

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 944 110**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

G06K 9/00 (2006.01)

G01N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2021 E 21197902 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2023 EP 3978902**

54 Título: **Clasificación por madurez de reticulocitos teñidos usando microscopía óptica**

30 Prioridad:

01.10.2020 EP 20199526

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

19.06.2023

73 Titular/es:

SIEMENS HEALTHCARE GMBH (100.0%)

Henkestraße 127

91052 Erlangen, DE

72 Inventor/es:

REICHENWALLNER, ANN-KATHRIN y

RICHTER, LUKAS

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 944 110 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

Clasificación por madurez de reticulocitos teñidos usando microscopía óptica

5 Campo técnico

La presente invención se relaciona con un método de clasificación por madurez de reticulocitos a partir de una muestra de sangre total, que comprende: teñir la muestra con un reactivo colorante aglutinante supravital o un colorante fluorescente aglutinante; iluminar la muestra teñida con un haz de luz para detectar reticulocitos; determinar para cada reticulocito los parámetros de (i) una fracción (Λ) del área del retículo (Ar) al área de la célula entera (Ac); y (ii) una fracción (Γ) del perímetro del retículo (Ur) al área del retículo (Ar); y clasificar por madurez un reticulocito en 1 de 4 clases principales de madurez de acuerdo con los valores determinados para Λ y Γ .

15 Antecedentes

El seguimiento de la eritropoyesis es fundamental para determinar el estado de salud del paciente y su respuesta a diferentes tratamientos, por ejemplo, en la anemia ferropénica o en la recuperación de la quimioterapia. En el proceso de eritropoyesis, cuando un eritroblasto en etapa tardía pierde su núcleo, la célula desarrollada se llama subsecuentemente un reticulocito que contiene una red de ARN filamentosos, el retículo. Los reticulocitos, obtenidos de sangre periférica, son fácilmente accesibles e indican la tasa de reproducción de los glóbulos rojos (RBC, por sus siglas en inglés) al determinar el recuento y la maduración de las células (Piva *et al.*, 2015, *Clinics in Laboratory Medicine*, 35, 133-163). Se usan comúnmente dos métodos principales para detectar reticulocitos, la tinción de fluorescencia aglutinante o la tinción supravital del retículo. Ambos métodos de tinción aglomeran las hebras finas de ARN filamentosos en filamentos en forma de red, que se pueden observar al microscopio.

Aunque los analizadores de hematología automatizados determinan los parámetros de reticulocitos más precisa, exacta y reproduciblemente en comparación con las células contadas manualmente en microscopía óptica, cada analizador usa reactivos diferentes, que muestran una sensibilidad variable en la unión al ARN y otros componentes celulares. Por lo tanto, a través de diferentes métodos de tinción, no existe una clasificación universal para determinar la madurez de los reticulocitos (Van Den Bossche *et al.*, 2002, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 40(1), 69-73). Se llevó a cabo un enfoque para unificar las clasificaciones por la determinación de la fracción de reticulocitos inmaduros (IRF, por sus siglas en inglés) para métodos de fluorescencia. La IRF es la fracción del número de reticulocitos menos maduros en comparación con el número total de reticulocitos (Heimpel *et al.*, 2010, *Med. Klin.*, 105, 538-543). Sin embargo, como no se encuentra un consenso para cada clase, la IRF también varía entre diferentes analizadores (Riley *et al.*, 2001, *J. Clin. Labor. Anal.*, 15, 267-294). Un enfoque de clasificación diferente se basa en el trabajo de Ludwig Heilmeyer en la década de 1930, que define 4 clases de maduración que incluyen reticulocitos inmaduros con retículo denso (clase 1), reticulocitos con red reticular extensa pero laxa (clase 2), reticulocitos con red de retículo disperso (clase 3), y reticulocitos maduros con gránulos de retículo dispersos (clase 4) (Riley *et al.*, 2001, *J. Clin. Labor. Anal.*, 15, 267-294).

40 Las solicitudes de patente JP S61 172062 A, JP S53 52198 y US2013/023007 A1 describen métodos de técnicas anteriores para identificar reticulocitos en una muestra de sangre.

Debido a la diferencia entre los diferentes analizadores de hematología automatizados, el recuento manual en microscopía óptica sigue siendo el estándar de oro para la determinación diagnóstica de las clases de maduración de reticulocitos. También hay un interés creciente en los dispositivos que determinan todos los parámetros para un hemograma completo ópticamente análogo a la microscopía óptica.

Por lo tanto, existe la necesidad de una métrica estándar para analizar los reticulocitos teñidos que se pueda conectar a un análisis de microscopio manual y, en particular, automatizado, así como a una detección de diagnóstico derivada.

50 Breve descripción de la invención

La presente invención aborda esta necesidad y proporciona un método de clasificación por madurez de reticulocitos a partir de una muestra de sangre total, que comprende: (a) teñir la muestra con un reactivo colorante aglutinante supravital o un colorante fluorescente aglutinante; (b) iluminar la muestra teñida con un haz de luz, preferiblemente con un rango de longitud de onda de 200 nm a 780 nm en un dispositivo de detección de luz, preferiblemente un microscopio, para detectar reticulocitos; (c) determinar para cada reticulocito los parámetros de (i) una fracción (Λ) del área del retículo (Ar) al área de la célula completa (Ac); y (ii) una fracción (Γ) del perímetro del retículo (Ur) al área del retículo (Ar); y (d) clasificar por madurez un reticulocito en 1 de 4 clases principales de madurez de acuerdo con los valores determinados para Λ y Γ . El método permite ventajosamente clasificar los reticulocitos de acuerdo con una métrica estándar, que es en gran medida independiente de la plataforma o dispositivo usado y, por lo tanto, permite una distribución uniforme de los reticulocitos de acuerdo con el esquema de clasificación bien establecido de Heilmeyer, que es familiar para la mayoría de los médicos. La nueva metodología de acuerdo con la presente invención permite además una lectura de diagnóstico mejorada sobre la base de cambios dependientes del tiempo en el número de reticulocitos después de un tratamiento o durante el curso de una enfermedad.

En una realización preferida de la presente invención, el método comprende adicionalmente como paso final un paso de enumerar de los reticulocitos. Se prefiere particularmente que dicha enumeración sea por clase y por muestra.

5 En otra realización preferida, la tinción se realiza con un reactivo colorante aglutinante supravital que se selecciona de NMB (azul de metileno nuevo, por sus siglas en inglés), azul de cresilo brillante, violeta cristal, violeta de metilo, y azul de Nilo. En otra realización preferida más, la tinción se realiza con un colorante fluorescente aglutinante seleccionado de naranja de acridina, auramina O, D-metiloxacarbocianuro, bromuro de etidina, pironina Y, tioflavina-T, y naranja de tiazol.

10 La tinción puede comprender opcionalmente además un paso de reticulación química de ácidos nucleicos, preferiblemente con una mostaza nitrogenada, un *cis*-diaminodicloroplatino (II) o derivado, o cloroetilnitrosourea (CENU, por sus siglas en inglés).

15 En otra realización, el paso (c) como se mencionó anteriormente se realiza con un dispositivo que comprende un módulo de obtención de imágenes. Se prefiere que el módulo de obtención de imágenes esté diseñado para realizar operaciones de segmentación morfológica.

20 Otra realización se refiere a un método como se define anteriormente, que comprende adicionalmente como paso (e) un paso de comparación morfológica de cada reticulocito teñido con un depósito de imágenes de reticulocitos que han sido clasificados de forma independiente por un experto. Se prefiere que la clasificación lleve a un etiquetado de reticulocitos para los cuales la clasificación morfológica difiere de la clasificación del paso (d).

25 En una realización preferida, dicha comparación morfológica comprende aplicar una imagen del reticulocito teñido a un método basado en aprendizaje automático, que fue entrenado con imágenes de dicho depósito de imágenes de reticulocitos.

30 En una realización del método de acuerdo con la invención, la clasificación por madurez comprende una asignación de reticulocitos a la clase 1, 2, 3 o 4 de acuerdo con la relación de Λ/Γ . En una realización preferida, un valor de Λ/Γ de aproximadamente $> 2,5$ es indicativo de la clase 1, un valor de Λ/Γ de aproximadamente 1 a aproximadamente 2,5 es indicativo de la clase 2, un valor de Λ/Γ de aproximadamente 0,35 a aproximadamente 1 es indicativo de la clase 3, y un valor de Λ/Γ de aproximadamente $< 0,35$ es indicativo de la clase 4.

35 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método implementado informáticamente para la clasificación por madurez de reticulocitos a partir de una o más imágenes tomadas de una muestra de sangre total, que comprende determinar dentro de una imagen para cada reticulocito los parámetros de (i) una fracción (Λ) de la área de retículo (A_r) a área de célula completa (A_c); y (ii) una fracción (Γ) del perímetro del retículo (U_r) al área del retículo (A_r); clasificar por madurez un reticulocito en 4 clases principales de acuerdo con los valores de Λ y Γ . El método preferiblemente comprende adicionalmente un paso de enumerar los reticulocitos.

40 En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método *in vitro* para monitorear y determinar el estado de salud de un sujeto y/o la reacción de un sujeto a un tratamiento, que comprende llevar a cabo el método de clasificación por madurez de reticulocitos como se define anteriormente con una o más muestras de sangre total obtenidas de dicho sujeto.

