad predeterminada están enmascarados para un linfocito (9A), un neutrófilo (9B), un eosinófilo (9C) y un monocito (9D).

Las FIGS. 10A-10D son imágenes de células en las que píxeles contiguos que representan fluorescencia de luz verde por encima de una intensidad predeterminada están enmascarados para un linfocito (10A), un neutrófilo (10B), un eosinófilo (10C) y un monocito (10D).

Las FIGS. 11A-11D son imágenes que incluyen uno o más grupos de píxeles contiguos que representan una intensidad máxima regional en un canal verde fluorescente para un linfocito (11A), un neutrófilo (11B), un eosinófilo (11C) y un monocito (11D).

Las FIGS. 12A-12D son imágenes de células en las que píxeles contiguos que tienen un valor de DO azul por encima de un umbral predeterminado están enmascarados para un linfocito (12A), un neutrófilo (12B), un eosinófilo (12C) y un monocito (12D).

La FIG. 13 es un gráfico que representa datos empíricos (en forma de una función de densidad de probabilidad - fdp) recogidos de un conjunto de entrenamiento de imágenes de muestras para cada uno de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos, frente a un número de lóbulos. La expresión "función de densidad de probabilidad" describe la probabilidad de que una característica tenga un valor particular. Para características con valores discretos como el número de lóbulos, la fdp es igual que la frecuencia de que una característica tenga un valor particular. Por ejemplo, la FIG. 13 muestra que aproximadamente el 83 % de los linfocitos en una población tienen solamente un lóbulo, aproximadamente el 15 % de los linfocitos tienen dos lóbulos. Obsérvese que este número de lóbulos se calcula a partir de las imágenes de muestras y por lo tanto pueden tener un valor diferente de los constituyentes debido a la imperfección y limitación de imágenes del algoritmo analizador de imágenes. Todas las características calculadas para las imágenes son aproximaciones de sus correspondientes biológicas y es inherente algún grado de imprecisión. Sin embargo, con la presente invención estas imprecisiones inherentes pueden reducirse en gran medida utilizando múltiples características juntas durante el análisis (por ejemplo, un RDL), dando como resultado de este modo un análisis que tiene un alto grado de precisión.

La FIG. 14 es un gráfico que representa datos empíricos (en forma de una función de densidad de probabilidad - fdp) recogidos de un conjunto de entrenamiento para cada uno de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos, frente al área celular determinada para cada uno de los WBC anteriormente mencionados.

La FIG. 15 es una imagen que representa las áreas de DO azul alta en una célula.

La FIG. 16 es un gráfico que representa datos empíricos (en forma de una fdp) recogidos de un conjunto de entrenamiento para cada uno de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos, frente a la relación de gránulos grandes para cada uno de los WBC anteriormente mencionados.

La FIG. 17 es un gráfico que representa datos empíricos (en forma de una fdp) recogidos de un conjunto de entrenamiento para cada uno de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos, frente a la relación de núcleo para cada uno de los WBC anteriormente mencionados.

La FIG. 18 es un gráfico que representa datos empíricos (en forma de una fdp) recogidos de un conjunto de entrenamiento para cada uno de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos, frente a la relación de rojo-verde para cada uno de los WBC anteriormente mencionados.

La FIG. 19 es una imagen que representa los píxeles asociados con el núcleo de una célula enmascarado, con un círculo aplicado a la imagen para aproximar el área enmascarada.

La FIG. 20 es una versión de la imagen mostrada en la FIG. 19, que destaca solamente los píxeles en el límite del área enmascarada (es decir, en el límite del núcleo), incluyendo un centroide y algunos segmentos de líneas de posicionamiento ilustrativas que se extienden entre el centroide y el píxel del límite relevante.

La FIG. 21 es un gráfico que representa datos empíricos (en forma de una fdp) recogidos de un conjunto de entrenamiento para cada uno de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos, frente a la forma del núcleo para cada uno de los WBC anteriormente mencionados.

La FIG. 22 es un gráfico que representa datos empíricos (en forma de una fdp) recogidos de un conjunto de entrenamiento para cada uno de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos, frente a la forma de la célula para cada uno de los WBC anteriormente mencionados.

La FIG. 23 es un gráfico que representa datos empíricos (en forma de una fdp) recogidos de un conjunto de entrenamiento para cada uno de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos, frente a la absorción celular promedio a 413 nm para cada uno de los WBC anteriormente mencionados.

La FIG. 24 es un gráfico que representa datos empíricos (en forma de una fdp) recogidos de un conjunto de entrenamiento para cada uno de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos, frente a la textura del núcleo para cada uno de los WBC anteriormente mencionados.

Las FIGS. 25A y 25B son imágenes que ilustran las diferencias entre la intensidad de un grupo de píxeles dispuestos en una parte interna de una célula y la intensidad de un grupo de píxeles dispuestos en una parte externa de una célula, para las imágenes fluorescentes tanto rojas como verdes. La FIG. 25B contiene imágenes similares a las de la FIG. 25A, incluyendo líneas envolventes para facilitar la identificación de las partes internas y externas.

La FIG. 26 es un gráfico que representa datos empíricos (en forma de una fdp) recogidos de un conjunto de entrenamiento para cada uno de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos, frente al vacío del núcleo para cada uno de los WBC anteriormente mencionados.

La FIG. 27 es un gráfico que representa datos empíricos (en forma de una fdp) recogidos de un conjunto de entrenamiento para cada uno de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos, frente a la textura del citoplasma para cada uno de los WBC anteriormente mencionados.

La FIG. 28 es un gráfico que representa datos empíricos (en forma de una función de densidad de probabilidad - fdp) recogidos de un conjunto de entrenamiento para cada uno de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos, frente al vacío del citoplasma para cada uno de los WBC anteriormente mencionados.

La FIG. 29 es un gráfico que representa datos empíricos (en forma de una fdp) recogidos de un conjunto de entrenamiento para cada uno de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos, frente a la textura de absorción celular a 413 nm para cada uno de los WBC anteriormente mencionados.

La FIG. 30 es una tabla de tipos de WBC y características asociadas con el tipo de WBC particular.

La FIG. 31 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de modelo aprendido de la presente invención.

La FIG. 32 es un grupo de doce imágenes de linfocitos ilustrativas de un conjunto de entrenamiento.

La FIG. 33 es un grupo de doce imágenes de monocitos ilustrativas de un conjunto de entrenamiento.

La FIG. 34 es un grupo de doce imágenes de eosinófilos ilustrativas de un conjunto de entrenamiento.

La FIG. 35 es un grupo de doce imágenes de neutrófilos ilustrativas de un conjunto de entrenamiento.

Descripción detallada de la invención

En referencia ahora a la FIG. 1, se describen a continuación en mayor detalle métodos y un aparato para identificar constituyentes en una muestra de líquidos biológicos que residen en reposo en una cámara de análisis. Normalmente, se añade al menos un colorante a la muestra para facilitar la diferenciación de un constituyente con respecto a otro dentro de la muestra. Se capturan imágenes de la muestra que reside en reposo en la cámara y se localizan constituyentes en la imagen de la muestra. Al menos algunos de los constituyentes localizados en la imagen se analizan para determinar la presencia de una o más características (por ejemplo, para determinar la medida en que un constituyente posee una característica particular) de cada constituyente particular analizado. Cada característica puede evaluarse de forma cuantitativa a partir de la imagen. Se determina al menos un tipo de constituyente a partir de los constituyentes localizados usando las características.

Los métodos desvelados tienen utilidad particular cuando se aplican para realizar un recuento diferencial de leucocitos ("RDL") en una muestra de sangre completa, de acuerdo con la invención. Como se ha indicado anteriormente, un RDL es un análisis en el que los diferentes tipos de WBC se identifican y enumeran. Los resultados pueden expresarse con respecto a los porcentajes relativos de los tipos de WBC identificados. La presente invención se usa para distinguir constituyentes (es decir, WBC) tales como monocitos, eosinófilos, neutrófilos y linfocitos en una muestra de sangre. Para ilustrar la utilidad de la presente invención, la invención se describirá con respecto a una aplicación de RDL para identificar monocitos, eosinófilos, neutrófilos y linfocitos.

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención es operativa para realizar un análisis en una muestra de sangre completa que reside en reposo en una cámara, incluyendo dicha cámara al menos un panel transparente. La presente invención no está limitada al uso con ninguna realización de cámara particular. Se describen ejemplos de cámaras aceptables en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 2007/0243117 y la solicitud

provisional de patente de los Estados Unidos N.º 61/287.955 (denominada en lo sucesivo en el presente documento "solicitud 955").

Se muestra un ejemplo de un tipo de cámara aceptable en las FIGS. 2 y 3. La cámara 50 está formada por un primer miembro plano 52, un segundo miembro plano 54 y al menos tres separadores 56 dispuestos entre los miembros planos 52, 54. Al menos uno de los miembros planos 52, 54 es transparente. Los separadores 56, que separan los miembros planos 52, 54 para formar la cámara 50, ayudan a determinar la altura 58 de la cámara 50. Al menos uno de los miembros planos 52, 54 o los separadores 56 es suficientemente flexible para permitir que la altura de cámara media 58 entre los miembros se aproxime estrechamente a la altura media de los separadores 56.

La cámara 50 anteriormente descrita puede implementarse en una diversidad de realizaciones diferentes. La "solicitud 955" describe una realización en la que la cámara 50 está dispuesta en un cartucho de recogida y análisis de muestras 60 (véase FIG. 3). El cartucho 60 está adaptado para su uso con un dispositivo de análisis automático 62 (mostrado esquemáticamente en la FIG. 4) que tiene hardware de captura de imágenes y un procesador (por ejemplo, analizador programable) para controlar, procesar y analizar imágenes de la muestra.

En referencia a la FIG. 4, un dispositivo de análisis 62 operativo para usar con la cámara anteriormente descrita incluye típicamente una lente de objetivo 64, un dispositivo 66 para manipular y sujetar el cartucho (por ejemplo, una plataforma motorizada), un iluminador de muestras 68, un disector de imagen 70 y un analizador programable 72. Uno o ambos de la lente de objetivo 64 y el dispositivo 66 para sujetar el dispositivo son móviles uno con respecto al otro para cambiar una posición focal relativa del dispositivo en relación con la cámara y la muestra dispuesta en la misma.

El iluminador de muestras 68 ilumina la muestra usando luz a longitudes de onda predeterminadas. Por ejemplo, el iluminador de muestras puede incluir una fuente de luz de epifluorescencia 68A y una fuente de luz de transmisión 68B. Como se explicará posteriormente, colorantes tales como naranja de acridina (también denominado "naranja básico 15" o "AGO") y naranja de astrazon (también denominado "AO" o naranja básico 21) emiten luz a longitudes de onda particulares cuando se mezcla con sangre completa y se someten a una longitud de onda de excitación de la fuente de luz epifluorescente, fuente que produce típicamente luz en el intervalo de aproximadamente 450-490 nm. Una longitud de onda de excitación a aproximadamente 470 nm es particularmente útil. La fuente de luz de transmisión es operativa para producir luz a longitudes de onda asociadas con una o más de luz roja, verde y azul. La luz roja se produce típicamente en el intervalo de aproximadamente 600-700 nm, prefiriéndose la luz roja a aproximadamente 660 nm. La luz verde se produce típicamente en el intervalo de 515-570 nm, prefiriéndose la luz verde a aproximadamente 540 nm. Como se analizará posteriormente, la luz azul está típicamente en el intervalo de 405-425 nm, prefiriéndose la luz azul a aproximadamente 413 nm. Se captura luz transmitida a través de la muestra, o que fluoresce desde la muestra, usando el disector de imagen, y se envía una señal representativa de la luz capturada al analizador programable, donde se procesa en una imagen. La imagen se produce de una manera que permite determinar la transmitancia de luz o intensidad de fluorescencia capturada en la imagen para determinar por unidades; por ejemplo, siendo "por unidades" una unidad incremental de la que puede diseccionarse la imagen de la muestra, tal como un píxel.

Un ejemplo de un disector de imagen aceptable 70 es un sensor de imagen de tipo dispositivo de carga acoplada (CCD) que convierte luz que pasa a través de (o desde) la muestra a una imagen en formato de datos electrónicos. Los sensores de imágenes de tipo semiconductores de óxido metálico complementarios ("SOMC") son otro ejemplo de un sensor de imágenes que puede usarse. Las señales del disector de imágenes proporcionan información para cada píxel de la imagen, información que incluye, o puede derivarse para que incluya, intensidad, longitud de onda y densidad óptica. Se asigna a los valores de intensidad una escala arbitraria de, por ejemplo, 0 unidades a 4095 unidades ("UVI"). La densidad óptica ("DO") es una medida de la cantidad de luz absorbida en relación con la cantidad de luz transmitida a través de un medio; por ejemplo, cuanto mayor sea el valor de "DO", mayor será la cantidad de luz absorbida durante la transmisión. La DO puede describirse de forma cuantitativa en unidades de densidad óptica ("DO") o fracciones de las mismas; por ejemplo, una miliDO es un 1/1000 de una DO. Una unidad de "DO" reduce la intensidad de luz en 90 %. La "DO" o "miliDO" como un valor cuantitativo puede usarse para imágenes adquiridas u obtenidas por luz de transmisión, por ejemplo, la luz de transmisión azul ilustrada en las FIGS. 8A-8D. La información del disector de imagen se separa en múltiples canales. La información del disector de imagen se describirá en lo sucesivo en el presente documento como separado en tres canales, número que proporciona utilidad particular para determinar un RDL de cuatro partes. La presente invención, sin embargo, no está limitada a una realización de tres canales. Un primero de los tres canales se dirige a información que se refiere a luz emitida de la muestra a una primera longitud de onda (por ejemplo, 540 nm, que aparece verde). Un segundo canal se dirige a información que se refiere a luz emitida de la muestra a una segunda longitud de onda (por ejemplo, 660 nm, que aparece roja). Un tercer canal se dirige a información que se refiere a luz que pasa a través de la muestra a una tercera longitud de onda (por ejemplo, 413 nm, que se usa para determinar una densidad óptica azul - "DO"). Estos valores de longitud de onda y el número de canales tienen utilidad particular cuando se realiza un RDL en una muestra sanguínea completa. La presente invención no está limitada a estas longitudes de onda o número de canales particulares. Pueden implementarse canales adicionales para reunir información a diferentes longitudes de onda y/o valores de transmisión. Esa información, a su vez, puede usarse para evaluar constituyentes adicionales en la muestra y/o para aumentar la precisión del análisis. Por ejemplo, en aplicaciones en las que es deseable

5 diferenciar adicionalmente basófilos en la muestra, puede añadirse un cuarto y un quinto canal. El cuarto canal puede dirigirse a información que se refiere a luz que pasa a través de la muestra a una cuarta longitud de onda (por ejemplo, 540 nm), que se usa para determinar una DO verde, y el quinto canal puede dirigirse a información que se refiere a luz que pasa a través de la muestra a una quinta longitud de onda (por ejemplo, 660 nm), que se usa para determinar una DO roja. Estos valores de DO, a su vez, pueden usarse para identificar basófilos.

10 El analizador programable incluye una unidad de procesamiento central (CPU) y está en comunicación con el dispositivo que sujeta y manipula el cartucho, iluminador de muestras y disector de imagen. El analizador programable está adaptado (por ejemplo, programado) para enviar y recibir señales de uno o más del dispositivo que sujeta y manipula el cartucho, el iluminador de muestras y un disector de imagen. Por ejemplo, el analizador está adaptado para: 1) enviar y recibir señales del dispositivo que sujeta y manipula el cartucho para situar el cartucho y la cámara en relación con uno o más de óptica, iluminador y disector de imagen; 2) enviar señales al iluminador de muestras para producir luz a longitudes de onda definidas (o como alternativa a múltiples longitudes de onda); y 3) enviar y recibir señales del disector de imagen para capturar luz durante periodos de tiempo definidos. Debería observarse que la funcionalidad del analizador programable puede implementarse usando hardware, software, firmware o una combinación de los mismos. Un experto en la materia sería capaz de programar la unidad de procesamiento para realizar la funcionalidad descrita en el presente documento sin experimentación indebida.

20 El analizador programable se adapta adicionalmente para procesar las señales recibidas del disector de imagen según uno o más algoritmos predeterminados. Los detalles de un algoritmo particular dependerán del análisis correspondiente. Como se ha indicado anteriormente, la presente invención implica realizar un RDL en una muestra de sangre completa y para ilustrar esa utilidad se describe en el presente documento que la invención realiza un RDL.

25 Para realizar el RDL, el algoritmo utiliza un conjunto de características distintivas, siendo cada una de dichas características distinguibles de las otras características y siendo cada una de las cuales cuantitativamente determinables a partir de una imagen de la muestra. Cada WBC puede caracterizarse por la presencia o ausencia de determinadas características distintivas y/o por información cuantitativa asociada con determinadas características. Para fines de proporcionar una divulgación habilitante, la presente invención se describe en el presente documento con respecto a un conjunto ejemplar de características distintivas que pueden usarse para identificar y distinguir selectivamente WBC. Este conjunto no es inclusivo de todas las posibles características y por lo tanto la presente invención no está limitada a este conjunto particular.

35 Para un análisis de WBC, un conjunto ejemplar de características distintivas incluye las tituladas: célula, núcleo, número de lóbulos, área celular, área del núcleo, relación de gránulos grandes, relación de núcleo, relación rojo-verde, forma del núcleo, forma de la célula, brillo del núcleo, brillo del citoplasma, absorción celular promedio a una longitud de onda dada, textura del núcleo, textura del citoplasma, textura de absorción celular a una longitud de onda dada, vacío del núcleo y vacío del citoplasma; cada uno de los cuales se describe posteriormente.

40 En algunos casos, determinadas características proporcionan directamente información acerca de una célula particular (por ejemplo, forma del núcleo). En otros casos, una característica (por ejemplo, área celular) puede usarse para proporcionar indirectamente información acerca de una célula particular (por ejemplo, relación de área del núcleo con respecto a área celular – denominada anteriormente "relación de núcleo", etc.).

45 Las características distintivas se basan en características cuantificables, que son intensidad de la luz, color de la luz, DO, área y forma geométrica. Como se ha indicado anteriormente, los colores se crean mediante uno o más colorantes mezclados con la muestra, que, tras su excitación, producen emisión de luz fluorescente a longitudes de onda particulares asociadas con colores particulares. Un ejemplo de un colorante aceptable que puede usarse cuando se realiza un RDL en una muestra de sangre completa es naranja de acridina ("ACO"). ACO es un colorante fluorescente que, cuando se mezcla con una muestra de sangre completa, tiñe selectivamente constituyentes dentro de la muestra; por ejemplo, glóbulos blancos, plaquetas, reticulocitos y glóbulos rojos nucleados. Con respecto a los WBC, el ACO permea a través del WBC respectivo y tiñe su ADN y ARN. El color o los colores emitidos por el colorante en el WBC dependen de varios factores, incluyendo: la cantidad de ARN y ADN en el colorante, la concentración del colorante en el constituyente y el pH del constituyente. La presente invención no está limitada al uso de ACO y otros colorantes (por ejemplo, naranja de astrazon) pueden usarse en lugar de ACO o en combinación con ACO. Usando ACO y glóbulos blancos como un ejemplo, si la muestra se somete a una luz de excitación a o aproximadamente a una longitud de onda de 470 nm, el ACO unido a materiales (por ejemplo, ADN) en el núcleo de un glóbulo blanco emitirá luz a aproximadamente 540 nm (que aparece verde) y el ACO unido a materiales (por ejemplo, ARN) en el citoplasma de un glóbulo blanco emitirá luz a aproximadamente 660 nm (que aparece roja).

60 Como se ha indicado anteriormente, los valores de DO en la muestra dependen de la absortividad de luz a longitudes de onda predeterminadas por materiales que aparecen de forma natural en la célula (por ejemplo, hemoglobina) y/o pueden depender del colorante absorbido (o no absorbido) por los constituyentes en la muestra.

65 La identificación de grupos particulares de píxeles en una o más longitudes de onda definidas puede realizarse usando una diversidad de técnicas diferentes. Por ejemplo, pueden usarse técnicas de segmentación para producir

una imagen enmascarada que representa solamente los píxeles en la imagen que cumplen los criterios (por ejemplo, intensidad y color). Para los análisis que obtienen información solamente de las partes de luz verde (por ejemplo, los núcleos) o las partes de luz roja (por ejemplo, citoplasma) de la imagen, o ambas, la imagen de muestra puede enmascararse para producir una imagen parcial que representa solamente los píxeles que muestran verde, o rojo, o ambos, y también pueden distinguirse por un umbral de intensidad predeterminada. La presente invención no está limitada a ninguna técnica de segmentación particular y puede elegirse una técnica específica a la vista de la aplicación correspondiente. Por ejemplo, puede usarse una técnica de segmentación dura en la que se asigna un píxel a pertenencia o no a un objeto. Pueden implementarse técnicas de segmentación "duras" usando determinación del umbral, crecimiento de regiones o rutinas de tipo divisorio. Como alternativa, pueden utilizarse técnicas de segmentación blandas; por ejemplo, una segmentación "difusa", en la que a cada píxel se asigna un valor en el intervalo de 0 a 1, valor que describe la probabilidad de que el píxel particular pertenezca al objeto. La descripción de cada una de las características distintivas posteriores proporcionará ejemplos claros de cómo datos cuantitativos tales como los asociados con la longitud de onda e intensidad pueden proporcionar una base para distinguir un WBC de otro. La presente invención tampoco está limitada al uso de una técnica de segmentación y puede usar otras técnicas que seleccionan (es decir, "eligen") píxeles o distinguen de otro modo píxeles que tienen atributos particulares.

El término "célula" se refiere a una característica distintiva que incluye un grupo de píxeles sustancialmente contiguos en la imagen que representan emisión de luz verde y/o emisión de luz roja a un alto nivel de intensidad (es decir, a o por encima de un umbral de IVU) en relación con la intensidad de la imagen completa. Por lo tanto, los píxeles que tienen el color predeterminado (por ejemplo, rojo y verde) a o por encima de un nivel de intensidad predefinido se identifican de forma cuantitativa. Las FIGS. 5A-5D, por ejemplo, ilustran una región que contiene los WBC en la imagen de la muestra de ensayo que muestra luz verde y luz roja. Las FIGS. 9A-9D ilustran una región a o por encima del nivel de intensidad umbral; es decir, un grupo de píxeles sustancialmente contiguos en las imágenes anteriores que definen una célula.

El término "célula" se refiere a una característica distintiva que incluye un grupo de píxeles contiguos en la imagen que representan emisión de luz verde a un alto nivel de intensidad en relación con el nivel de intensidad de la imagen completa. Como se ha indicado anteriormente, pueden usarse técnicas de segmentación para producir una imagen enmascarada que representa solamente los píxeles en la imagen que cumplen los criterios de valores cuantitativos de emisión verde a o por encima del valor umbral de intensidad predeterminado. Cada grupo de píxeles contiguos en la imagen que representan emisión de luz verde a o por encima del umbral de IVU se caracteriza por lo tanto como una característica de "núcleo". Como se ha indicado anteriormente, Las FIGS. 10A-10D ilustran una imagen enmascarada que muestra una característica de núcleo.

El término "lóbulo" se refiere a una característica distintiva que incluye un grupo de píxeles contiguos en la imagen que son una intensidad máxima regional en el canal verde fluorescente (por ejemplo, 540 nm). La expresión "intensidad máxima regional" se refiere a un grupo de píxeles que tienen sustancialmente el mismo valor de intensidad (es decir, un valor cuantificable), valor que es notablemente mayor que los píxeles circundantes. La FIG. 11A ilustra un WBC que tiene un único lóbulo, identificable por el grupo individual de píxeles que muestra intensidad de emisión máxima regional. Las FIGS. 11C y 11D ilustran un WBC que tiene un par de lóbulos. La FIG. 11B ilustra un WBC que tiene tres lóbulos. La FIG. 13 ilustra gráficamente las diferencias en el número de lóbulos (es decir, un valor cuantificable) asociado con linfocitos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos. El número de lóbulos asociado con neutrófilos, por ejemplo, hace del número de lóbulos una característica distintiva que puede usarse para distinguir neutrófilos.

Las FIGS. 13, 14, 16-18, 21-24 y 26-29 son gráficos que representan datos empíricos reunidos de conjuntos de entrenamiento de imágenes de WBC. Los gráficos incluyen un eje vertical con valores de función de densidad de probabilidad ("fdp") frente a un eje horizontal con datos cuantificables relevantes para la característica distintiva particular. Estos gráficos ilustran bien la relación entre los WBC y la característica distintiva respectiva, pero la presente invención no está limitada a estos tipos de gráficos particulares. Por ejemplo, las funciones de densidad de probabilidad son una representación estadística de los datos empíricos de los conjuntos de entrenamiento. Pueden usarse como alternativa otras representaciones estadísticas.

El "área celular" es una característica distintiva que se refiere al área cuantificable en la imagen que se identifica como una célula particular. Debido a que cada píxel representa un área conocida de la imagen, el área de una célula dada u otro constituyente o elemento puede determinarse a partir del número de píxeles. La presente invención no está limitada, sin embargo, a este método de determinación de un valor de área celular. La FIG. 14 ilustra gráficamente las diferencias en el área celular asociada con linfocitos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos. El área celular asociada con linfocitos, por ejemplo, hace del área celular una característica distintiva que puede usarse para distinguir linfocitos.

El "área del núcleo" es una característica distintiva que se refiere al área en la imagen que se identifica como un núcleo particular. El área del núcleo puede, por ejemplo, determinarse de la manera descrita anteriormente para determinar el área celular. El valor numérico del área del núcleo determinada proporciona el valor cuantificable del área del núcleo.

La "relación de gránulos grandes" es una característica distintiva que es una relación de la suma de áreas de DO azules altas en una célula, sobre el área celular. La expresión "área de DO azul alta" – también denominada "gránulo grande" – se refiere a un grupo de píxeles contiguos en la imagen que tienen un valor de DO azul que está por encima de un umbral predeterminado (es decir, un valor cuantificable). El valor de DO azul se crea transmitiendo luz azul a una longitud de onda de aproximadamente 413 nm a través de la muestra. La luz azul transmitida que se usa para determinar el valor de DO azul, puede estar en el intervalo de aproximadamente 405-425 nm. La luz azul transmitida a aproximadamente 413 nm es ventajosa porque la hemoglobina (HGB) tiene su absorción máxima a o a aproximadamente 413 nm. Cada gránulo grande aparece como un grupo de píxeles brillantes en la imagen de DO y cada uno puede detectarse por técnicas de segmentación en una imagen de DO, enmascarando todos los píxeles excepto los que tienen una DO por encima de un umbral predeterminado (por ejemplo, > 300 miliDO). La FIG. 15 ilustra un ejemplo de áreas de DO azul alta en una célula (es decir, gránulos grandes en un eosinófilo). Las FIGS. 12A-12D ilustran además los píxeles con DO azul alta en diferentes tipos de WBC. La investigación de los inventores hasta la fecha indica que en relación con las células consideradas en el RDL, solamente los eosinófilos tienen regiones significativas de la DO azul de alta intensidad en la célula. La FIG. 16 ilustra gráficamente las diferencias en la relación de gránulos grandes asociadas con linfocitos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos. Como se puede observar en la FIG. 16, la relación de gránulos grandes es una característica distintiva cuantificable que puede usarse para distinguir fácilmente eosinófilos de los otros constituyentes en el RDL.

La "relación de núcleo" es una característica distintiva que es una relación de área del núcleo sobre el área celular, como esas características se han definido anteriormente. La FIG. 17 ilustra gráficamente las diferencias en la relación de núcleo (es decir, el valor cuantificable) asociadas con linfocitos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos. La relación de núcleo asociada con linfocitos, por ejemplo, hace de la relación de núcleo una característica distintiva que puede usarse para distinguir linfocitos.

La "relación rojo-verde" es una característica distintiva que es una relación del valor de intensidad medio de esos píxeles (o área) en una célula identificada que representa luz roja fluorescente, sobre el valor de intensidad medio de esos píxeles (o área) en la célula identificada que representa luz verde fluorescente (es decir, los valores medios de la luz respectiva son valores cuantificables). Las FIGS. 6A y 7A (o 6B y 7B, o 6C y 7C, o 6D y 7D) ilustran el rojo fluorescente y verde fluorescente combinados de un tipo de célula particular. La imagen mostrada en la FIG. 6A (o 6B, 6C o 6D) es una imagen parcial que representa solamente el componente de la luz roja fluorescente y la imagen mostrada en la FIG. 7A (o 7B, 7C o 7D) es una imagen parcial de la misma célula que representa solamente el componente de la luz verde fluorescente. La relación rojo-verde es la relación de los valores de intensidad media de los colores respectivos. La FIG. 18 ilustra gráficamente las diferencias en la relación rojo-verde asociadas con linfocitos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos. La relación rojo-verde asociada con linfocitos, por ejemplo, hace de la relación rojo-verde una característica distintiva que puede usarse para distinguir linfocitos.