45 En una realización preferida de dicho método *in vitro* para monitorear y determinar el estado de salud de un sujeto y/o la reacción de un sujeto a un tratamiento, un aumento en el número de reticulocitos de clase 2, 3 o 4, preferiblemente de clase 3 o 4, más preferiblemente de clase 4, cuando una muestra inicial se compara con una segunda o más muestras tomadas del sujeto después de un período de tiempo de 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días, es indicativo de una mejora en la salud del sujeto y/o una respuesta positiva al tratamiento en enfermedades de reticulocitos bajos, o es indicativo de un deterioro de la salud del sujeto y/o una respuesta negativa al tratamiento en enfermedades de reticulocitos altos.

50 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un dispositivo que comprende medios para llevar a cabo el método de clasificación por madurez de reticulocitos de acuerdo con la reivindicación 14.

55 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un dispositivo de procesamiento de datos de acuerdo con la reivindicación 13.

En un último aspecto, la presente invención se refiere a un programa informático de acuerdo con la reivindicación 15.

Breve descripción de los dibujos

60 La figura 1 muestra la clasificación de maduración cuantitativa de reticulocitos registrados en el modo de transmisión de campo claro de acuerdo con la presente invención. La clasificación se basa en el porcentaje del área del retículo teñido dentro de una célula en comparación con el área de la célula completa (Λ), y en la fracción del perímetro de todos los fragmentos de ARN en sus áreas (Γ). Se indican cuatro clases de reticulocitos propuestos por Heilmeyer. La clase 1 (círculos cerrados (1)) es la clase más inmadura con una celda de ejemplo que se muestra en (2). La clase 2 (círculos abiertos con punto (3)) corresponde al segundo grupo más joven de reticulocitos (célula de ejemplo que se muestra en (4)), seguida de la clase 3 (círculos abiertos (5)) con una célula de ejemplo (6), y la clase 4 (círculos punteados (7)); celda

de ejemplo (8)) siendo el grupo más maduro.

La figura 2 muestra un ejemplo de una imagen de color de transmisión de campo brillante (9) dividida en imágenes RGB separadas (R: rojo (10), G: verde (11), B: azul (12)) de 8 bits de un reticulocito teñido. El tamaño de la celda se determina usando el umbral de Otsu en el canal rojo. Para una determinación del área del retículo, se genera una máscara del ARN teñido restando el canal verde del azul, ya que la pared celular aparece exclusivamente en el canal azul. Aplicando adicionalmente el umbral automático en ImageJ sobre la imagen generada, se obtiene una máscara del retículo teñido (13).

La figura 3 muestra una representación diferente de la clasificación de maduración cuantitativa de los reticulocitos registrados en el modo de transmisión de campo claro de la presente invención que se muestra en la figura 1. En esta figura se muestra la relación de Λ/Γ en comparación con el número de células (14). Las figuras muestran células de clase 1 (círculos cerrados (1)), clase 2 (círculos abiertos con punto (3)), clase 3 (círculos abiertos (5)), y clase 4 (círculos punteados (7)) de acuerdo con el esquema de Heilmeyer.

Descripción detallada de realizaciones

Aunque la presente invención se describirá con respecto a realizaciones particulares, esta descripción no se debe interpretar en un sentido limitante.

Antes de describir en detalle realizaciones ejemplares de la presente invención, se dan definiciones importantes para comprender la presente invención.

Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de "un" y "una" también incluyen los respectivos plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

En el contexto de la presente invención, el término "aproximadamente" indica un intervalo de exactitud que un experto en la técnica comprenderá para asegurar aún el efecto técnico del atributo en cuestión. El término "típicamente" indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 25\%$. En realizaciones específicas, el término también puede indicar una desviación del valor numérico indicado en $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$ o $\pm 0,5\%$.

Se debe entender que el término "que comprende" no es limitante. Para los fines de la presente invención, el término "que consiste en" o "que consiste esencialmente en" se considera una realización preferida del término "que comprende". Si en adelante se define un grupo para que comprenda al menos un cierto número de realizaciones, esto significa que también abarca un grupo que consiste preferiblemente en solamente estas realizaciones.

Además, los términos "(i)", "(ii)", "(iii)", o "(a)", "(b)", "(c)", "(d)", o "primero", "segundo", "tercero", etc., y similares en la descripción o en las reivindicaciones, se usan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico.

Se debe entender que los términos así usados son intercambiables bajo las circunstancias apropiadas, y que las realizaciones de la invención descritas en la presente son capaces de operar en secuencias distintas a las descritas o ilustradas en la presente. En caso de que los términos se relacionen con pasos de un método, procedimiento o uso, no hay coherencia de tiempo o intervalo de tiempo entre los pasos, es decir, los pasos se pueden llevar a cabo simultáneamente o puede haber intervalos de tiempo de segundos, minutos, horas, días, semanas, etc., entre dichos pasos, a menos que se indique lo contrario.

Se debe entender que esta invención no se limita a la metodología, protocolos, etc., particulares descritos en la presente, ya que estos pueden variar. También se debe entender que la terminología usada en la presente tiene el propósito de describir solamente realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención que estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

Los dibujos se deben considerar como representaciones esquemáticas, y los elementos ilustrados en los dibujos no se muestran necesariamente a escala. Más bien, los diversos elementos se representan de modo tal que su función y propósito general sean evidentes para una persona experta en la técnica.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto en la técnica.

Como se ha establecido anteriormente, la presente invención se refiere en un aspecto a un método de clasificación por madurez de reticulocitos a partir de una muestra de sangre total, que comprende: (a) teñir la muestra con un reactivo colorante aglutinante supravital o un colorante fluorescente aglutinante; (b) iluminar la muestra teñida con un haz de luz, preferiblemente con un rango de longitud de onda de 200 nm a 780 nm en un dispositivo de detección de luz, preferiblemente un microscopio, para detectar reticulocitos; (c) determinar para cada reticulocito los parámetros de (i) una fracción (Λ) del área del retículo (A_r) al área de la célula completa (A_c); y (ii) una fracción (Γ) del perímetro del retículo (U_r) al área del retículo (A_r); y (d) clasificar por madurez un reticulocito en 1 de 4 clases principales de madurez de acuerdo

con los valores determinados para Λ y Γ .

5 El término "muestra de sangre total", como se usa en la presente, se refiere a una muestra de sangre de mamífero, preferiblemente humana, obtenida de un sujeto a través de métodos adecuados conocidos por los expertos en la técnica. La muestra usada en el contexto de la presente invención se debe recolectar preferiblemente de una manera clínicamente aceptable, más preferiblemente de manera que se conserven los ácidos nucleicos, en particular el ARN. La "sangre total" comprende esencialmente glóbulos rojos y células precursoras, glóbulos blancos y células precursoras, así como plaquetas suspendidas en plasma. En ciertas realizaciones específicas, las muestras se pueden agrupar.

10 La presente invención contempla preferiblemente el uso de muestras no agrupadas. En una realización específica de la presente invención, el contenido de la muestra de sangre total también se puede someter a pasos de procesamiento específicos. Por ejemplo, la muestra se puede diluir o enriquecer. Asimismo, se pueden adicionar agentes estabilizadores o antidegradación de ácidos nucleicos. En realizaciones particularmente preferidas, se contempla el uso de anticoagulantes, tal como EDTA (por sus siglas en inglés). En realizaciones específicas adicionales, la muestra de sangre total se puede someter a un paso inicial de organización celular o separación celular antes de la tinción. Se contempla que tal paso lleve a un enriquecimiento y/o purificación de glóbulos rojos (incluyendo células precursoras, tales como reticulocitos), o un enriquecimiento y/o purificación de reticulocitos.

20 El método de acuerdo con la invención contempla como primer paso un paso de "tinción" con una muestra de sangre total como se define anteriormente. Este paso se puede realizar con cualquier agente colorante adecuado, que sea capaz de mostrar el área y el perímetro de un retículo. Por consiguiente, el agente colorante es capaz de estabilizar al menos parcialmente estructuras de ácido nucleico, en particular estructuras de ARN con una célula, y de mostrar estas estructuras en condiciones ópticas adecuadas, preferiblemente cuando se iluminan con luz. El término "retículo", como se usa en la presente, se refiere a una red similar a una malla de ácidos nucleicos, en particular ARN, típicamente ARN ribosómico que se hace visible bajo condiciones de tinción. El retículo es una estructura específica que distingue a los reticulocitos de otras células sanguíneas. Un "reticulocito", como se usa en la presente, se refiere a un glóbulo rojo inmaduro que no tiene un núcleo celular. Durante la eritropoyesis, los reticulocitos se desarrollan y maduran en la médula ósea, y posteriormente circulan por aproximadamente un día en el torrente sanguíneo antes de convertirse en glóbulos rojos maduros. En un sujeto sano, la fracción de reticulocitos en la sangre es típicamente de aproximadamente 0,5 % a 2,5 % en adultos, y de aproximadamente 2% a 6% en infantes. El número de reticulocitos en una muestra de sangre total se usa típicamente como indicador de la actividad de la médula ósea, ya que representa eventos recientes de eritropoyesis.

35 Debido a la presencia de formas de ácido nucleico en el retículo, que permite distinguir los reticulocitos de los glóbulos rojos maduros y otras células, la tinción se realiza preferiblemente con agentes colorantes que proporcionan un efecto aglutinante y permiten un contraste adecuado en los procedimientos de detección óptica. Tales enfoques de tinción, en realizaciones preferidas de la presente invención, se basan en reactivos colorantes aglutinantes.