La "forma de núcleo" es una característica distintiva que describe la circularidad de un núcleo. Puede usarse una diversidad de técnicas geométricas para determinar la circularidad de un núcleo en la imagen de la muestra de ensayo, núcleo que aparece como un cuerpo bidimensional en la imagen. Por ejemplo, con respecto a una célula individual, puede usarse una técnica de segmentación para identificar los píxeles que se asocian con el núcleo de la célula (es decir, los píxeles que se muestran verdes). Una vez que se han identificado píxeles de núcleos, se identifican los píxeles localizados en el límite del núcleo. El centroide del núcleo (es decir, el centroide del área abarcada por el núcleo) puede definirse promediando la posición de todos los píxeles del límite. Un círculo que aproxima el cuerpo definido por píxeles y que se centran en el centroide, se aplica al cuerpo de píxeles. La FIG. 19 ilustra un ejemplo de un núcleo definido por píxeles en una imagen enmascarada y un círculo aplicado al cuerpo de píxeles. La FIG. 20 ilustra los píxeles del límite correspondientes. Las localizaciones de los píxeles del límite se usan de forma colectiva para determinar la circularidad del núcleo; por ejemplo, el valor de desviación de los píxeles del límite del círculo de aproximación (es decir, un valor cuantificable). Por ejemplo, la localización de cada píxel del límite puede describirse en términos normalizados dividiendo la diferencia del radio del píxel del límite (r_{BP}) menos el radio del círculo (r_c), por el radio del círculo:

$$rNormalizada = \frac{rDif}{r_c} = \frac{r_{BP} - r_c}{r_c}$$

Si el píxel del límite se localiza en el círculo, el numerador ($r_{BP} - r_c$) es igual a cero y la desviación es cero. La desviación ($rNormalizada$) de la circularidad puede usarse después como una medida de la circularidad de la forma; por ejemplo, la circularidad del núcleo. La FIG. 21 representa un gráfico que compara la circularidad del núcleo para una población estadísticamente significativa de linfocitos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos. El gráfico muestra claramente que la circularidad de los núcleos en linfocitos es notablemente diferente de la circularidad de los neutrófilos, monocitos y eosinófilos, haciendo de este modo de la forma del núcleo una característica distintiva que puede usarse para distinguir linfocitos. La técnica descrita anteriormente para determinar la circularidad del núcleo es un ejemplo de una técnica aceptable y proporcionada para fines de habilitación, y la presente invención no está limitada a esta técnica particular.

La "forma de la célula" es una característica distintiva que evalúa la forma del límite de una célula; es decir, la distribución de los píxeles del límite de una célula en el plano bidimensional de la imagen. Las técnicas descritas anteriormente para determinar la circularidad del núcleo pueden usarse para determinar la forma de la célula (por ejemplo, elipse, oval, etc.) de la célula. Con respecto a la forma de la célula, las técnicas se usan preferentemente para determinar la desviación de una célula de una forma (es decir, un valor cuantificable) tal como una elipse que es una aproximación más cercana de una forma de la célula de origen natural. La presente invención no está limitada a las técnicas descritas anteriormente o al uso de una forma elíptica como una aproximación. La FIG. 22 ilustra gráficamente las diferencias en la forma de la célula asociada con linfocitos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos. La forma de la célula asociada con neutrófilos, por ejemplo, hace la forma de la célula una característica distintiva que puede usarse para distinguir neutrófilos.

El "brillo del núcleo" es una característica distintiva que cuantifica los valores de intensidad de verde fluorescente medios en un núcleo. Las FIGS. 7A-7C muestran que el núcleo de un linfocito, neutrófilo y eosinófilo tienen una mayor intensidad (es decir, aparecen más brillantes) que el núcleo de un monocito (FIG. 7D). La diferencia anteriormente mencionada en la intensidad se debe a la distribución densa relativa de cromatina dentro de los núcleos de linfocitos, neutrófilos y eosinófilos, frente a la distribución dispersa de cromatina dentro del núcleo de monocitos. En algunas realizaciones de la presente invención, el brillo del núcleo se determina en relación con un valor normalizado de los valores de intensidad de verde fluorescente medios en un núcleo. El valor normalizado ayuda a explicar las variabilidades en la muestra; por ejemplo, la tinción no uniforme en la muestra. La técnica exacta usada para normalizar los valores de intensidad pueden variar para adaptarse a la aplicación correspondiente y la presente invención no está limitada a ninguna técnica de normalización particular. Por ejemplo, en algunos casos los valores de intensidad de valores de intensidad de verde fluorescente medios en un núcleo pueden normalizarse en relación con valores de intensidad de células adyacentes, o en relación con células por toda la muestra.

El "brillo del citoplasma" es una característica distintiva que cuantifica los valores de intensidad de rojo fluorescente medios en el citoplasma. Las FIGS. 6A-6D muestran la intensidad de la emisión de rojo fluorescente de la región del citoplasma de determinadas células. La intensidad de luz roja emitida del citoplasma de un linfocito es baja en relación con la intensidad de luz roja emitida del citoplasma de un monocito. La intensidad de luz roja emitida del citoplasma de un monocito es, a su vez, baja en relación con la intensidad de luz roja emitida del citoplasma de neutrófilos y eosinófilos. Como se ha indicado anteriormente, en algunas realizaciones de la presente invención los valores de brillo se determinan en relación con un valor normalizado; por ejemplo, un valor de intensidad de rojo fluorescente medio normalizado en una célula. La técnica exacta usada para normalizar los valores de intensidad pueden variar para adaptarse a la aplicación correspondiente y la presente invención no está limitada a ninguna técnica de normalización particular.

La "absorción celular promedio a una longitud de onda dada" es una característica distintiva que cuantifica la DO promedio de una célula asociada con luz azul a una longitud de onda dada (por ejemplo, la "intensidad de DO azul media") transmitida a través de la célula. Como se ha indicado anteriormente, la luz azul transmitida puede estar en el intervalo de aproximadamente 405-425 nm y la luz azul transmitida a aproximadamente 413 nm es ventajosa porque a o aproximadamente 413 nm es donde la hemoglobina tiene absorción máxima. Para cuantificar la intensidad de DO azul media de una célula, se transmite luz azul a una longitud de onda de aproximadamente 413 nm a través de la célula respectiva. La DO asociada con la luz azul se determina píxel a píxel. Las FIGS. 9A-9D representan cada una versiones enmascaradas de las células respectivas, en las que todo está enmascarado excepto los píxeles que tienen valores de intensidad de rojo o verde fluorescente mayores que un umbral predeterminado. Se determina el valor medio de la DO (es decir, la DO asociada con la longitud de onda a 413 nm) en la parte enmascarada de la célula respectiva. Las FIGS. 8A-8D muestran imágenes de DO azul resultantes de la luz anteriormente mencionada que se transmite a través de la célula respectiva. Para facilitar la evaluación de las FIGS. 8A-8D, se dibuja una línea circundante en cada imagen que indica un límite entre la región externa y la región interna donde se determina la absorción celular promedio. La FIG. 23 ilustra gráficamente las diferencias en la absorción celular promedio a 413 nm asociadas con linfocitos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos. La absorción celular promedio a 413 nm asociada con eosinófilos, por ejemplo, hace de la absorción celular promedio a 413 nm una característica distintiva que puede usarse para distinguir eosinófilos, que también es evidente a partir de las FIGS. 8A-8D.

La "textura del núcleo" es una característica distintiva que cuantifica la "textura" de la luz verde fluorescente emitida en la región del núcleo de una célula. El término "textura" se usa para hacer referencia a la variabilidad de la luz verde fluorescente en el núcleo de una célula, típicamente píxel a píxel. Pueden usarse varias técnicas diferentes para cuantificar la textura del núcleo. Por ejemplo, la desviación típica de los valores de intensidad de verde normalizados medios por píxel puede usarse para cuantificar la textura del núcleo. Los valores de intensidad de verde fluorescente normalizados pueden determinarse identificando todos los píxeles en una célula que emite luz verde fluorescente y asignando un valor arbitrario de cero a los píxeles con la menor intensidad y un valor de uno a los píxeles de la mayor intensidad. La desviación típica de los valores de intensidad (es decir, un valor cuantificable) puede calcularse a partir de esos valores usando técnicas conocidas. La FIG. 24 ilustra gráficamente las diferencias en la textura del núcleo asociadas con linfocitos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos. La textura del núcleo asociada

con linfocitos, por ejemplo, hace de la textura del núcleo una característica distintiva que puede usarse para distinguir linfocitos.

El "vacío del núcleo" es una característica distintiva que puede usarse además de, o en lugar de, la textura del núcleo. El vacío del núcleo es una relación de la intensidad (es decir, un valor cuantificable) de un grupo de píxeles dispuestos en la parte interna de una célula frente a la intensidad (es decir, un valor cuantificable) de un grupo de píxeles dispuestos en la parte externa de la célula en la imagen verde fluorescente. La definición de lo que es la "parte externa" y lo que es la "parte interna" puede variarse para adaptarse a la aplicación correspondiente; por ejemplo, basándose en datos empíricos. Por ejemplo, la parte externa puede definirse como una banda de varios píxeles localizados en el límite de la célula; por ejemplo, una banda de tres píxeles en el límite de la célula cuando el tamaño de los píxeles es de aproximadamente 0,5 µm. La parte interna sería entonces el área en la célula distinta de la parte externa. La FIG. 25A incluye el núcleo celular en el canal verde para ilustrar las diferencias en intensidad entre la parte interna y la parte externa de un núcleo. La FIG. 25B contiene imágenes similares e incluye líneas circundantes para facilitar la identificación de las partes internas y externas. Las intensidades relativas de los píxeles de los grupos internos y externos son tales que la intensidad de los píxeles internos es típicamente cuantificablemente menor que la de los píxeles externos en algunos de los neutrófilos. Las FIGS. 25A y 25B muestran imágenes de canal verde y canal rojo, donde 25A muestra una parte oscura en el núcleo que aparece como un hueco. La FIG. 26 ilustra gráficamente las diferencias en el "vacío del núcleo" asociadas con linfocitos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos. El "vacío del núcleo" asociado con neutrófilos, por ejemplo, tiene valores mayores que otros tipos de células y o hace una característica distintiva que puede usarse para distinguir neutrófilos.

La "textura del citoplasma" es una característica distintiva que cuantifica la "textura" de la luz roja fluorescente emitida en el citoplasma de una célula. El término "textura" se usa para hacer referencia a la variabilidad de la luz roja fluorescente en el citoplasma de una célula, típicamente píxel a píxel. Pueden usarse varias técnicas diferentes para cuantificar la textura del citoplasma. Por ejemplo, la desviación típica de los valores de intensidad de rojo normalizados medios por píxel puede usarse para cuantificar la textura del citoplasma. Los valores de intensidad de rojo fluorescente normalizados pueden determinarse identificando todos los píxeles en una célula que emite luz roja fluorescente y asignando un valor arbitrario de cero a los píxeles con la menor intensidad y un valor de uno a los píxeles de la mayor intensidad. La desviación típica de los valores de intensidad puede calcularse a partir de esos valores usando técnicas conocidas. La FIG. 27 ilustra gráficamente las diferencias en la textura del citoplasma asociadas con linfocitos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos. La textura del citoplasma asociada con neutrófilos, por ejemplo, hace de la textura del núcleo una característica distintiva que puede usarse para distinguir neutrófilos.

De una manera similar a la descrita anteriormente con respecto a la textura del núcleo y el vacío del núcleo, el "vacío del citoplasma" es una característica distintiva que puede usarse además de, o en lugar de, la textura del citoplasma. El vacío del citoplasma es una relación de la intensidad (es decir, un valor cuantificable) de un grupo de píxeles dispuestos en la parte interna de un citoplasma frente a la intensidad de un grupo de píxeles dispuestos en la parte externa del citoplasma en la imagen rojo fluorescente. Las intensidades relativas de los píxeles de grupos internos y externos son tales que la intensidad de los píxeles internos es típicamente cuantificablemente menor que la de los píxeles externos en los neutrófilos y eosinófilos. La FIG. 28 ilustra gráficamente las diferencias en el "vacío del citoplasma" asociadas con linfocitos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos. El "vacío del citoplasma" asociado con neutrófilos, por ejemplo, es mayor que el asociado con linfocitos y monocitos, pero menor que el asociado con eosinófilos, haciéndolo de este modo una característica distintiva que puede usarse para distinguir neutrófilos.

La "textura de absorción celular a una longitud de onda dada" es una característica distintiva que cuantifica la textura de los valores de DO de una célula asociada con luz azul a una longitud de onda dada transmitida a través de la célula, detectándose dicha DO píxel a píxel. Como se ha indicado anteriormente, la luz azul transmitida puede estar en el intervalo de aproximadamente 405-425 nm y la luz azul transmitida a aproximadamente 413 nm es ventajosa porque a o aproximadamente 413 nm es donde la hemoglobina tiene absorción máxima. La "textura" se refiere a la variabilidad de los valores de DO en la célula. También como se ha indicado anteriormente, pueden usarse varias técnicas diferentes para cuantificar la textura; por ejemplo, la desviación típica de los valores de DO asociados con luz azul a 413 nm. La FIG. 29 ilustra gráficamente las diferencias en la textura de absorción celular a 413 nm asociadas con linfocitos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos. La textura de absorción celular a 413 nm asociada con eosinófilos, por ejemplo, hace de la textura de la absorción celular a 413 nm una característica distintiva que puede usarse para distinguir eosinófilos.

La descripción anterior de cada una de las características indica un valor cuantificable con el que esa característica de la célula puede evaluarse. La presente invención no está limitada a la forma identificada de forma específica del valor cuantificable. Por ejemplo, la relación rojo-verde se describe como una relación del valor de intensidad medio de esos píxeles (o área) en una célula identificada que representa luz roja fluorescente, sobre el valor de intensidad medio de esos píxeles (o área) en la célula identificada que representa luz verde fluorescente. Como se indica por el "o área" entre paréntesis, la relación rojo-verde podría describirse con respecto al área, o la relación de píxeles (que representan cada uno un área dentro de la imagen de muestra), alcanzando en dicha área los valores de intensidad de la luz respectiva un umbral predeterminado.

Como se ha indicado anteriormente, el analizador programable se adapta para utilizar características distintivas, tales como las descritas anteriormente, en un algoritmo para realizar el RDL. La información cuantitativa proporcionada por las características anteriormente mencionadas puede procesarse de varios modos diferentes para proporcionar la información asociada con un RDL.

En algunas realizaciones, por ejemplo, el analizador programable se adapta para incluir un clasificador basado en normas que evalúa la imagen de muestra en relación con una o más de las características y usar dicha evaluación para clasificar las células en la muestra. Como se ha indicado anteriormente, cada característica puede describirse con respecto a un valor cuantitativo. Algunas o todas las células en la imagen de muestra se evalúan con respecto a una característica; es decir, un valor cuantitativo para esa característica se determina a partir de la imagen de muestra. El valor cuantitativo determinado se evalúa después en relación con (por ejemplo, comparado con) un valor de referencia para esa característica con el fin de determinar si esa célula es o no un tipo particular de WBC. El proceso para determinar un valor cuantitativo y compararlo con un valor de referencia se sigue para cada tipo de característica en consideración (por ejemplo, dependiendo del análisis correspondiente, algunos análisis pueden no considerar todas las características). Por ejemplo, para evaluar una imagen celular particular, el clasificador puede considerar en primer lugar la característica de área celular. Si el valor de área celular determinado está por debajo de un valor de área celular predeterminado (por ejemplo, 60), la norma aplicada por el clasificador podría especificar que determinados tipos de WBC se excluyen y otros se incluyen; por ejemplo, véase FIG. 14 donde los linfocitos muestran un área por debajo de 60 en la fdp y los eosinófilos, monocitos, neutrófilos tienen cada uno un área por encima de 60. El término "excluido" se usa en el presente documento para indicar estadísticamente improbable, y el término "incluido" para indicar lo contrario, estadísticamente probable. A continuación, el clasificador basado en normas puede evaluar la imagen celular para determinar el número de lóbulos. Si el número determinado de lóbulos es igual a o mayor que un valor predeterminado (por ejemplo, dos), entonces la norma aplicada por el clasificador especificaría que determinados tipos de WBC se excluyen y otros aún se incluyen; véase FIG. 13 que muestra que la probabilidad de que una célula tenga dos o más lóbulos es mayor para monocitos y neutrófilos que para linfocitos, pero aún es sustancialmente mayor para eosinófilos). A continuación, el clasificador basado en normas puede evaluar la imagen celular para determinar un valor cuantitativo para la absorción celular promedio a una longitud de onda dada. Si el valor de absorción celular promedio determinado a la longitud de onda dada (por ejemplo, a 413 nm) es mayor que un valor umbral predeterminado (por ejemplo, aproximadamente 215), entonces la norma aplicada por el clasificador especificaría que determinados tipos de WBC se excluyen y otros aún se incluyen; por ejemplo, véase FIG. 23 que ilustra que por encima de un valor de aproximadamente 215, neutrófilos, monocitos y linfocitos pueden excluirse, y solamente pueden incluirse eosinófilos. De este modo, determinando un valor cuantitativo para cada característica en consideración, y evaluando posteriormente esos valores usando determinadas normas, el clasificador basado en normas realiza una determinación de base cuantitativa con respecto al tipo de WBC; es decir, eosinófilos.

El valor cuantitativo de cada característica distintiva para un tipo de WBC probablemente varíe, en alguna medida, en una población de muestras de un sujeto particular, y también puede variar entre sujetos. La presente invención aborda esta variabilidad, por ejemplo, utilizando una pluralidad de características para evaluar una imagen celular. Usando más de una característica para evaluar e identificar una célula, el presente método reduce el potencial de que ninguna característica particular tenga un efecto adverso en la precisión de la evaluación. La tabla proporcionada en la FIG. 30 ilustra grupos de características distintivas dominantes asociadas con tipos particulares de WBC. Estos agrupamientos de características son ejemplos de grupos que pueden usarse para distinguir significativamente un WBC de otro WBC en el RDL de cuatro partes. La variabilidad también puede abordarse ajustando selectivamente la magnitud del valor o los valores de referencia cuantitativos asociados con cada característica.

En algunas realizaciones, el analizador programable se adapta para incluir un clasificador basado en modelo aprendido. La FIG. 31 es un diagrama de flujo que ilustra un ejemplo de procesos asociados con el clasificador basado en modelo aprendido. Como se puede observar a partir del diagrama, se usan imágenes de muestras de entrenamiento para entrenar el clasificador, y el clasificador entrenado a su vez construye el modelo aprendido. Una vez que se ha desarrollado el modelo aprendido, ese modelo se utiliza después para evaluar características (por ejemplo, tales como las descritas anteriormente) asociadas con una imagen celular de una muestra, y para clasificar la célula como un tipo particular de WBC basado en esas características.

Las imágenes de muestras de entrenamiento pueden recogerse de forma empírica (por ejemplo, por un asistente de laboratorio experto) para cada tipo de WBC identificable en el RDL. Por ejemplo, la FIG. 32 ilustra doce imágenes de linfocitos del conjunto de entrenamiento y las FIGS 33, 34 y 35 ilustran ejemplos en los conjuntos de entrenamiento para cada uno de los monocitos, eosinófilos y neutrófilos, respectivamente. El número de imágenes celulares en cada conjunto se selecciona para proporcionar suficientes datos para cada tipo de WBC para fines de entrenamiento; es decir, suficientes datos para permitir que el clasificador se entrene con un nivel aceptable de precisión para el tipo de análisis. El modelo aprendido usado en esta realización no está limitado a ningún tamaño particular de conjunto de entrenamiento. Con frecuencia un conjunto de entrenamiento puede contener de cientos a miles de cada tipo de WBC para representar fielmente la variabilidad en diferentes personas, diferentes condiciones de captura de imágenes, etc.

El clasificador puede entrenarse (y el modelo aprendido desarrollarse) evaluando cuantitativamente cada imagen celular en un conjunto de entrenamiento para determinar un valor o valores de referencia cuantitativos para cada característica para cada célula y después determinar un valor de referencia cuantitativo colectivo para cada característica para el conjunto de entrenamiento (o una representación estadística de valores de referencia; por ejemplo, una función de densidad de probabilidad). Los valores de referencia colectivos (o representaciones estadísticas de los mismos) pueden usarse después para construir el modelo aprendido. Las FIGS. 13, 14, 16-18, 21-24 y 26-29 representan gráficamente funciones de densidad de probabilidad asociadas con cada característica basada en conjuntos de entrenamiento, para linfocitos, monocitos, eosinófilos y neutrófilos en relación con esa característica. Los modelos aprendidos permiten que la presente solicitud se ajuste basándose en datos de imágenes reales, y la interpretación automática de los datos de esa imagen, y de ese modo proporcionar un nivel de precisión deseable.

La presente invención no está limitada a ningún tipo de modelo aprendido particular. Los ejemplos de tipos de modelos aprendidos aceptables incluyen un modelo estadístico tal como un clasificador bayesiano, un modelo lineal tal como una máquina de vector de soporte (MVS) y un modelo de red neural tal como un perceptrón multicapa. Con respecto al modelo de clasificadores bayesianos, puede implementarse un modelo bayesiano utilizando las funciones de densidad de probabilidad descritas anteriormente para cada característica para calcular una distribución posterior para cada uno de los tipos de WBC. Cada distribución posterior describe la probabilidad condicional de un acontecimiento (por ejemplo, la aparición de un WBC particular) después de tener en consideración las pruebas relevantes (por ejemplo, las características calculadas). El modelo bayesiano evalúa después las distribuciones posteriores para determinar cuál de los WBC tiene la mayor distribución posterior. La imagen celular en evaluación se marca después como del mismo tipo que el WBC que tiene la mayor distribución posterior. La modelización de probabilidad bayesiana se conoce bien y la presente invención no está limitada a ninguna técnica matemática particular asociada con la modelización bayesiana. Un ejemplo de un texto que describe la modelización bayesiana en detalle es "Pattern Classification" de R.O. Duda, P.E. Hart y D.G. Stork, John Wiley & Sons, 2001.

La máquina de vector de soporte ("MVS") es un clasificador lineal que utiliza las muestras de entrenamiento desarrolladas para las características y las organiza para determinar si los datos pueden separarse linealmente en espacio n-dimensional. Si los datos pueden separarse linealmente por un hiperplano (n-1)-dimensional que se extiende entre los grupos de datos de características, entonces los datos pueden clasificarse en virtud de su posición en relación con el hiperplano. Una posición óptima del hiperplano puede seleccionarse en relación con los datos usando vectores de soporte alineados con puntos de datos de cada grupo de datos. Una vez que se ha determinado la posición del hiperplano óptima (es decir, la posición en la que el margen entre el hiperplano y los puntos de datos más cercanos / vectores de soporte es mayor), entonces la posición del hiperplano se convierte en el mecanismo para distinguir entre los WBC; es decir, los puntos de datos que residen en un lado del hiperplano se asocian con un tipo particular de WBC y los puntos de datos que residen en el otro lado del hiperplano se asocian con otro tipo de WBC. Con respecto a una MVS, el hiperplano puede considerarse un "valor de referencia" bidimensional, tridimensional o de más dimensiones. En determinados casos en los que la información de probabilidad no es linealmente separable, en ocasiones es posible usar una técnica de manipulación de datos (típicamente denominada "truco de núcleos") en la que los datos pueden reorganizarse usando una función no lineal (por ejemplo, una función polinomial o de núcleo de RBF). Los datos reorganizados permiten la colocación del hiperplano y la determinación consecuente del tipo de WBC. Se conocen bien clasificadores de tipo MVS y la presente invención no está limitada a ninguna realización particular de los mismos. Un ejemplo de un texto que describe clasificadores de tipo MVS en detalles es "A Training Algorithm for Optimal Margin Classifiers", B.E. Boser, I.M. Guyon y V.N. Vapnik, en D. Haussler, editor, 5th Annual ACM Workshop on COLT, págs. 144-152, Pittsburgh, PA, 1992, ACM Press, y "A Tutorial on Support Vector Machines for Pattern Recognition", C.J.C. Burges, Data Mining and Data Knowledge Discovery 2: 121-167, 1998.

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención no está limitada al uso de ningún modelo de aprendizaje particular. En algunos casos, pueden usarse combinaciones de modelos. Por ejemplo, un clasificador basado en normas puede implementarse en determinadas aplicaciones para realizar una organización inicial de los datos. Los datos restantes pueden analizarse usando un modelo de aprendizaje tal como el modelo de MVS anteriormente descrito.

En la actividad de la invención, se recoge una muestra no diluida de sangre completa en un cartucho desechable tal como el ilustrado en la FIG. 3. Se añaden reactivos, incluyendo uno o más colorantes (por ejemplo, ACO) y un anticoagulante (por ejemplo, EDTA) a la muestra para facilitar el análisis de RDL. La muestra mezclada con los reactivos se deposita en la parte de cámara de análisis del cartucho, donde reside en reposo durante el proceso de captura de imágenes. El cartucho se inserta en (o conecta de otro modo con) el dispositivo de análisis, donde se sitúa de forma apropiada por el dispositivo que sujeta y manipula el cartucho en relación con la lente del objetivo, el iluminador de muestras y el disector de imagen, y se capturan imágenes posteriormente.

En la mayoría de los casos, el dispositivo de análisis se programa para capturar imágenes de la totalidad de la muestra que reside en reposo en la cámara. En algunas aplicaciones, sin embargo, pueden capturarse imágenes de una parte de la muestra. El proceso de captura de imágenes puede variar dependiendo de la aplicación

5 correspondiente. Para el RDL de cuatro partes descrito anteriormente, el proceso de captura de imágenes implica someter a la muestra a una fuente de luz de excitación fluorescente (por ejemplo, luz a aproximadamente 470 nm de la fuente de luz epifluorescente) y a una fuente de luz de transmisión (por ejemplo, luz azul a o a aproximadamente 413 nm). La fuente de luz de excitación provoca que el colorante combinado con elementos dispuestos en la muestra emita luz fluorescente a dos longitudes de onda diferentes (por ejemplo, rojo ~ 660 nm y verde ~ 540 nm). Cierta cantidad de la luz transmitida pasa a través de la muestra y el resto es absorbido por la muestra/colorante. El disector de imagen captura la luz transmitida a través de la muestra y que fluoresce de la muestra y proporciona señales representativas de la intensidad y el color de la luz capturada. Las señales se procesan en una forma que permita que el analizador programable forme una imagen de la muestra basada en las señales, pudiendo dicha imagen analizarse cuantitativamente para realizar el RDL de cuatro partes.

10 Como se ha indicado anteriormente, en algunas realizaciones de la presente invención el analizador programable se adapta con un algoritmo que incluye un modelo aprendido. El modelo se desarrolla usando conjuntos de entrenamiento y una vez desarrollado puede usarse para identificar con precisión los WBC en la muestra y clasificar los WBC como linfocitos, monocitos, eosinófilos o neutrófilos. El algoritmo (incluyendo los que utilizan un modelo aprendido) en un dispositivo de análisis particular puede proporcionarse a partir de una copia maestra y descargarse en el analizador programable de ese dispositivo de análisis particular.

15 En referencia a las FIGS. 30 y 31, durante el análisis cuantitativo de la imagen de la muestra, el algoritmo identifica los WBC en la imagen. Para facilitar y/o acelerar el análisis, la imagen de la muestra puede enmascarse (por ejemplo, por segmentación) para eliminar toda la imagen de la muestra excepto las partes identificadas como una célula. Las partes de la imagen identificadas como células se evalúan después de forma cuantitativa con respecto a una o más de las características (por ejemplo, véase agrupamientos de características desvelados en la FIG. 30) y típicamente con respecto a sustancialmente todas las características. Los valores cuantitativos (o funciones de densidad de probabilidad) para cada una de las células para cada una de las características se utilizan después en el algoritmo (por ejemplo, la parte de modelo aprendido) para clasificar las células. Una vez que las células se han clasificado y enumerado, los datos se organizan para proporcionar los datos de RDL.

20 La investigación preliminar sobre la precisión del presente método y aparato indica un alto grado de precisión. La investigación preliminar utilizó muestras de una población de sesenta y dos sujetos, y comparó los resultados de identificación de WBC determinados usando la presente invención para cada una de las muestras, frente a resultados de análisis de muestras preparados por un hematólogo entrenado que examina manualmente las muestras. Se evaluó un conjunto de 500-1000 células de cada muestra. Un análisis de regresión lineal de los dos análisis de las muestras indica que para neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos, los valores de R^2 muestran un acuerdo cercano entre los resultados del análisis manual y los resultados de un dispositivo de análisis según la presente invención.