40 El término "reactivo colorante aglutinante", como se usa en la presente, se refiere a un agente colorante, que se supone que se une a estructuras que comprenden ácidos nucleicos dentro de la célula, en particular ribosomas, y causa que se aglomeren. La presente invención contempla en una realización preferida el uso de todos los reactivos colorantes aglutinantes adecuados que tengan esta función o capacidad.

45 En un conjunto preferido de realizaciones, el reactivo colorante aglutinante es un agente colorante aglutinante supravital. Los colorantes "supravitales" se emplean típicamente para la tinción de células vivas que se han eliminado de un organismo. Los ejemplos preferidos de agentes colorantes aglutinantes supravitales incluyen NMB (azul de metileno nuevo), azul de cresilo brillante, violeta cristal, violeta de metilo, y azul de Nilo. Además se contempla el uso de cualquier derivado adecuado o equivalente funcional del mismo. También se contempla el uso de Azure B o cualquier derivado adecuado del mismo. La presente invención contempla además el uso de reactivos colorantes aglutinantes supravitales que se pueden no haber desarrollado aún y cumplen la función mencionada anteriormente. Particularmente preferido es el empleo de NMB (nuevo azul de metileno). Se puede obtener más información de fuentes bibliográficas adecuadas, tal como, por ejemplo, Samuel M. Rapoport, 2019, *The reticulocyte*, 1st ed., CRC Press.

55 En otro conjunto preferido de realizaciones, el reactivo colorante aglutinante es un agente colorante fluorescente aglutinante. Tal colorante también interactúa con estructuras que contienen ácidos nucleicos, en particular ribosomas, y proporciona un efecto fluorescente tras la exposición a luz de excitación adecuada. Los ejemplos de tales reactivos colorantes incluyen naranja de acridina, auramina O, D-metiloxacarbocianuro, bromuro de etidina, pironina Y, tioflavina-T, y naranja de tiazol. Además se contempla el uso de cualquier derivado adecuado o equivalente funcional del mismo. La presente invención contempla además el uso de reactivos colorantes fluorescentes aglutinantes que se pueden no haber desarrollado aún y cumplen la función mencionada anteriormente. Se puede obtener más información de fuentes bibliográficas adecuadas, tal como, por ejemplo, Samuel M. Rapoport, 2019, *The reticulocyte*, 1st ed., CRC Press.

60 La tinción se puede realizar de acuerdo con un procedimiento adecuado conocido por el experto en la técnica. En ciertas realizaciones, la tinción se realiza de acuerdo con el procedimiento sugerido por el fabricante del reactivo colorante. Por ejemplo, un procedimiento de tinción típico puede abarcar la adición del reactivo colorante, por ejemplo, en una concentración de aproximadamente 1 % en una mezcla de la muestra de sangre total, como se define en la presente y,

opcionalmente, un amortiguador, por ejemplo, PBS (por sus siglas en inglés). Subsecuentemente, la mezcla se incuba por un cierto período, por ejemplo, por 1 min, 2 min, etc. El tiempo de incubación se puede adaptar al colorante a usar. Por ejemplo, para un enfoque de tinción con colorantes fluorescentes, el tiempo de incubación se puede extender varios minutos, preferiblemente de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

5

Para análisis subsecuentes, las muestras teñidas se pueden proporcionar en cualquier forma adecuada. Las muestras se pueden, por ejemplo, analizar en líquido o solución, por ejemplo, directamente después de la tinción. Alternativamente, las muestras se pueden almacenar por algún tiempo hasta el análisis. Para tal almacenamiento, la muestra teñida se puede, por ejemplo, cubrir con un cubreobjetos, o se puede montar con medios de montaje acuosos o no acuosos. Si se usa un medio de montaje, la muestra se puede cubrir opcionalmente con un cubreobjetos, en particular si es necesario almacenar las muestras por un largo período de tiempo. Este enfoque típicamente permite una conservación estable y un almacenamiento prácticamente permanente de la muestra. Los ejemplos de medios de montaje acuosos adecuados incluyen aquatex, gelatina, glicerol, gelatina de glicerol de Kaiser, y sorbitol F líquido E420. Los ejemplos adecuados de medios de montaje no acuosos incluyen DPX (por sus siglas en inglés), medio entellan de montaje rápido, cubreobjetos líquido M-Glas, y medio de montaje anhidro neo-mount. En realizaciones adicionales, las células se pueden fijar con cualquier método y reactivo de fijación adecuados. Por ejemplo, se puede usar glutaraldehído.

10

15

Se puede obtener más información de fuentes bibliográficas adecuadas, tal como el documento H44-A2 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute) sobre "Methods for Reticulocyte Counting (Automated Blood Cell Counters, Flow Cytometry, and Supravital Dyes); Approved Guideline - Second Edition", o cualquier edición adicional.

20

Después de la tinción y el almacenamiento opcional, la mezcla se puede colocar en un portador adecuado para los pasos de análisis posteriores, se puede analizar *in situ*, o se puede transferir a un dispositivo de análisis. Alternativamente, la tinción se puede realizar en el mismo dispositivo de análisis en el cual se realiza el análisis subsecuente.

25

En una realización muy específica, el procedimiento de tinción de acuerdo con la presente invención puede ir acompañado o ser precedido por un entrecruzamiento de ácidos nucleicos por separado. Tal entrecruzamiento se puede, por ejemplo, realizar con cualquier reactivo de entrecruzamiento adecuado conocido por un experto en la técnica. Los ejemplos de tales reactivos incluyen mostazas nitrogenadas, es decir, agentes alquilantes con una estructura central de bis-(2-etilcloro)amina con un grupo R variable, tal como ciclofosfamida, clorambucilo, uramustina, melfalán, o bendamustina. Otros ejemplos incluyen *cis*-diaminodicloroplatino (II), es decir, *cis*-platino, que es capaz de formar entrecruzamientos intra o intercatenarios. Además se contemplan variantes o derivados de *cis*-platino. Otro ejemplo es la cloroetilnitrosourea (CENU), en particular la carmustina (BCNU, por sus siglas en inglés). También se contemplan otros agentes de entrecruzamiento, tales como psoralenos o mitomicina C. El uso de un paso de entrecruzamiento puede ir seguido de un paso de tinción que se puede realizar al mismo tiempo. En realizaciones adicionales, el uso de un reactivo de reticulación también se puede combinar con la tinción con un colorante no aglutinante, por ejemplo, un colorante supravital no aglutinante o un colorante fluorescente no aglutinante.

30

35

Subsecuente al paso de tinción, se ilumina la muestra teñida. La iluminación se realiza con un haz de luz en un dispositivo de detección de luz. Se contempla que se use luz en el intervalo de 200 nm a 780 nm. La longitud de onda de la luz se puede adaptar a uno o más factores, por ejemplo, la naturaleza del colorante y su longitud de onda de excitación, la forma del dispositivo de detección de luz y su espectro funcional. El término "dispositivo de detección de luz", como se usa en la presente, se refiere a cualquier sistema óptico que sea capaz de detectar y visualizar la luz reflejada a partir la muestra, en particular las células de la muestra, tales como los reticulocitos. El sistema de detección de luz es, en realizaciones preferidas, un microscopio o sistema de microscopio que es capaz de visualizar y/o caracterizar células por fluorescencia. Puede comprender una fuente de luz o estar conectado a una fuente de luz, que puede ser un láser o una fuente de luz para detección visual. El láser puede, en particular, ser un láser que permita estimular el reactivo colorante fluorescente, preferiblemente los reactivos colorantes fluorescentes como se menciona en la presente. El sistema de microscopio puede ser así un sistema capaz de microscopía de fluorescencia. El sistema de microscopio puede recibir de la muestra, por ejemplo, una célula a analizar, una forma de reflejo visual, y/o una reacción fluorescente a la estimulación. El microscopio puede comprender además elementos conocidos por el experto en la técnica como, por ejemplo, elementos ópticos de enfoque que pueden estar diseñados como lentes, y/o diafragmas. El sistema de microscopio puede estar conectado además a un módulo de evaluación, un módulo de obtención de imágenes, un módulo de AI (por sus siglas en inglés), o una red neuronal, un sistema informático, una red o interfaz informática, una base de datos, un depósito de imágenes, o un sistema hospitalario o de laboratorio. En realizaciones específicas, el sistema de microscopio se puede comprender o se puede construir esencialmente sobre un citómetro de flujo o un sistema que comprende una función de citometría de flujo, en particular cuando se usan colorantes fluorescentes. Los ejemplos de sistemas de citometría de flujo contemplados por la presente invención incluyen Siemens ADVIA 2120i, serie Sysmex XN, serie Sysmex XE, Abbott Diagnostics Cell-DYN Sapphire, y Beckman Coulter HmX. Se prefiere especialmente usar el sistema Siemens ADVIA 2120i. Estos sistemas se pueden, en realizaciones adicionales, combinar con otros sistemas o componentes o unidades de otros sistemas, o componentes o unidades individuales adicionales.

40

45

50

55

60

Tras la iluminación de las muestras teñidas dentro de un reticulocito, se vuelve detectable un retículo o estructura de red reticular. Esta estructura puede tener diferentes formas, tamaños de área, perímetros y una densidad óptica diferente, que depende del estado de desarrollo del reticulocito. Típicamente, el reticulocito se puede clasificar de acuerdo con las

65

siguientes 4 clases (Heilmeyer): clase 1 = reticulocitos inmaduros con retículo denso, clase 2 = reticulocitos con red reticular extensa pero laxa, clase 3 = reticulocitos con red de retículo disperso, y clase 4 = reticulocitos maduros con gránulos de retículo dispersos. En la figura 1 se proporcionan ejemplos de clase 1 a 4 de acuerdo con Heilmeyer.