30 Aunque esta invención se ha mostrado y descrito con respecto a las realizaciones detalladas de la misma, los expertos en la materia entenderán que pueden realizarse diversos cambios en la forma y el detalle de la misma sin alejarse del alcance de la invención, como se define por las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar al menos un tipo de glóbulo blanco (WBC) en una muestra de sangre completa, que comprende las etapas de:
- 5 añadir al menos un colorante a la muestra de sangre completa, colorante que es operativo para identificar diferencialmente al menos un tipo de WBC de otro tipo de WBC;
disponer la muestra de sangre en una cámara (50) definida por al menos un panel transparente (52, 54);
proporcionar una luz de excitación fluorescente y una o más luces de transmisión;
10 recibir tanto luz que fluoresce de la muestra como luz transmitida a través de la muestra y producir señales representativas de la fluorescencia y transmitancia de la luz recibida;
crear al menos una imagen de la muestra que reside en reposo en la cámara (50) usando dichas señales;
identificar los WBC en la imagen de la muestra;
15 analizar cuantitativamente al menos algunos de los WBC en la imagen, incluyendo determinar uno o más valores cuantitativos representativos de una o más características predeterminadas cuantitativamente determinables, en el que cada valor cuantitativo se basa en uno o más valores de intensidad de la luz, color de la luz, densidad óptica, área o forma geométrica, y comparar cada valor cuantitativo frente a un valor de referencia; e
identificar al menos un tipo de WBC a partir de los WBC identificados usando la comparación de cada valor cuantitativo frente a su valor de referencia.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que la una o más características predeterminadas cuantitativamente determinables, incluyen uno o más de número de lóbulos, relación de gránulos grandes, relación de núcleo, relación rojo-verde, brillo del núcleo y brillo del citoplasma.
- 25 3. El método de la reivindicación 1, en el que la una o más características predeterminadas cuantitativamente determinables, incluyen uno o más de absorción celular promedio a una longitud de onda dada y textura de absorción celular promedio a la longitud de onda dada.
- 30 4. El método de la reivindicación 3, en el que la característica cuantitativamente determinable de textura de absorción celular a una longitud de onda dada incluye las etapas de determinar valores de densidad óptica asociados con luz en un intervalo de longitud de onda de 405-425 nm y determinar una media de desviación estadística de los valores de densidad óptica determinados.
- 35 5. El método de la reivindicación 1, en el que la una o más características predeterminadas cuantitativamente determinables, incluyen:
una o ambas de área celular y área del núcleo.
- 40 6. El método de la reivindicación 1, en el que la una o más características predeterminadas cuantitativamente determinables, incluyen uno o ambos de textura del núcleo y textura del citoplasma y en el que la característica cuantitativamente determinable de textura del núcleo incluye las etapas de cuantificar valores de intensidad de verde fluorescente en un núcleo y determinar una desviación estadística de los valores de intensidad de verde fluorescente determinados; o
en el que la característica cuantitativamente determinable de textura del citoplasma incluye las etapas de cuantificar valores de intensidad de rojo fluorescente en el citoplasma en un WBC y determinar una media de desviación estadística de los valores de intensidad de rojo fluorescente determinados.
- 45 7. El método de la reivindicación 1, en el que la una o más características predeterminadas cuantitativamente determinables, incluyen uno o ambos de vacío del núcleo y vacío del citoplasma.
- 50 8. El método de la reivindicación 1, en el que cada una de las una o más características predeterminadas cuantitativamente determinables, se determinan para conjuntos de imágenes de entrenamiento asociadas con tipos de WBC.
- 55 9. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de analizar cuantitativamente al menos algunos de los WBC identificados en la imagen, en relación con una o más características predeterminadas cuantitativamente determinables, incluye además:
comparar el valor cuantitativo determinado usando un clasificador basado en normas; o
evaluar el valor cuantitativo determinado usando un clasificador basado en modelo aprendido.
- 60 10. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de identificar al menos un tipo de WBC de los WBC identificados incluye identificar uno o más de linfocitos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos.
- 65 11. El método de la reivindicación 10, en el que se identifican linfocitos usando una o más características de un grupo que consiste en: número de lóbulos, área celular, relación de núcleo y forma del núcleo.

12. El método de la reivindicación 10, en el que se identifican neutrófilos usando una o más características de un grupo que consiste en: número de lóbulos, área celular, relación de núcleo y forma del núcleo.

5 13. El método de la reivindicación 10, en el que se identifican monocitos usando una o más características de un grupo que consiste en: número de lóbulos, área celular y relación de núcleo.

14. El método de la reivindicación 10, en el que se identifican eosinófilos usando una o más características de un grupo que consiste en: absorción celular promedio a una longitud de onda dada, textura de absorción celular a una longitud de onda dada y relación de gránulos grandes.

10

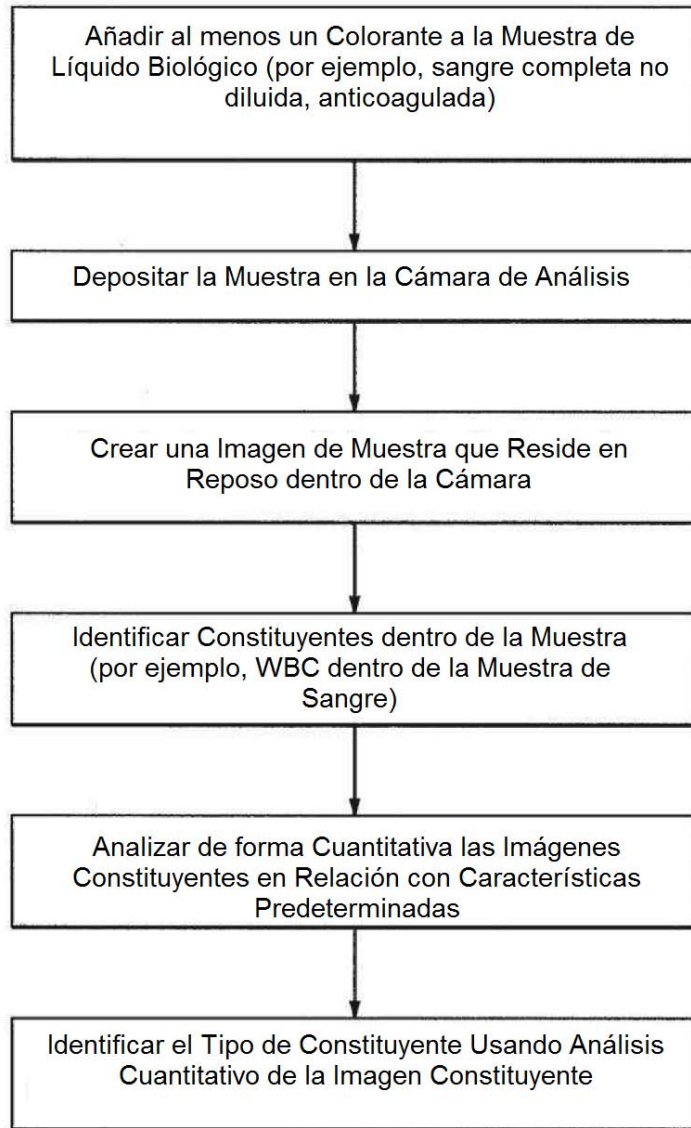


FIG. 1

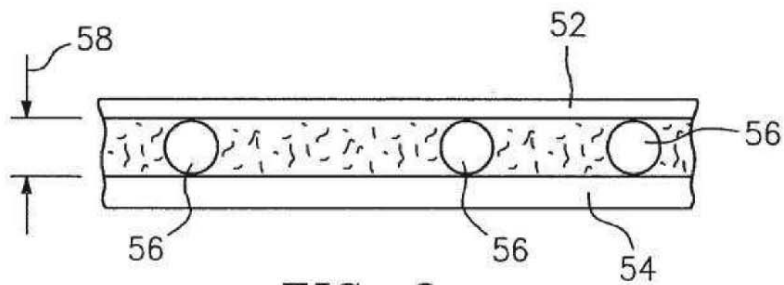


FIG. 2

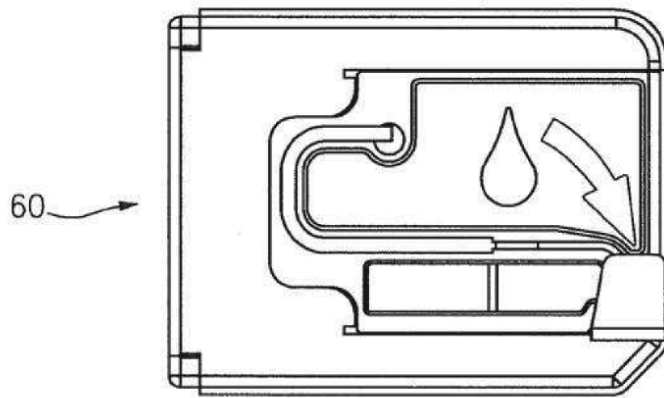


FIG. 3

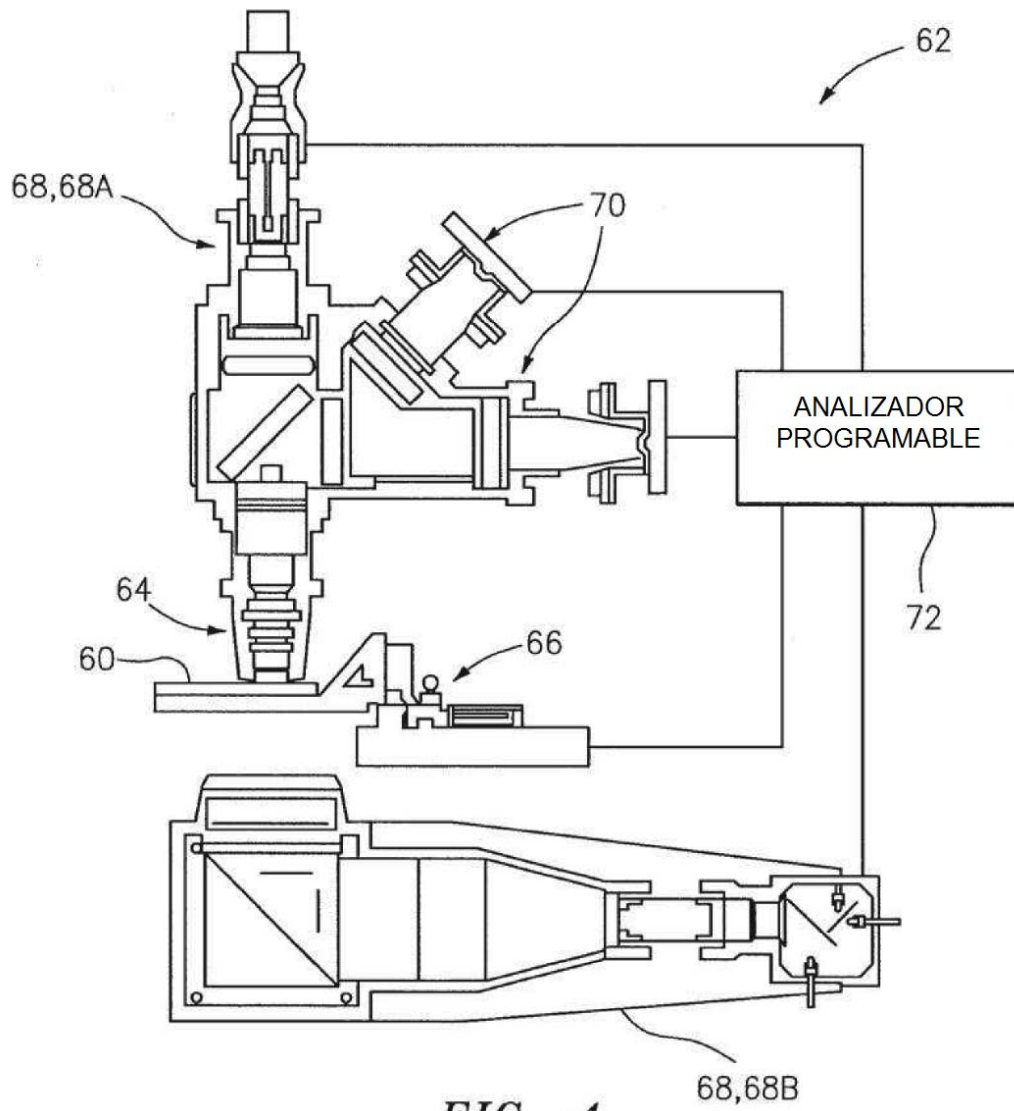
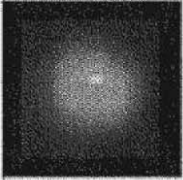
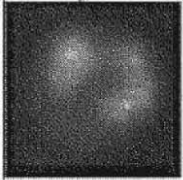
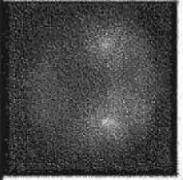
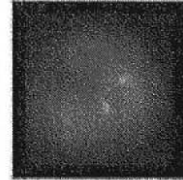

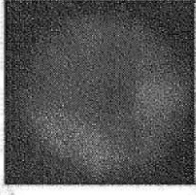
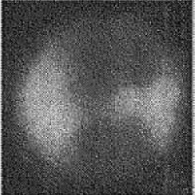
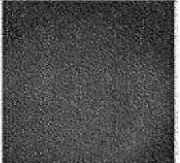
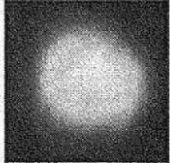
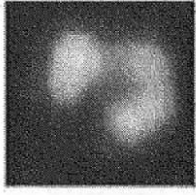
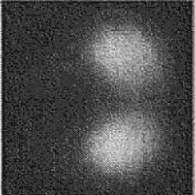

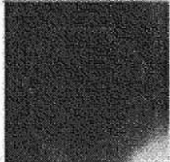
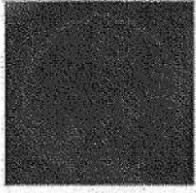
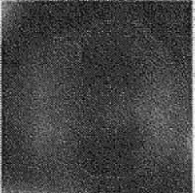

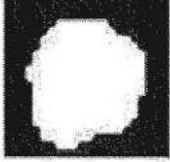
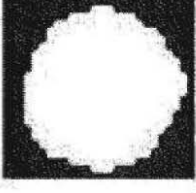
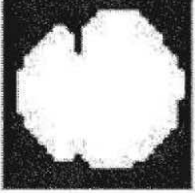
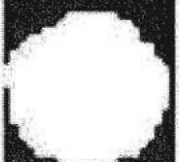
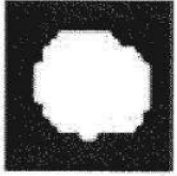



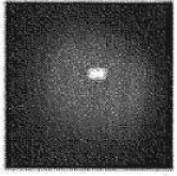
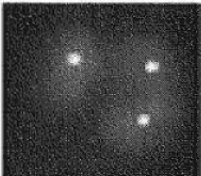
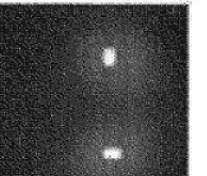
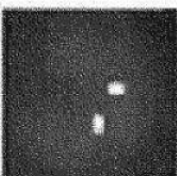


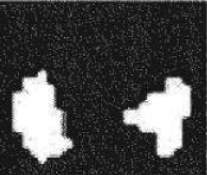



FIG. 4

	Linfocito	Neutrófilo	Eosinófilo	Monocito
Imagen Compuesta	 <i>FIG. 5A</i>	 <i>FIG. 5B</i>	 <i>FIG. 5C</i>	 <i>FIG. 5D</i>
FL Rojo	 <i>FIG. 6A</i>	 <i>FIG. 6B</i>	 <i>FIG. 6C</i>	 <i>FIG. 6D</i>
FL Verde	 <i>FIG. 7A</i>	 <i>FIG. 7B</i>	 <i>FIG. 7C</i>	 <i>FIG. 7D</i>
TL Azul DO	 <i>FIG. 8A</i>	 <i>FIG. 8B</i>	 <i>FIG. 8C</i>	 <i>FIG. 8D</i>
Enmascaramiento Celular	 <i>FIG. 9A</i>	 <i>FIG. 9B</i>	 <i>FIG. 9C</i>	 <i>FIG. 9D</i>

Enmascaramiento del Núcleo	 <p><i>FIG. 10A</i></p>	 <p><i>FIG. 10B</i></p>	 <p><i>FIG. 10C</i></p>	 <p><i>FIG. 10D</i></p>
Lóbulos	 <p><i>FIG. 11A</i></p>	 <p><i>FIG. 11B</i></p>	 <p><i>FIG. 11C</i></p>	 <p><i>FIG. 11D</i></p>
Enmascaramiento de Gránulos Grandes	 <p><i>FIG. 12A</i></p>	 <p><i>FIG. 12B</i></p>	 <p><i>FIG. 12C</i></p>	 <p><i>FIG. 12D</i></p>