5 En otro paso central del método de la presente invención, para cada reticulocito se determinan los parámetros que permiten una decisión métrica e imparcial de la clase y, por lo tanto, del estado de desarrollo del reticulocito. Estos parámetros son una fracción (Λ) del área del retículo (A_r) al área total de la célula (A_c), y una fracción (Γ) del perímetro del retículo (U_r) al área del retículo (A_r).

10 La fracción (Λ) de la fracción del área del retículo (A_r) al área total de la celda (A_c) se puede determinar como:

$$\Lambda = \frac{\sum_i A_{r,i}}{A_c}$$

15 en donde $A_{r,i}$ es el área de todas las áreas de ácido nucleico teñidas individuales, es decir, de todas las partes individuales del retículo o red reticular dentro de un reticulocito; y en donde A_c es el área de todo el reticulocito en el cual se midió el área $A_{r,i}$ y en el cual se midió la fracción Γ .

La fracción (Γ) del perímetro del retículo (U_r) al área del retículo (A_r) se puede determinar como:

$$\Gamma = \frac{\sum_i U_{r,i}}{\sum_i A_{r,i}}$$

20 en donde $U_{r,i}$ es el perímetro de todas las áreas de ácido nucleico teñidas individuales, es decir, de todas las partes individuales del retículo o red reticular dentro de un reticulocito; y en donde $A_{r,i}$ es el área de todas las áreas individuales de ácido nucleico teñidas, es decir, de todas las partes individuales del retículo o red reticular dentro del reticulocito en el cual se midió $U_{r,i}$ y en el cual se determinó la fracción Λ .

Los valores obtenidos correspondientemente se guardan, por ejemplo, en sistema informático y/o módulo de evaluación y/o base de datos, etc. para los subsecuentes procesos de comparación o evaluación.

30 Típicamente, las partes del retículo o partes de la red reticular que son más pequeñas que aproximadamente 200 nm pueden no ser detectables en el contexto de la presente invención, en particular cuando se usan técnicas de microscopio, como se describe en la presente. Por consiguiente, se puede establecer un límite para la detectabilidad de las áreas del retículo en aproximadamente 0,15 μm^2 .

35 En un paso subsecuente, el reticulocito se clasifica por madurez en 1 a 4 clases principales de madurez. Esta clasificación se realiza de acuerdo con los valores determinados para Λ y Γ , como se define anteriormente.

Ventajosamente, el cálculo del perímetro de todos los fragmentos de ácido nucleico, en particular los fragmentos de ARN, U_r y la división por el área del retículo A_r permitieron aumentar significativamente la exactitud de la clasificación de los reticulocitos en las clases 1 a 4, como se define anteriormente. Además, el uso del perímetro dentro de la fórmula, es decir, para la clasificación por madurez, permitió distinguir ventajosamente entre las células que tienen menos partículas con áreas reticulares más grandes en comparación con las células que tienen más partículas con áreas más pequeñas. Este enfoque novedoso, por lo tanto, proporciona por primera vez una métrica adecuada que traduce las observaciones morfológicas de Heilmeyer en un algoritmo automatizable, que permite una clasificación por madurez de reticulocitos muy exacta. Por lo tanto, la presente invención proporciona un enfoque de análisis cuantitativo, mientras que los enfoques morfológicos son cualitativos y, por lo tanto, transmiten un fuerte sesgo subjetivo, lo que disminuye su comparabilidad.

40 En una realización particularmente preferida, la clasificación por madurez de los reticulocitos se basa en el uso del valor de Λ/Γ . Esta relación combina ambos valores de fracción y permite una traducción adecuada a valores distintivos, como se puede derivar de la figura 3. Por consiguiente, la clasificación por madurez comprende una asignación de reticulocitos a la clase 1, 2, 3 o 4 de Heilmeyer de acuerdo con la relación de Λ/Γ .

55 La relación de Λ/Γ puede tener diferentes valores que están influenciados por varios factores, tal como el sistema de detección de luz usado, el protocolo de tinción usado, la calidad y la edad de las células examinadas, los posibles pasos de pretratamiento, etc. Tales diferencias se pueden compensar con un enfoque de calibración adecuado, como es sabido por el experto en la técnica. La calibración puede, por ejemplo, incluir el uso de un número predefinido de reticulocitos, condiciones de tinción estándar para el análisis en diferentes sistemas de detección de luz, etc. En ciertas realizaciones, las soluciones de calibración disponibles en el mercado se pueden usar con fines de calibración y referencia. Los ejemplos de soluciones de calibración correspondientemente contempladas son Cal-Chex, Cal-Chex A-Plus, o Retic-Chex, etc.,
60 fabricados por Streck, Inc.

En una realización más preferida, la relación de Λ/Γ se puede usar para clasificar los reticulocitos de acuerdo con los siguientes valores: Una relación de Λ/Γ de aproximadamente $> 2,5$ es indicativa de reticulocitos de clase 1, es decir, de reticulocitos inmaduros con retículo denso. El valor de aproximadamente 2,5 constituye así un valor límite entre la clase 1 y la clase 2, que muestra una relación de Λ/Γ menor a aproximadamente 2,5.

5

Un valor de Λ/Γ de aproximadamente 1 a aproximadamente 2,5 es indicativo de reticulocitos de clase 2, es decir, de reticulocitos con red reticular extensa pero laxa. El valor de aproximadamente 1 constituye así un valor límite entre la clase 2 y la clase 3, que muestra una relación de Λ/Γ menor a aproximadamente 1.

10

Un valor de Λ/Γ de aproximadamente 0,35 a aproximadamente 1 es indicativo de reticulocitos de clase 3, es decir, de reticulocitos con red de retículo disperso. El valor de aproximadamente 0,35 constituye así un valor límite entre la clase 3 y la clase 4, que muestra una relación de Λ/Γ menor a aproximadamente 0,35.

15

Un valor de Λ/Γ de aproximadamente $< 0,35$ es indicativo de reticulocitos de clase 4, es decir, de reticulocitos maduros con gránulos de retículo dispersos.

El valor límite indicado puede cambiar ligeramente por un factor de tolerancia de $\pm 25\%$, preferiblemente por un factor de tolerancia de $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, más preferiblemente por un factor de tolerancia de $\pm 5\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, o $\pm 0,5\%$ debido a las tolerancias de medición óptica, por ejemplo, para equipos analíticos diferentes, o debido a diferencias de tinción, o debido a diferencias en segmentaciones celulares o de retículo basadas en diferentes programas o algoritmos, etc.

20

La presente invención contempla además proporcionar clases límite entre las clases 1 y 2; 2 y 3; 3 y 4. Estos límites pueden comprender reticulocitos para los cuales la clasificación en las clases 1 o 2; 2 o 3; o 3 o 4 no es posible o es ambigua, por ejemplo, debido al valor de Λ/Γ correspondiente a los valores límite mencionados. Las clases límite se pueden establecer además en base a la aplicación de un factor de tolerancia, como se mencionó anteriormente en la definición de clase proporcionada anteriormente. Además, se contempla que se pueda realizar una reincorporación de las clases límite con las clases 1 a 4 con la ayuda de un factor de calibración adecuado, por ejemplo, después de experimentos de calibración o comparación, y cálculos teniendo en cuenta las diferencias ópticas y químicas en la tinción y la detección de reticulocitos. Se puede obtener más información de fuentes bibliográficas adecuadas, tal como, Samuel M. Rapoport, 2019, *The reticulocyte*, 1st ed., CRC Press.

25

30

La presente invención se relaciona además con un método que comprende un paso de enumerar los reticulocitos. El término "enumerar", como se usa en la presente, significa contar y sumar el número de reticulocitos por área definida, volumen, período de tiempo, u otra unidad adecuada, preferiblemente por volumen definido, por ejemplo, volumen de la muestra. En ciertas realizaciones, la enumeración se puede realizar por clase de reticulocitos como se define en la presente. Por ejemplo, se pueden contar todos los reticulocitos de las clases 1, 2, 3 y/o 4 de una muestra. En realizaciones específicas adicionales, la enumeración puede incluir además un recuento de no reticulocitos en la muestra, preferiblemente de eritrocitos. El número correspondiente se puede comparar además con el número de reticulocitos, el número de reticulocitos en la clase 1, 2, 3 o 4 y/o resultados de recuentos anteriores, por ejemplo, del mismo sujeto, una muestra diferente del mismo sujeto, un valor de referencia de una base de datos, una referencia de calibración como se menciona en la presente, un valor de referencia de un libro de texto u otra fuente bibliográfica, un valor de referencia de un sujeto sano o enfermo determinado independientemente, etc. Se puede encontrar un ejemplo de una fuente en línea adecuada que proporcionó detalles adicionales en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/61756> (última visita el 28 de septiembre de 2020).

35

40

45

En otra realización particularmente preferida, la presente invención contempla un método como se define anteriormente, en donde el paso (c), es decir, determinar para cada reticulocito de los parámetros de (i) una fracción (Λ) del área del retículo (A_r) al total área celular (A_c); y (ii) una fracción (Γ) del perímetro del retículo (U_r) al área del retículo (A_r) se realiza con un dispositivo que comprende un módulo obtención de imagen.

50

El término "módulo de obtención de imágenes", como se usa en la presente, se refiere a una unidad que es capaz de realizar procedimientos de procesamiento de imágenes. Por consiguiente, la presente invención contempla adquirir imágenes de reticulocitos u otros componentes celulares presentes en una muestra, como se describe en la presente, preferiblemente de reticulocitos teñidos presentes en una muestra, como se describe en la presente. Esta adquisición de imágenes puede incluir además actividades de preprocesamiento o escalamiento.

55

Además, la presente invención contempla específicamente un procesamiento de imágenes de dichas imágenes adquiridas. El término "procesamiento de imágenes", como se usa en la presente, se refiere a métodos generales para convertir una imagen en un formato digital y realizar operaciones en ella para mejorar la imagen y/o extraer información útil o deseada. La salida del procesamiento de imágenes puede ser una imagen modificada, o características o valores modificados, asociados con la imagen.

60

Los módulos de imágenes de acuerdo con la presente invención están diseñados para ser capaces del procesamiento de imágenes, en algunas realizaciones junto con otros módulos, programas, bases de datos, repositorios de imágenes, o redes, etc.

65

El procesamiento de imágenes puede comprender una o más de las siguientes actividades, funciones o procedimientos: mejora de la imagen, incluido el ajuste del brillo o el contraste; onduladas y procesamiento multiresolución incluyendo subdivisión de imágenes y representación piramidal; actividades de compresión, incluidas técnicas para reducir el almacenamiento necesario para guardar una imagen o el ancho de banda para transmitirla; procesamiento morfológico que incluye la extracción de componentes de imagen necesarios para la representación o descripción de la geometría, información del área o información del perímetro de una célula o un componente celular; segmentación, es decir, una partición de una imagen en sus partes constituyentes u objetos; representación de los datos proporcionados en el paso de segmentación; descripción, es decir, extracción de atributos de datos segmentados, incluido el suministro de datos cuantitativos que permitan diferenciar una clase de objetos de otra; reconocimiento de objetos, es decir, la asignación de etiquetas a objetos en función de su descripción. Estas actividades, funciones o procedimientos se pueden realizar preferiblemente de forma automática o programada, por ejemplo, en base al uso de programas informáticos o módulos de AI adecuados. Se prefiere particularmente que el módulo de obtención de imágenes esté diseñado para realizar operaciones de segmentación morfológica, es decir, la extracción de componentes de la imagen y su partición en partes constituyentes u objetos, por ejemplo, estructuras de retículo, estructuras de red reticular, perímetros celulares, áreas celulares, áreas de retículo, perímetros de retículo, intensidades de tinción dentro del retículo, diferencias en las intensidades de tinción dentro del retículo, etc.

En otra realización preferida de la presente invención, el método descrito anteriormente comprende como paso adicional un paso (e) que comprende una comparación morfológica de cada reticulocito teñido con un depósito de imágenes de reticulocitos que han sido clasificados independientemente por un experto. El término "comparación morfológica", como se usa en la presente, se refiere a una actividad de comparación y contraste con respecto a una o más de las características de estructura, geometría, forma, tamaño, presencia de patrones, representación óptica/visual, contraste, color o densidad de tinción, etc., asociados con una célula, en particular con un reticulocito presente en una muestra, o más preferiblemente una parte subcelular, por ejemplo, un retículo o red reticular. La comparación comprende la comparación y el contraste de imágenes, preferiblemente imágenes que han sido procesadas en un módulo de obtención de imágenes, como se describe en la presente, con imágenes o datos que han sido previamente o alternativamente clasificados en las clases 1 a 4 de acuerdo con Heilmeyer por un experto, y que han sido almacenadas junto con la información de clasificación en un repositorio de imágenes. Estas imágenes almacenadas pueden haber experimentado además un procesamiento de imágenes similar o idéntico al procesamiento de imágenes realizado con las imágenes de reticulocitos obtenidas de acuerdo con el método de la presente invención.

Se prefiere particularmente que dicha comparación morfológica comprenda la aplicación de una imagen del reticulocito teñido a un método basado en aprendizaje automático. El concepto de "aprendizaje automático", como se usa en el contexto de la presente invención, se basa típicamente en un enfoque de dos pasos: primero, una fase de entrenamiento; y segundo, una fase de predicción. En la fase de entrenamiento, los valores de uno o más parámetros del modelo de aprendizaje automático (MLM, por sus siglas en inglés) se establecen usando técnicas de entrenamiento y datos de entrenamiento. En la fase de predicción, el MLM entrenado opera con datos de medición. Los parámetros de ejemplo de un MLM incluyen: pesos de neuronas en una capa dada de una red neuronal artificial (ANN, por sus siglas en inglés) como una red neuronal convolucional (CNN, por sus siglas en inglés); valores del núcleo de un núcleo de un clasificador, etc.

La construcción de un MLM puede incluir la fase de entrenamiento para determinar los valores de los parámetros. Se prefiere particularmente que el entrenamiento se realice con imágenes de un depósito de imágenes de reticulocitos. Como se mencionó anteriormente, dichas imágenes del repositorio ventajosamente han sido clasificadas independientemente por un experto. El experto puede ser, por ejemplo, un histólogo o un hematólogo. El experto puede, en otras realizaciones, ser también un grupo de expertos que ajustan o armonizan su clasificación subjetiva. Los resultados correspondientes, es decir, el etiquetado de imágenes de reticulocitos de clase 1, 2, 3 o 4, se almacenan posteriormente en el depósito de imágenes, por ejemplo, junto con la imagen. Esta información puede ser recuperada y usada por el MLM como conjunto de entrenamiento.

La construcción de un MLM generalmente también puede incluir la determinación de valores de uno o más hiperparámetros. Típicamente, los valores de uno o más hiperparámetros del MLM se establecen y no se modifican durante la fase de entrenamiento. Por lo tanto, el valor del hiperparámetro se puede modificar en las iteraciones del ciclo externo; mientras que el valor del parámetro del MLM se puede modificar en las iteraciones del ciclo interno. A veces, puede haber múltiples fases de entrenamiento, de modo tal que se puedan probar o incluso optimizar múltiples valores de uno o más hiperparámetros. El rendimiento y la exactitud de la mayoría de los MLM dependen en gran medida de los valores de los hiperparámetros.

Los hiperparámetros de ejemplo incluyen: número de capas en una red neuronal convolucional; tamaño del núcleo de un núcleo clasificador; neuronas de entrada de una ANN; neuronas de salida de una ANN; número de neuronas por capa; tasa de aprendizaje, etc.

Se pueden usar varios tipos y tipos de MLM en el contexto de la presente invención. Por ejemplo, se puede emplear un detector de novedades MLM/detector de anomalías MLM, o un clasificador MLM, por ejemplo, un clasificador binario. Por ejemplo, se puede emplear un MLM de aprendizaje profundo (DL, por sus siglas en inglés): en la presente, los atributos

detectados por el DL-MLM pueden no estar predefinidos, sino que se pueden establecer por los valores de los parámetros respectivos del modelo que se pueden aprender durante el entrenamiento.

Para construir el MLM se pueden usar varias técnicas. Por ejemplo, el tipo de capacitación puede variar con el tipo de MLM. Además, el tipo de entrenamiento empleado puede variar en diferentes implementaciones. Por ejemplo, se podría usar una optimización iterativa que usa una función de optimización que se define con respecto a una o más señales de error.

El resultado de la operación de comparación morfológica para cada reticulocito teñido, como se describe anteriormente, se compara posteriormente con el resultado de la clasificación de acuerdo con el enfoque métrico de Λ y Γ de acuerdo con la invención, como se define anteriormente. En caso de que ambos enfoques de clasificación coincidan, no es necesario un etiquetado, alerta o comentario específico. La consistencia se puede, en ciertas realizaciones, almacenar como "clasificación métrica confirmada por morfología" o similar. En caso de falta de coherencia entre el resultado del enfoque métrico de Λ y Γ y el enfoque morfológico, se adjunta una etiqueta a la imagen (por ejemplo, imagen en vivo o almacenada) del reticulocito para el cual se detectó una diferencia. Este etiquetado puede llevar además a una alerta o mensaje a un operador para analizar más a fondo el resultado obtenido. Alternativamente, se puede iniciar una repetición del análisis métrico y morfológico para confirmar el resultado. El etiquetado puede comprender además una clasificación interna de acuerdo con las diferencias medidas. Por ejemplo, en caso de que la clase Heilmeyer definida por el enfoque métrico difiera en 1 de la clase definida por el enfoque morfológico, por ejemplo, clase definida métricamente = 2, clase definida morfológicamente = 1, o viceversa, etc., se adjunta un valor interno de 1 (= grado de diferencia) a la etiqueta. En caso de que la clase Heilmeyer definida por el método métrico difiera en más de 1, por ejemplo, 2, de la clase definida por el enfoque morfológico, por ejemplo, clase definida métricamente = 3, clase definida morfológicamente = 1, o viceversa, se adjunta un valor interno de 2 (= grado de diferencia) a la etiqueta. Las operaciones de análisis y/o control adicionales, que también pueden incluir la verificación del equipo, los dispositivos ópticos, el depósito de imágenes, etc., se pueden realizar de acuerdo con el grado de diferencia.