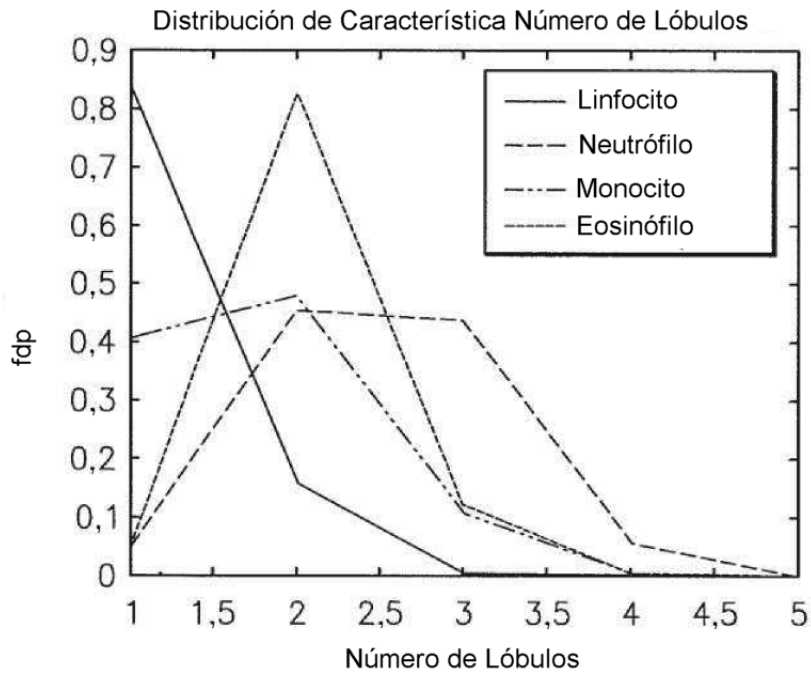


FIG. 13

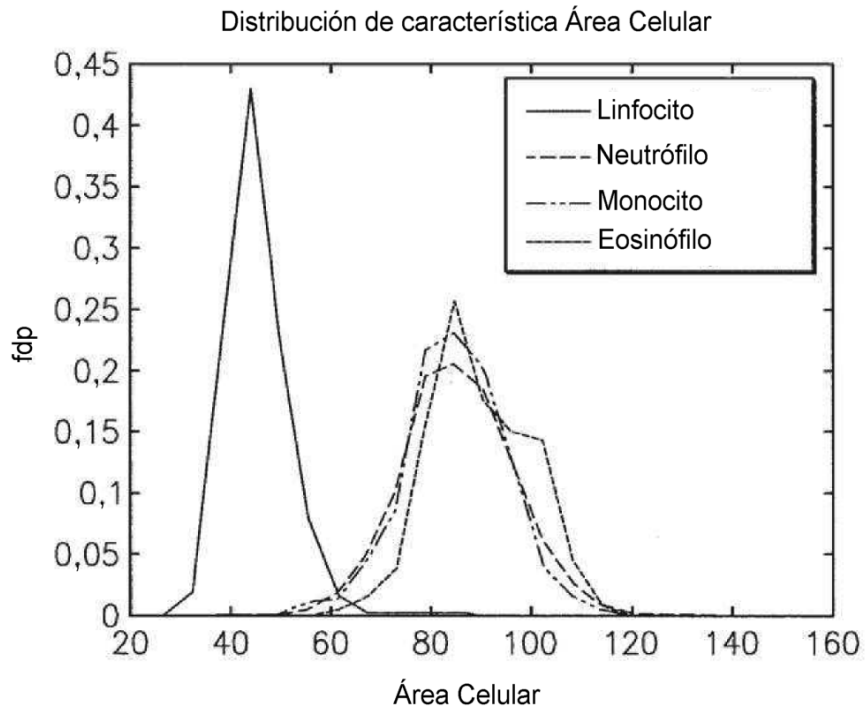


FIG. 14

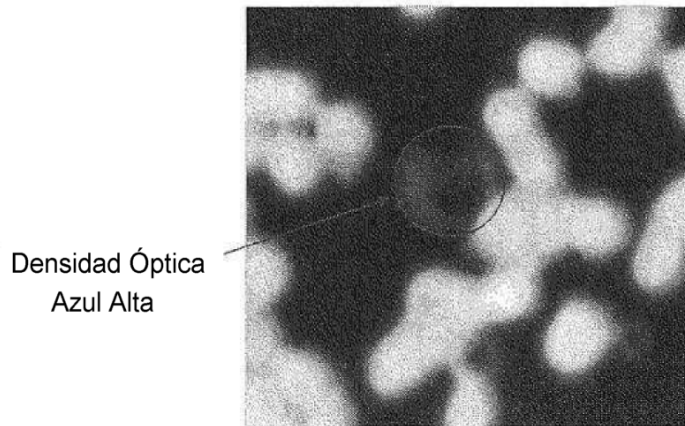


FIG. 15

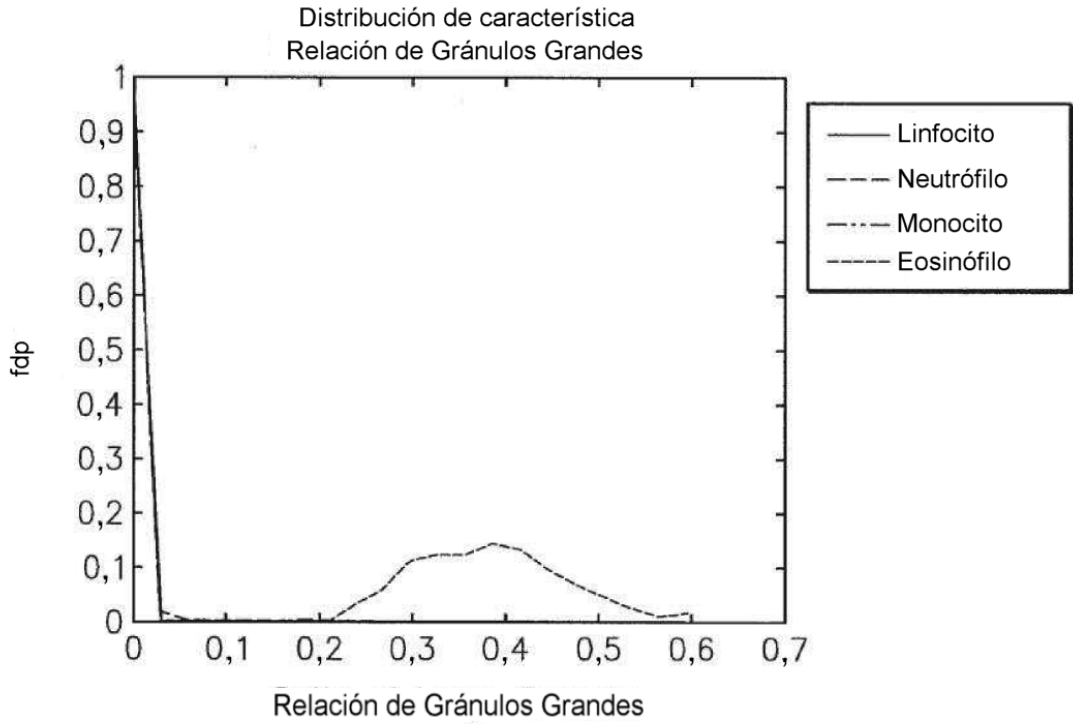


FIG. 16

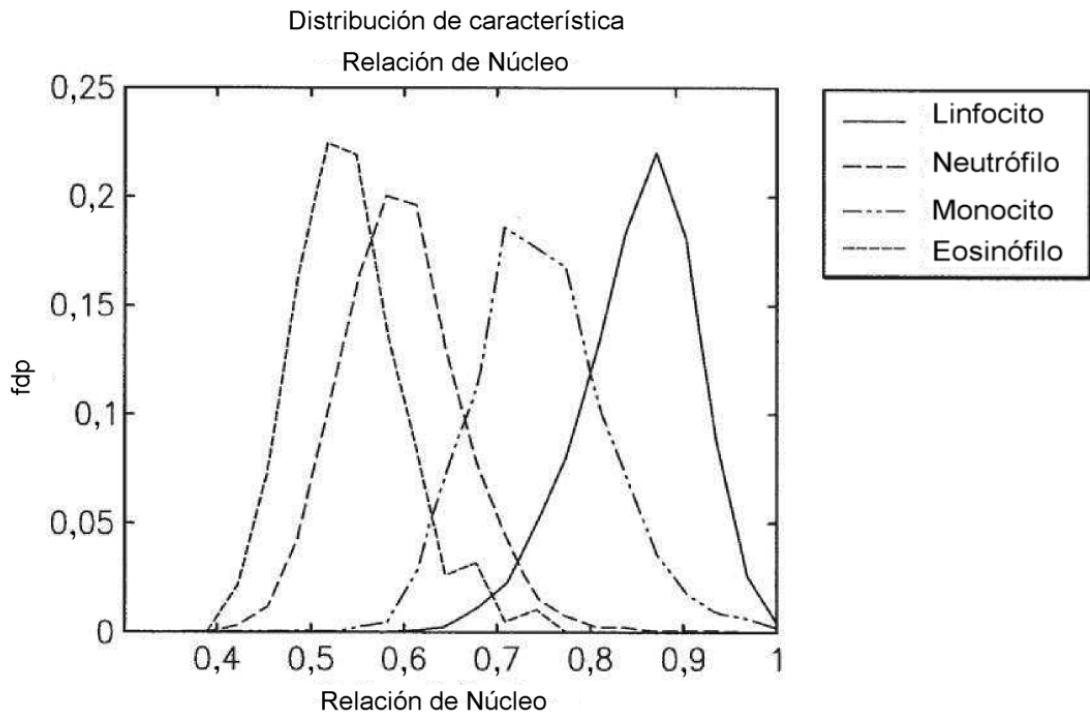


FIG. 17

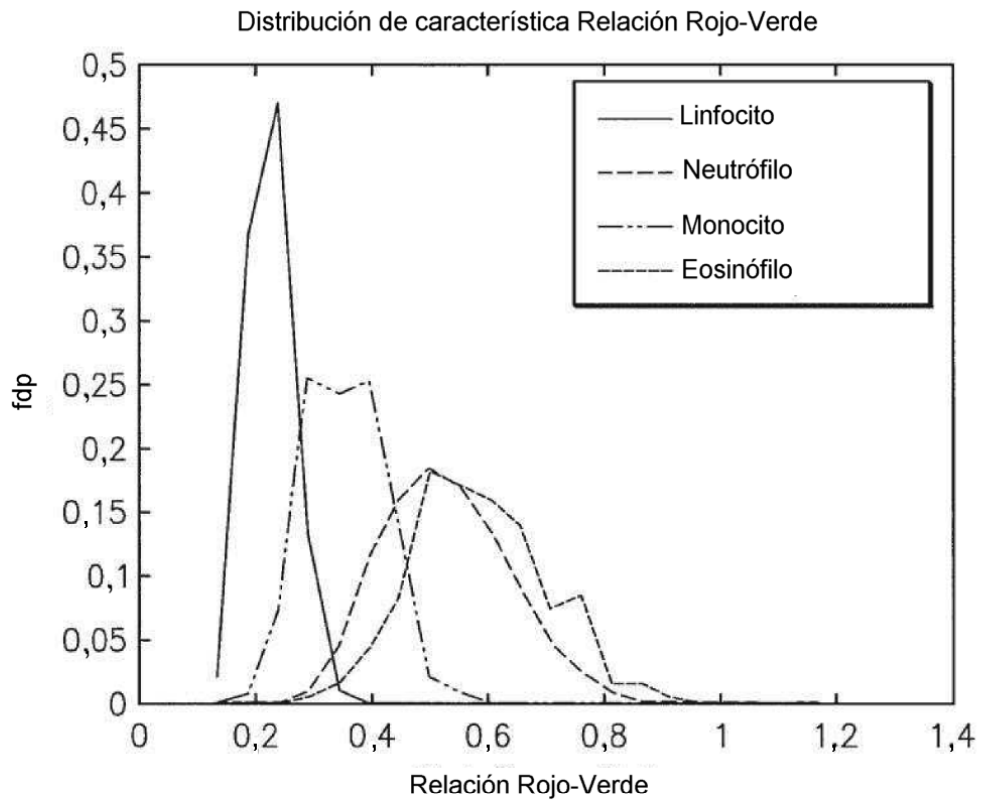


FIG. 18

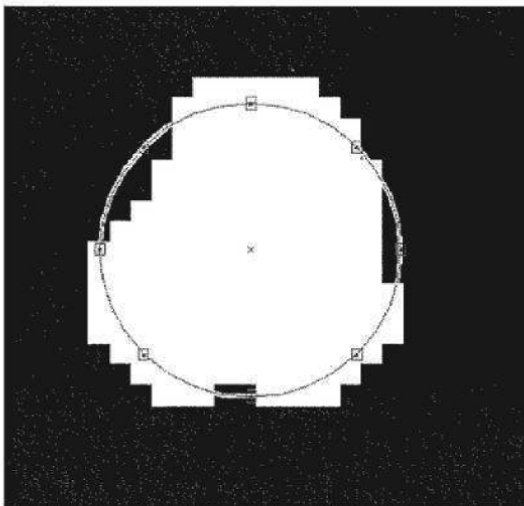


FIG. 19

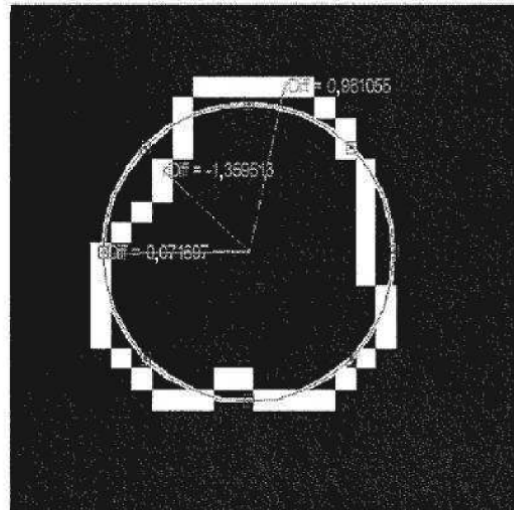


FIG. 20

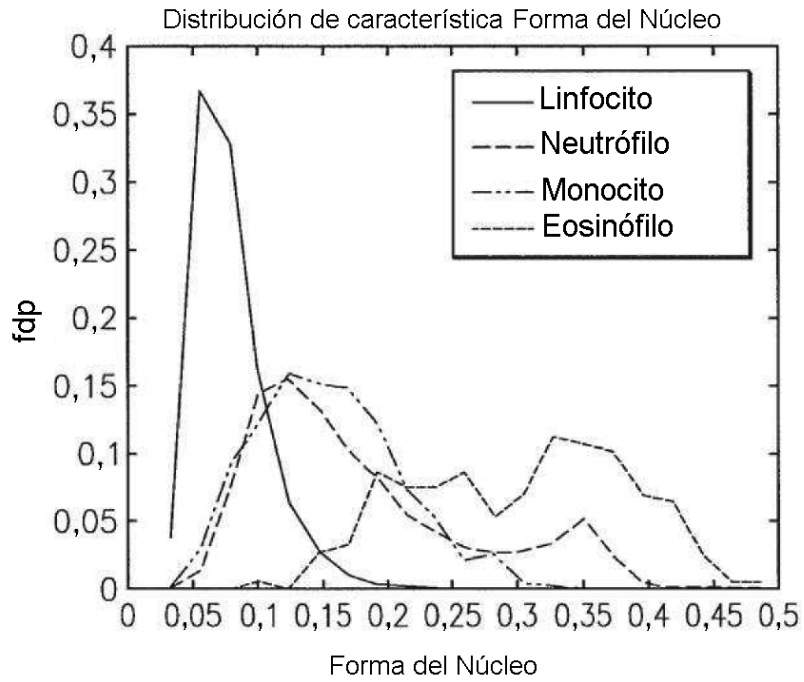


FIG. 21

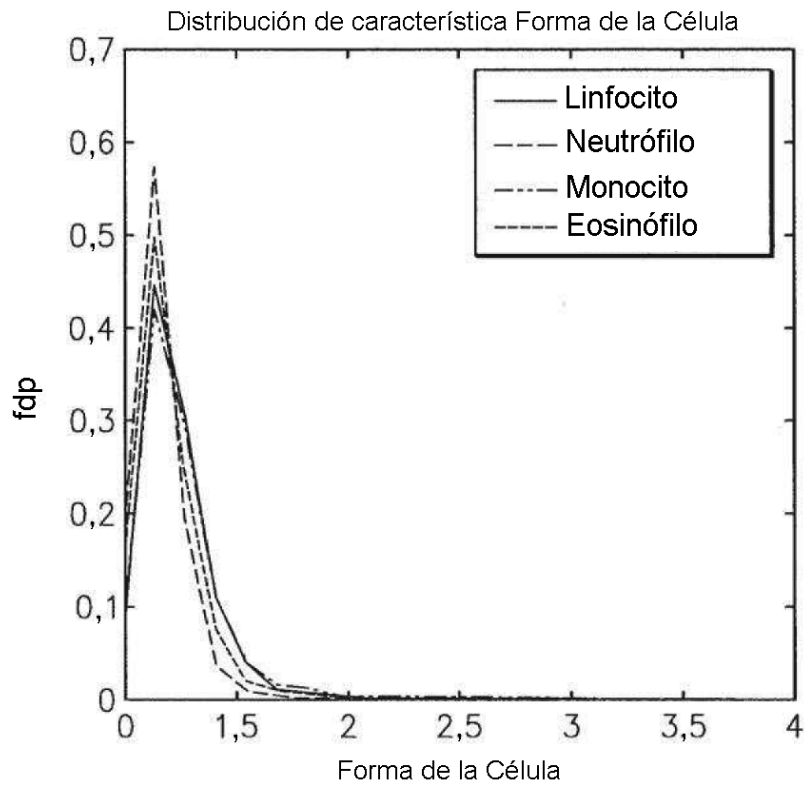


FIG. 22

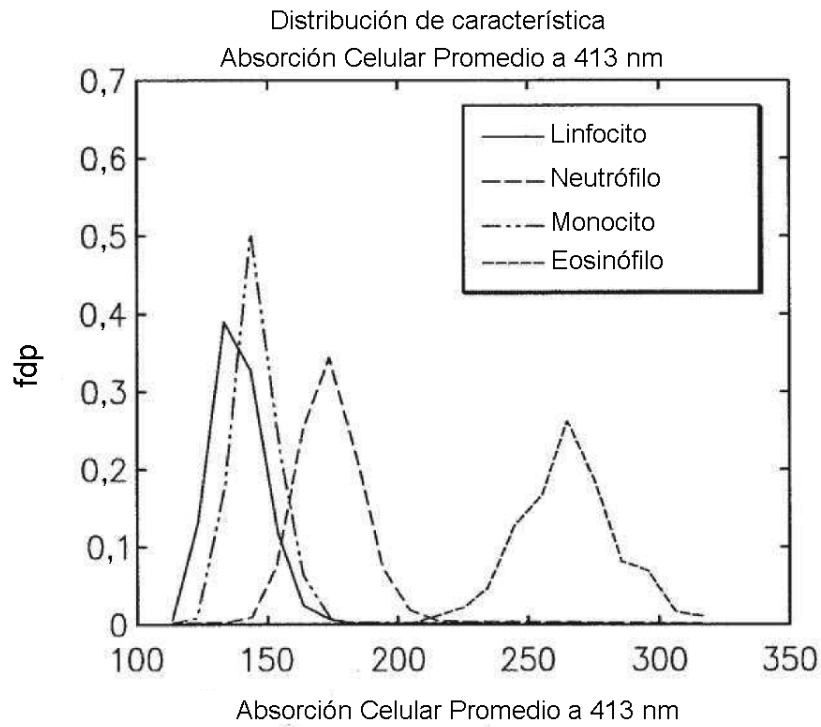


FIG. 23

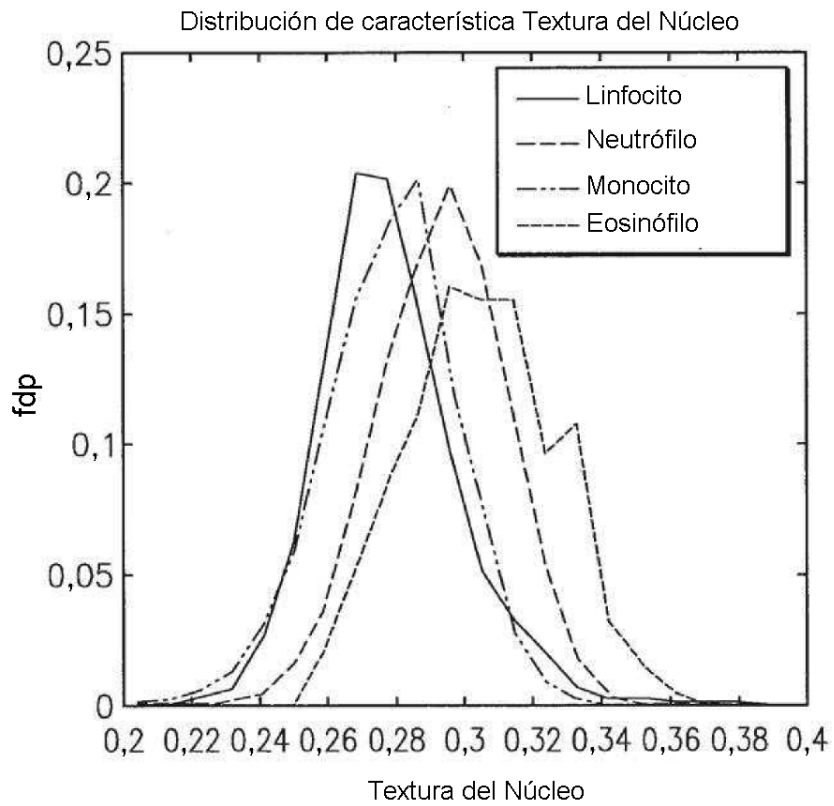


FIG. 24

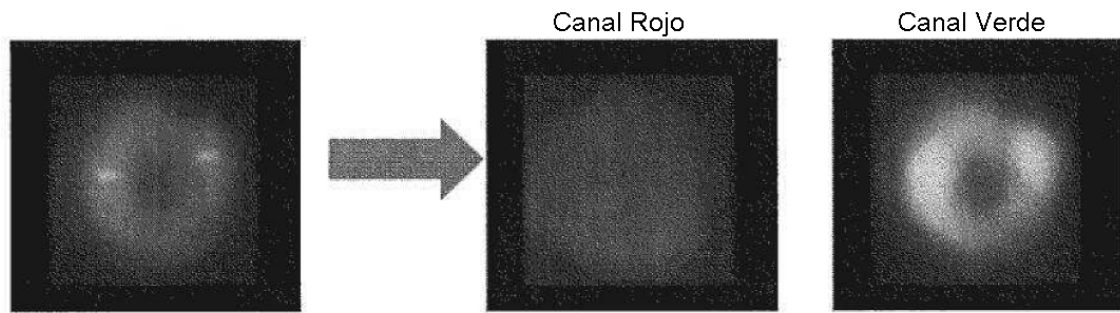


FIG. 25A

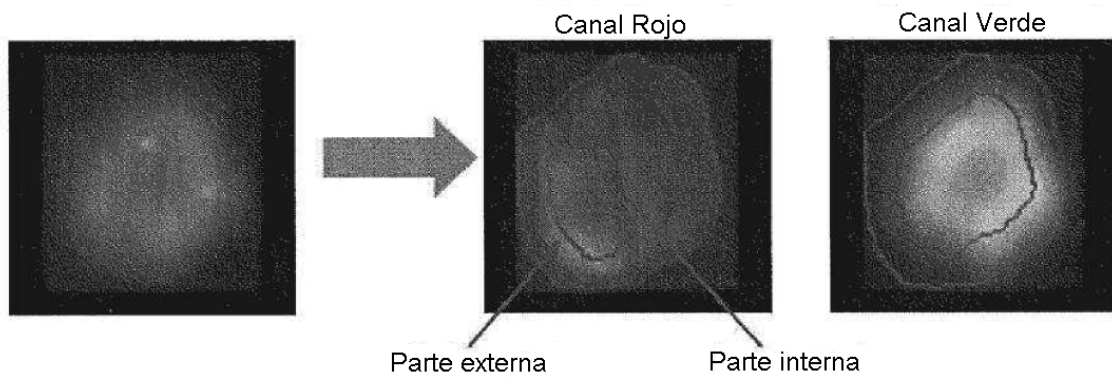


FIG. 25B

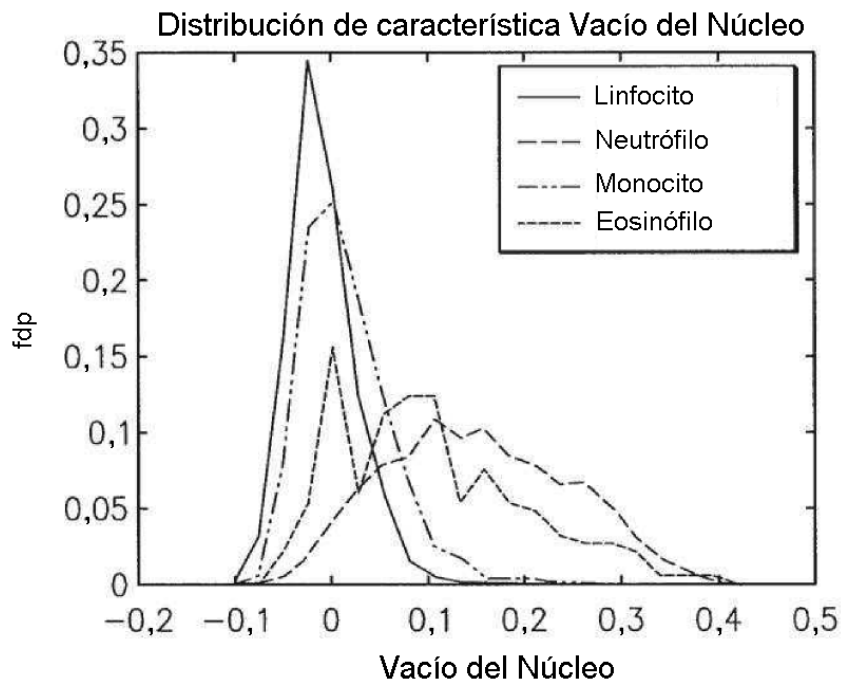


FIG. 26

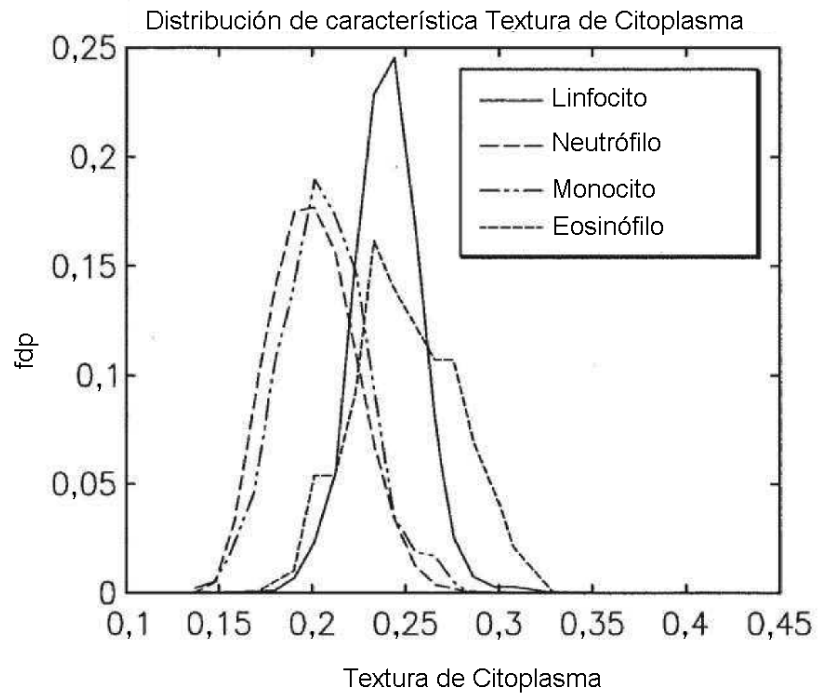