Para clasificaciones divergentes que tienen un grado de diferencia de 1, la presente invención contempla en un grupo específico de realizaciones una selección de los resultados obtenidos métricamente. Para clasificaciones divergentes que tienen un grado de diferencia de 2, la presente invención contempla en un grupo específico de realizaciones una selección de una clasificación que está entre las clases definidas métrica y morfológicamente. La presente invención contempla además para clasificaciones divergentes un etiquetado de la muestra que comprenda los resultados divergentes y un análisis independiente de la muestra, o un análisis adicional, por ejemplo, paralelo, de la muestra del mismo sujeto con un método de análisis o preparación diferente, por ejemplo, basado en un frotis de sangre.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método implementado informáticamente para la clasificación por madurez de reticulocitos a partir de una o más imágenes tomadas de una muestra de sangre total, como se define anteriormente. El método comprende determinar dentro de una imagen para cada reticulocito los parámetros de (i) una fracción (Λ) del área del retículo (A_r) al área de la célula completa (A_c); y (ii) una fracción (Γ) del perímetro del retículo (U_r) al área del retículo (A_r); y clasificar por madurez un reticulocito en 4 clases principales de acuerdo con los valores de Λ y Γ . El método además, en algunas realizaciones, incluye un paso de enumerar de los reticulocitos, preferiblemente como se define anteriormente en la presente. El método comprende pasos de adquisición de imágenes y procesamiento de imágenes, como se define anteriormente en la presente. En ciertas realizaciones, también se pueden implementar y realizar imágenes de comparación morfológica con un depósito de imágenes de reticulocitos, como se define anteriormente en la presente. El método se puede implementar en cualquier plataforma informática o de almacenamiento adecuada, por ejemplo, estar basado en la nube, basado en Internet, basado en intranet, o presente en un ordenador local o teléfonos móviles, etc.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un dispositivo de procesamiento de datos que comprende medios para llevar a cabo el método implementado informáticamente, como se define anteriormente. El dispositivo comprende medios para llevar a cabo uno o más pasos cualquiera del método implementado informáticamente de la presente invención, como se menciona anteriormente en la presente. Por consiguiente, cualquiera de los métodos implementados informáticamente descritos en la presente se puede realizar total o parcialmente con un sistema informático que incluye uno o más procesadores, que se pueden configurar para realizar los pasos. Por consiguiente, algunas de las presentes realizaciones están dirigidas a sistemas informáticos configurados para realizar los pasos de cualquiera de los métodos implementados informáticamente descritos en la presente, potencialmente con diferentes componentes que realizan los pasos respectivos o un grupo respectivo de pasos. Los pasos correspondientes de los métodos se pueden realizar además al mismo tiempo o en un orden diferente. Adicionalmente, partes de estos pasos se pueden usar con partes de otros pasos de otros métodos. Además, todo o porciones de un paso pueden ser opcionales. Adicionalmente, cualquiera de los pasos de cualquiera de los métodos se puede realizar con módulos, circuitos u otros medios para realizar estos pasos.

También se contempla un programa informático que comprende instrucciones que, cuando el programa es ejecutado por un ordenador, hacen que el ordenador lleve a cabo cualquiera de los métodos implementados informáticamente de la invención, como se define en la presente, o uno o más pasos computarizados de los métodos de la presente invención, como se menciona en la presente.

También se contempla la provisión de un medio de almacenamiento legible informáticamente, que comprende un producto

de programa informático, como se define anteriormente. El medio de almacenamiento legible informáticamente puede estar conectado a un elemento de un servidor, o estar presente en una estructura de nube, o estar conectado a través de Internet o intranet a una o más estructuras de bases de datos, o bases de datos de clientes, etc.

5 Cualquiera de los componentes de software o programas informáticos o funciones descritos en la presente se puede implementar como código de software para ser ejecutado por un procesador que use cualquier lenguaje informático adecuado, tales como, por ejemplo, Java, Python, Javascript, VB.Net, C++, C#, C, Swift, Rust, Objective-C, Ruby, PHP, o Perl, usando, por ejemplo, técnicas convencionales u orientadas a objetos. El código de software se puede almacenar como una serie de instrucciones o comandos en un medio legible informáticamente para almacenamiento y/o transmisión, los medios adecuados incluyen memoria de acceso aleatorio (RAM, por sus siglas en inglés), una memoria solamente de lectura (ROM, por sus siglas en inglés), un medio magnético como un disco duro, o un medio óptico como un disco compacto (CD, por sus siglas en inglés) o DVD (disco versátil digital, por sus siglas en inglés), una memoria flash, y similares. El medio legible informáticamente puede ser cualquier combinación de dichos dispositivos de almacenamiento o transmisión. Tales programas también se pueden codificar y transmitir usando señales portadoras adaptadas para la transmisión mediante redes alámbricas, ópticas y/o inalámbricas que se ajusten a una variedad de protocolos, incluido Internet. Como tal, se puede crear un medio legible informáticamente de acuerdo con la presente invención usando una señal de datos codificada con tales programas. Los medios legibles informáticamente codificados con el código del programa se pueden empaquetar con un dispositivo compatible, o proporcionar por separado de otros dispositivos (por ejemplo, mediante una descarga de Internet). Cualquier medio legible informáticamente puede residir en o dentro de un único producto de programa informático (por ejemplo, un disco duro, un CD, o un sistema informático completo), y puede estar presente en o dentro de diferentes productos de programa informático dentro de un sistema o red. Un sistema informático puede incluir un monitor, una impresora u otra pantalla adecuada para proporcionar a un usuario cualquiera de los resultados mencionados en la presente.

25 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para monitorear y determinar el estado de salud de un sujeto y/o la reacción de un sujeto a un tratamiento. Este método comprende la realización de un método de clasificación de reticulocitos a partir de una muestra de sangre total de un sujeto, como se define en la presente. Se prefirió particularmente que los métodos incluyeran el paso de enumerar reticulocitos sobre la muestra completa y/o por clases, como se define en la presente. Subsecuente a la realización de una clasificación de reticulocitos en la muestra y opcionalmente una enumeración, se puede realizar una comparación de los resultados obtenidos con uno o varios valores o números de referencia. Por ejemplo, los números obtenidos de reticulocitos por volumen de muestra, o por clase por volumen de muestra se pueden comparar con los números obtenidos de un sujeto normal o sano. Además, se pueden comparar con números obtenidos de sujetos a los cuales se les ha diagnosticado enfermedades específicas, por ejemplo, una enfermedad que tiene influencia sobre la eritropoyesis, el ciclo de las células sanguíneas, o el número de células sanguíneas en general, por ejemplo, anemia o trastornos de la médula ósea. En realizaciones adicionales, los números se pueden comparar con números de referencia de bases de datos, libros de texto, fuentes bibliográficas, documentos de hospitales, etc.

40 El término "estado de salud", como se usa en la presente, se refiere a la presencia o ausencia de una enfermedad en un sujeto, por ejemplo, en comparación con un individuo sano. En ciertas realizaciones, el término se puede relacionar además con una tendencia de desarrollo de la salud, tal como el deterioro o la mejora de una situación médica o una situación de enfermedad.

45 En ciertas realizaciones, el método para monitorear o determinar el estado de salud de un sujeto puede resultar en un número total de reticulocitos en una muestra que es menor que el número de reticulocitos en una muestra de referencia de un sujeto sano, o que resulta en un número de reticulocitos en la clase 1 que es menor que el número de reticulocitos en una muestra de referencia de un sujeto sano en la misma clase 1, mientras que las otras clases muestran números similares en la muestra examinada y la de referencia; o que resulte en un número de reticulocitos de clase 2 menor al número de reticulocitos de una muestra de referencia de un sujeto sano de la misma clase 2, mientras que las demás clases muestran números similares en la muestra examinada y la de referencia; o que resulte en un número de reticulocitos de clase 3 menor al número de reticulocitos de una muestra de referencia de un sujeto sano de la misma clase 3, mientras que las demás clases muestran números similares en la muestra examinada y en la de referencia; o que resulte en un número de reticulocitos de la clase 4 menor al número de reticulocitos de una muestra de referencia de un sujeto sano de la misma clase 4, mientras que las demás clases muestran números similares en la muestra examinada y en la de referencia; o que resulte en un número de reticulocitos de clase 1 y 2, o de clase 2 y 3, o de clase 3 y 4, o de clase 1 y 3, o de clase 2, 3 y 4 menor al número de reticulocitos en una muestra de referencia de un sujeto sano en las clases correspondientes, mientras que las otras clases muestran números similares en la muestra examinada y la de referencia. Estos resultados se pueden considerar indicativos de insuficiencia de la médula ósea, por ejemplo, debido a fármacos, tumor, radioterapia o infección; cirrosis del hígado; anemia, que puede ser causada por niveles bajos de hierro, o niveles bajos de vitamina B12, o folato; o enfermedad renal crónica. Estas enfermedades se entienden como "enfermedades de reticulocitos bajos" en el contexto de la presente invención.

65 En ciertas realizaciones, el método para monitorear o determinar el estado de salud de un sujeto puede resultar en un número total de reticulocitos en una muestra que es mayor al número de reticulocitos en una muestra de referencia de un sujeto sano, o que resulta en un número de reticulocitos en la clase 1 que es mayor que el número de reticulocitos en una muestra de referencia de un sujeto sano en la misma clase 1, mientras que las otras clases muestran números similares

en la muestra examinada y la de referencia; o que resulta en un número de reticulocitos en la clase 2 mayor al número de reticulocitos en una muestra de referencia de un sujeto sano en la misma clase 2, mientras que las otras clases muestran números similares en la muestra examinada y la muestra de referencia; o que resulta en un número de reticulocitos en la clase 3 mayor al número de reticulocitos en una muestra de referencia de un sujeto sano en la misma clase 3, mientras que las otras clases muestran números similares en la muestra examinada y la muestra de referencia; o que resulta en un número de reticulocitos en la clase 4 mayor al número de reticulocitos en una muestra de referencia de un sujeto sano en la misma clase 4, mientras que las otras clases muestran números similares en la muestra examinada y la muestra de referencia; o que resulta en un número de reticulocitos de clase 1 y 2, o de clase 2 y 3, o de clase 3 y 4, o de clase 1, 2 y 3, o de clase 2, 3 y 4 mayor a el número de reticulocitos en una muestra de referencia de un sujeto sano en las clases correspondientes, mientras que las otras clases muestran números similares en la muestra examinada y la de referencia. Estos resultados se pueden considerar indicativos de anemia, que se puede deber a que los glóbulos rojos se destruyen antes de lo normal (es decir, anemia hemolítica); sangrado; trastorno de la sangre en un feto o recién nacido (eritroblastosis fetal); o una enfermedad renal, con aumento de la producción de eritropoyetina. Estas enfermedades se entienden como "enfermedades de reticulocitos altos" en el contexto de la presente invención.

El término "reacción a un tratamiento", como se usa en la presente, se refiere a una respuesta positiva o negativa de un sujeto al tratamiento de una enfermedad que puede tener una influencia sobre la eritropoyesis o estar relacionada con cualquiera de las enfermedades mencionadas anteriormente u otras enfermedades adicionales que son diagnosticados en el mismo trastorno.

El método contemplado para el seguimiento y determinación del estado de salud de un sujeto y/o de la reacción de un sujeto a un tratamiento comprende, en ciertas realizaciones, llevar a cabo los métodos de la presente invención con más de una muestra tomada de un sujeto. Por ejemplo, se puede tomar una muestra en un momento inicial y, subsecuentemente, se puede tomar una muestra adicional después de un cierto período de tiempo. El período de tiempo puede ser cualquier período de tiempo que se considere adecuado para el experto en la técnica. El período de tiempo puede estar regido por la enfermedad o el tratamiento del sujeto, su estado de hospitalización, el estado de salud del sujeto, o cualquier otro factor de relevancia diagnóstica. En ciertas realizaciones, la muestra adicional se toma del sujeto después de un período de tiempo de 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días. También se contemplan 10 días, 14 días, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o más.

La comparación de los procedimientos de enumeración y clasificación con muestras tomadas de un sujeto en diferentes momentos puede resultar en un número similar y/o distribución de clases de reticulocitos, o un mayor número de reticulocitos en general o dentro de una o más clases, o un número reducido de reticulocitos en general o dentro de una o más clases. Los resultados correspondientes se pueden entonces usar para una atribución a una conclusión diagnóstica.

Por ejemplo, un aumento en el número de reticulocitos en general o de clase 2, 3 o 4 cuando se compara una muestra inicial y una subsecuente es indicativo de una mejora en la salud del sujeto y/o una respuesta positiva al tratamiento en caso de una enfermedad de reticulocitos bajos, tal como insuficiencia de la médula ósea, por ejemplo, debido a fármacos, tumor, radioterapia o infección; cirrosis del hígado; anemia, que puede ser causada por niveles bajos de hierro o niveles bajos de vitamina B12, o folato; o enfermedad renal crónica.

Similarmente, un aumento en el número de reticulocitos en general o de clase 2, 3 o 4 cuando se compara una muestra inicial y una subsecuente es indicativo de un deterioro de la salud del sujeto y/o una respuesta negativa al tratamiento en caso de una enfermedad de reticulocitos altos, tal como la anemia hemolítica; sangrado; trastorno de la sangre en un feto o recién nacido (eritroblastosis fetal); o una enfermedad renal, con aumento de la producción de eritropoyetina.

En una realización adicional, una disminución en el número de reticulocitos en general o de clase 2, 3 o 4 cuando se comparan una muestra inicial y una tomada subsecuentemente es indicativa de una mejora en la salud del sujeto y/o una respuesta positiva al tratamiento en caso de de una enfermedad de reticulocitos altos como la anemia hemolítica; sangrado; trastorno de la sangre en un feto o recién nacido (eritroblastosis fetal); o una enfermedad renal, con aumento de la producción de eritropoyetina.

En otra realización, una disminución en el número de reticulocitos en general o de clase 2, 3 o 4 cuando se compara una muestra inicial y una tomada posteriormente es indicativo de un deterioro de la salud del sujeto y/o una respuesta negativa al tratamiento en caso de una enfermedad de reticulocitos bajos, tal como insuficiencia de la médula ósea, por ejemplo, debido a fármacos, tumor, radioterapia o infección; cirrosis del hígado; anemia, que puede ser causada por niveles bajos de hierro o niveles bajos de vitamina B12, o folato; o enfermedad renal crónica. Se pueden derivar más detalles de la literatura adecuada o fuentes de Internet, tales como, por ejemplo, <https://www.statpearls.com/kb/viewarticle/28438> (última visita el 28 de septiembre de 2020).

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un dispositivo que comprende medios para llevar a cabo el método de acuerdo con la invención. Por consiguiente, el dispositivo puede comprender un módulo capaz de realizar actividad de tinción como se define anteriormente en la presente. El módulo de tinción puede comprender elementos para la preparación de células, clasificación de células, purificación de células, tratamiento químico, tinción, lavado, etc., y opcionalmente funciones de almacenamiento. Este módulo puede, por ejemplo, estar compuesto por una entidad o función robótica. El dispositivo puede comprender además un módulo que es capaz de iluminar la muestra teñida. Este módulo

5 puede tener la forma de un microscopio o sistema de microscopio, y puede comprender elementos ópticos de enfoque que pueden estar diseñados como lentes, y/o diafragmas. En realizaciones específicas, el sistema de microscopio puede comprender adicionalmente o se puede construir esencialmente sobre un citómetro de flujo o un sistema que comprende una función de citometría de flujo, en particular cuando se usan colorantes fluorescentes. El módulo de microscopio se puede conectar además a un módulo de evaluación que es capaz de determinar dentro de un reticulocito los parámetros Λ y Γ , como se describe en la presente. Este módulo de evaluación se puede, por ejemplo, implementar o conectar a un módulo de imágenes como se define en la presente anteriormente, es decir, una unidad que es capaz de realizar procedimientos de procesamiento de imágenes con imágenes adquiridas de reticulocitos u otros componentes celulares presentes en una muestra, como se describe en la presente, preferiblemente de reticulocitos teñidos presentes en una muestra, como se describe en la presente. También se contempla la presencia de un módulo de clasificación por madurez que sea capaz de atribuir los valores medidos de los parámetros Λ y Γ de los reticulocitos a las clases 1 a 4 de acuerdo con Heilmeyer. Este módulo puede ser, por ejemplo, un módulo informático o un módulo de AI, o una red neuronal, un sistema informático, una red o interfaz informática, y opcionalmente, estar conectado a una base de datos, un depósito de imágenes, o un sistema hospitalario o de laboratorio.

15 Ejemplos

Ejemplo 1: Detección de reticulocitos

20 Materiales y métodos para la detección de reticulocitos

Muestras. Se extrajo sangre periférica con consentimiento informado y procedimientos aprobados por la aplicación 316_14B de la Ethikkommission der Universität Erlangen de donadores sanos. La sangre de cada muestra se recolectó en tubos recubiertos con EDTA de 4,7 mL. Todas las muestras se procesaron dentro de las 6 h posteriores a la recolección.

25 La determinación de eritrocitos no maduros se realizó por el uso de colorantes supravitales, que precipitan el ARN citoplasmático en una red similar a un retículo. Tratamos los reticulocitos con un nuevo colorante básico de azul de metileno (NMB, c = 0,5 %, Sigma-Aldrich). La solución de colorante se adicionó por 1 min a la sangre total. La generación de un frotis de sangre permitió la visualización de esta red filamentosa bajo un microscopio óptico.

30 Configuración óptica. La identificación de los reticulocitos se realizó por la grabación de imágenes de campo claro en modo de transmisión a través de un objetivo de 40x (HP PL APO 40x/0,95 CORR PH2, Leica) con una cámara (cámara RGB basada en prisma Apex 3 CMOS, JAI) instalada en un microscopio invertido DMI8, Leica.

35 Análisis estadístico. Las imágenes se analizaron usando ImageJ. La segmentación del retículo teñido se logró por la transformación de imágenes en color en RGB - imágenes en escala de grises. El algoritmo de umbralización automática se aplicó en el canal verde para determinar el área y el perímetro del retículo.

40 Las siguientes figuras (figura 1, figura 2, figura 3) se proporcionan con fines ilustrativos. Por lo tanto, se entiende que las cifras no se deben interpretar como limitantes. El experto en la técnica podrá contemplar claramente otras modificaciones de los principios expuestos en la presente.