FIG. 27

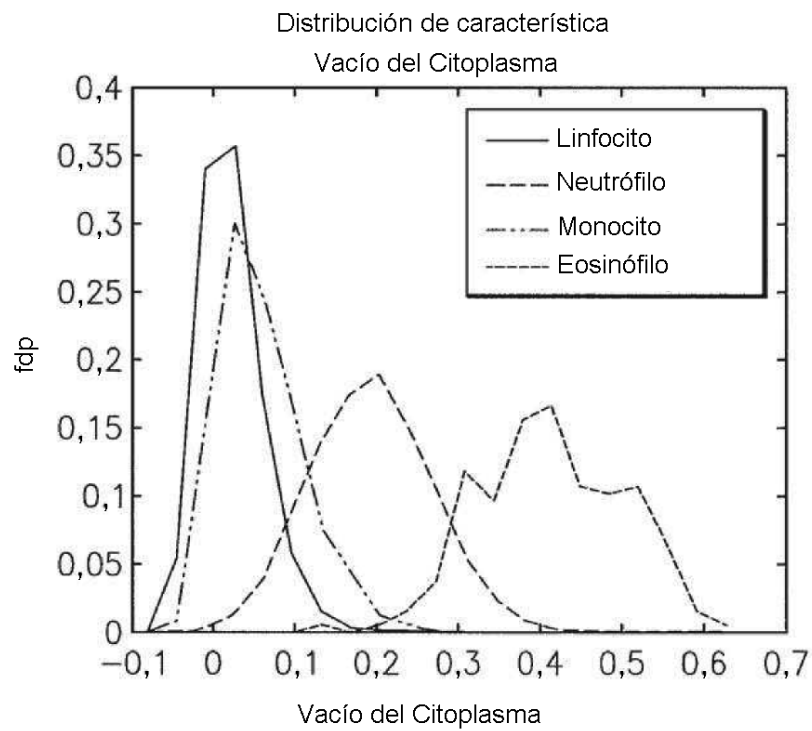


FIG. 28

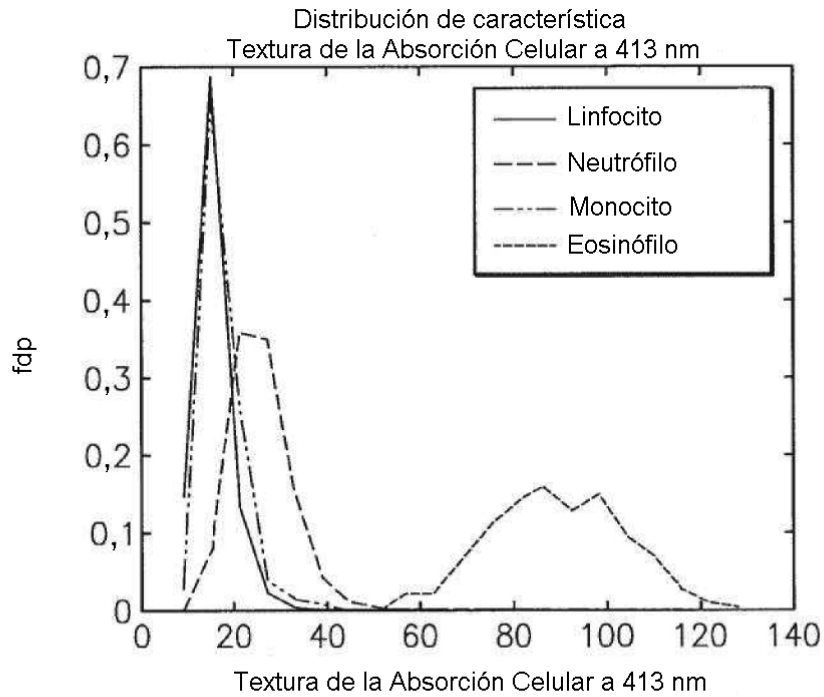


FIG. 29

Tipo Celular	Características Celulares Distintivas Dominantes
Linfocito	Número de Lóbulos Área Celular Relación de Núcleo Forma del Núcleo
Neutrófilo	Número de Lóbulos Área Celular Relación de Núcleo Forma del Núcleo
Monocito	Número de Lóbulos Área Celular Relación de Núcleo
Eosinófilo	Absorción Celular Promedio a una longitud de onda dada Textura de la Absorción Celular a una longitud de onda dada Relación de Gránulos Grandes

FIG. 30

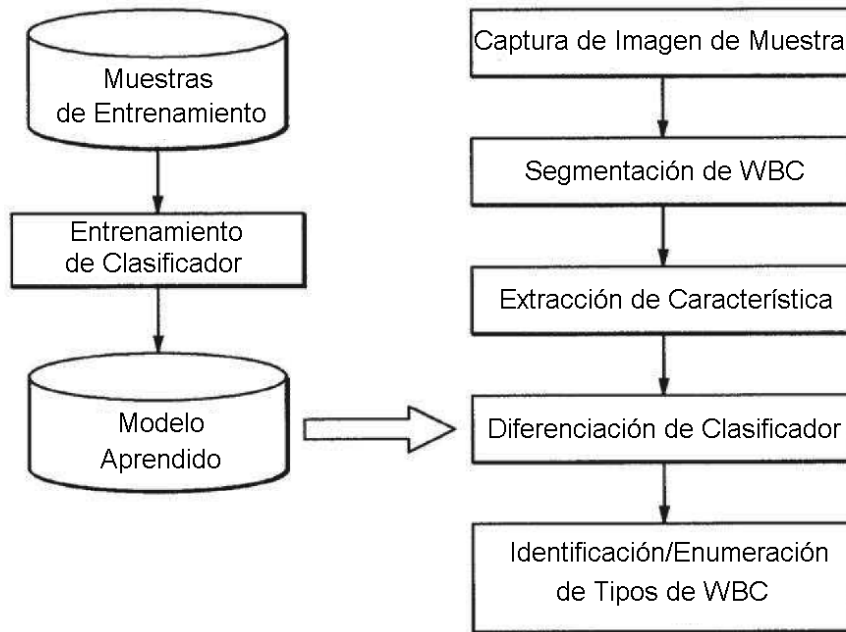


FIG. 31

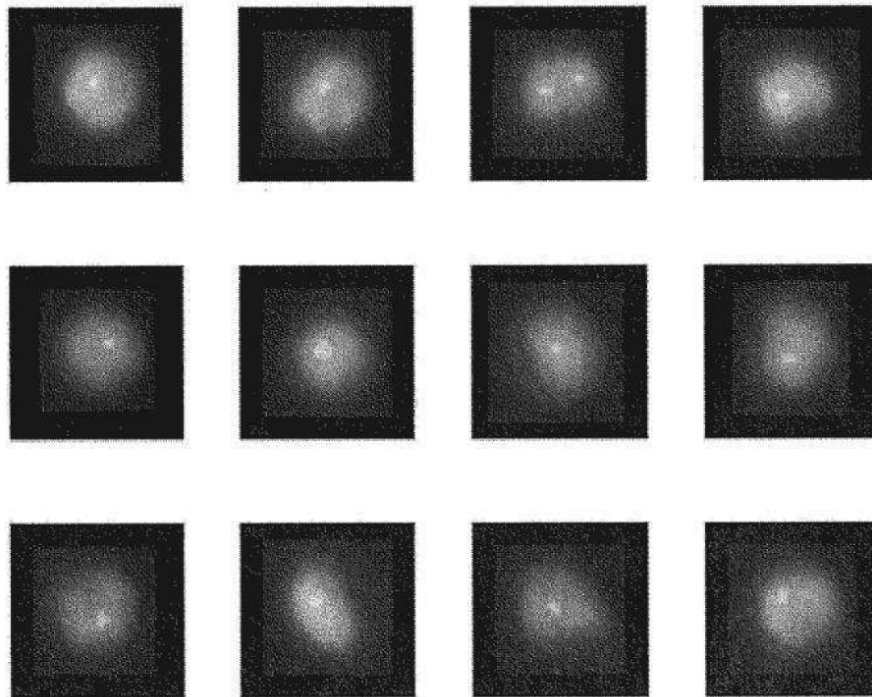


FIG. 32

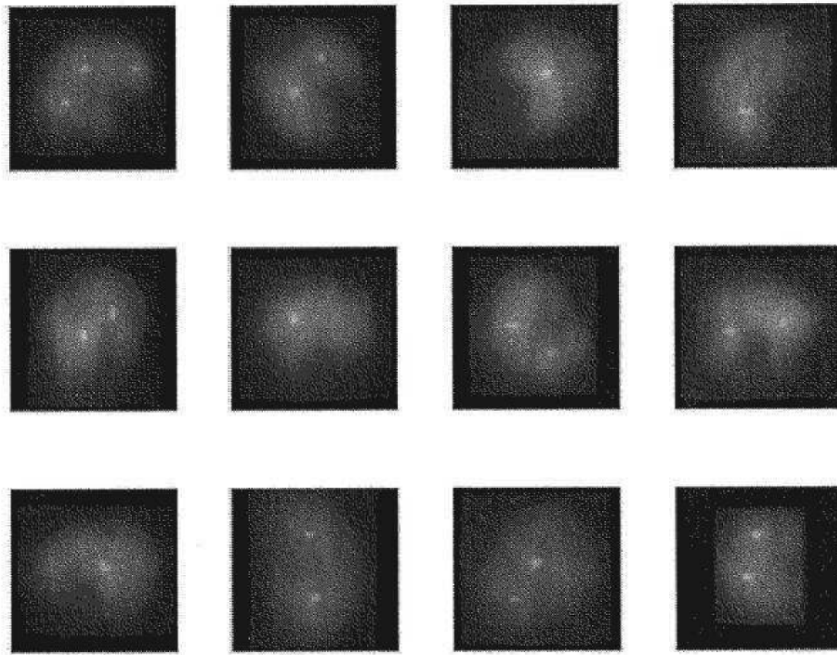


FIG. 33

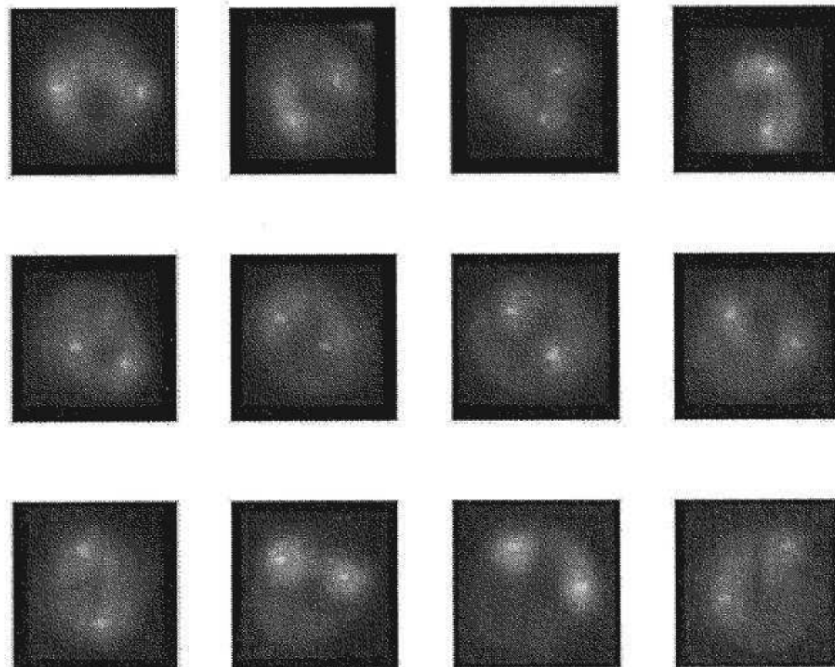


FIG. 34

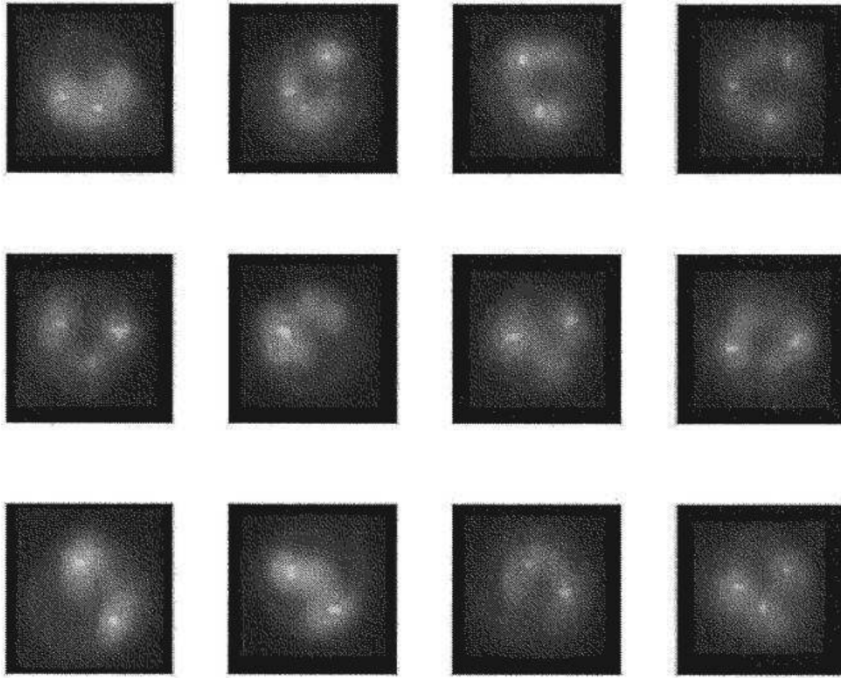


FIG. 35