REIVINDICACIONES

1. Un método de clasificación por madurez de reticulocitos a partir de una muestra de sangre total, que comprende:
- 5 (a) teñir la muestra con un reactivo colorante aglutinante supravital o un colorante fluorescente aglutinante;
 (b) iluminar la muestra teñida con un haz de luz, preferiblemente con un rango de longitud de onda de 200 nm a 780 nm en un dispositivo de detección de luz, preferiblemente un microscopio, para detectar reticulocitos;
 (c) determinar para cada reticulocito los parámetros de (i) una fracción (Λ) del área del retículo (Ar) al área de la célula entera (Ac); y (ii) una fracción (Γ) del perímetro del retículo (Ur) al área del retículo (Ar); y
 10 (d) clasificar por madurez un reticulocito en 1 de 4 clases principales de madurez de acuerdo con los valores determinados para Λ y Γ .
2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente como paso final un paso de enumerar los reticulocitos, en donde dicha enumeración es preferiblemente por clase y por muestra.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde dicha tinción se realiza con un reactivo colorante aglutinante supravital seleccionado entre NMB (nuevo azul de metileno), azul de cresilo brillante, violeta cristal, violeta de metilo, y azul de Nilo, en donde dicha tinción opcionalmente comprende además un paso de entrecruzamiento químico de ácidos nucleicos, preferiblemente con una mostaza nitrogenada, un *cis*-diaminodicloroplatino (II) o derivado, o cloroetilnitrosourea (CENU).
- 20 4. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde dicha tinción se realiza con un colorante fluorescente aglutinante seleccionado entre naranja de acridina, auramina O, D-metiloxacarbocianuro, bromuro de etidina, pironina Y, tioflavina-T y naranja de tiazol, en donde dicha tinción comprende opcionalmente además un paso de entrecruzamiento químico de ácidos nucleicos, preferiblemente con una mostaza nitrogenada, un *cis*-diaminodicloroplatino (II) o derivado, o cloroetilnitrosourea (CENU).
- 25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el paso (c) se realiza con un dispositivo que comprende un módulo de obtención de imágenes, preferiblemente un módulo de obtención de imágenes que está diseñado para realizar operaciones de segmentación morfológica.
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho método comprende adicionalmente como paso (e) un paso de comparación morfológica de cada reticulocito teñido con un depósito de imágenes de reticulocitos que han sido clasificados de forma independiente por un experto, que resulta preferiblemente en un etiquetado de reticulocitos para los que la clasificación morfológica difiere de la clasificación del paso (d).
- 35 7. El método de la reivindicación 6, en donde dicha comparación morfológica comprende aplicar una imagen del reticulocito teñido a un método basado en aprendizaje automático, que fue entrenado con imágenes de dicho depósito de imágenes de reticulocitos.
- 40 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la clasificación por madurez comprende una asignación de reticulocitos a la clase 1, 2, 3 ó 4 de acuerdo con la relación de Λ/Γ .
- 45 9. El método de la reivindicación 8, en donde un valor de Λ/Γ de aproximadamente $> 2,5$ es indicativo de la clase 1, un valor de Λ/Γ de aproximadamente 1 a aproximadamente 2,5 es indicativo de la clase 2, un valor de Λ/Γ de aproximadamente 0,35 a aproximadamente 1 es indicativo de la clase 3, y un valor de Λ/Γ de aproximadamente $< 0,35$ es indicativo de la clase 4.
- 50 10. Un método implementado informáticamente para la clasificación por madurez de reticulocitos a partir de una o más imágenes tomadas de una muestra de sangre total, que comprende determinar dentro de una imagen para cada reticulocito los parámetros de (i) una fracción (Λ) del área del retículo (Ar) al área de la célula completa (Ac); y (ii) una fracción (Γ) del perímetro del retículo (Ur) al área del retículo (Ar); y clasificar por madurez un reticulocito en 4 clases principales de acuerdo con los valores de Λ y Γ , comprendiendo preferiblemente adicionalmente un paso de enumerar los reticulocitos.
- 55 11. Un método *in vitro* para monitorear y determinar el estado de salud de un sujeto y/o la reacción de un sujeto a un tratamiento, que comprende la realización del método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 con una o más muestras de sangre total obtenidas de dicho sujeto.
- 60 12. El método *in vitro* de la reivindicación 11, en donde un aumento en el número de reticulocitos de clase 2, 3 o 4, preferiblemente de clase 3 o 4, más preferiblemente de clase 4, cuando se compara una muestra inicial con una segunda o más muestras tomadas del sujeto después de un período de tiempo de 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días, es indicativo de una mejora en la salud del sujeto y/o una respuesta positiva al tratamiento en enfermedades de reticulocitos bajos, o es indicativo de una deterioro de la salud del sujeto y/o una respuesta negativa al tratamiento en enfermedades de reticulocitos altos.
- 65 13. Un dispositivo de procesamiento de datos que comprende medios para llevar a cabo el método de la reivindicación 10.

- 5
14. Un dispositivo que comprende medios para llevar a cabo el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, 11 o 12, los medios para llevar a cabo el método comprenden los medios para teñir una muestra de sangre total, medios para iluminar la muestra teñida con un haz de luz, medios de detección para detectar reticulocitos, y un dispositivo de procesamiento de datos de acuerdo con la reivindicación 13.
 15. Un programa informático que comprende instrucciones que, cuando el programa es ejecutado por un ordenador, hacen que el ordenador lleve a cabo el método de la reivindicación 10.

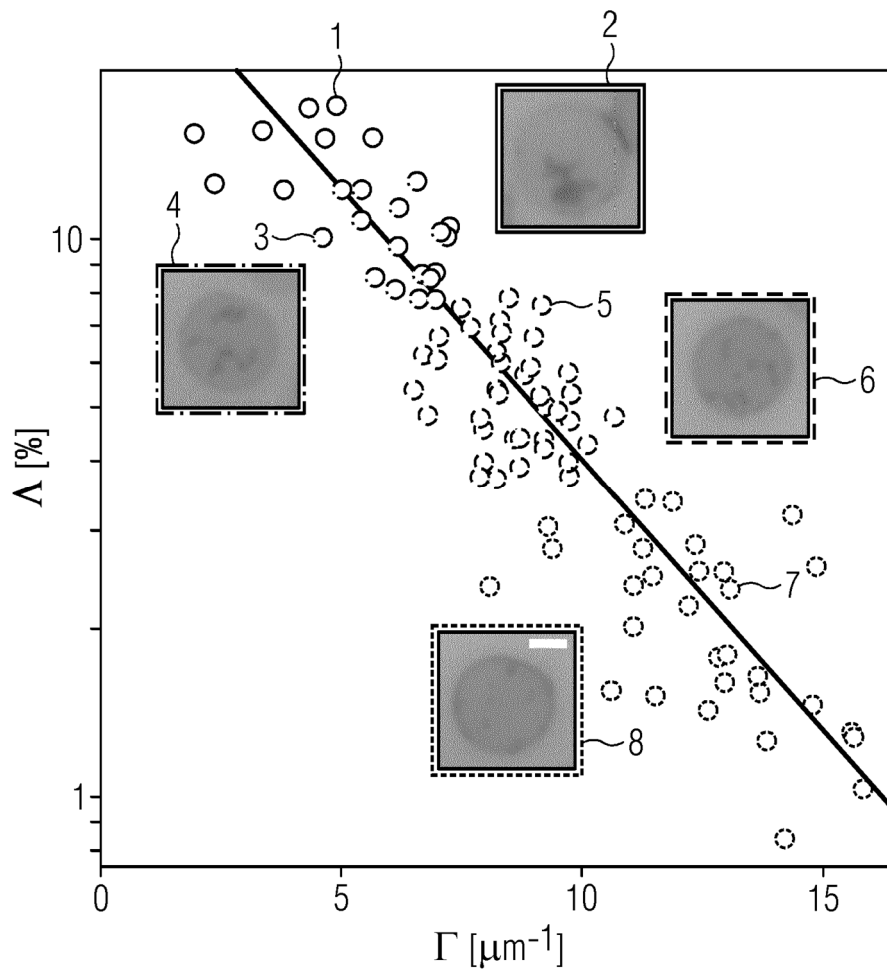


Figura 1

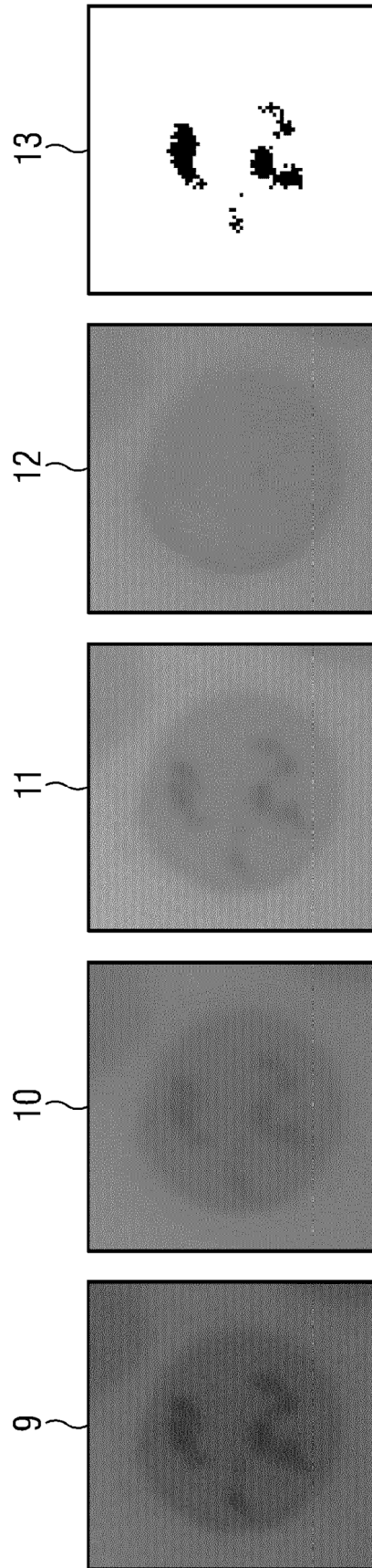


Figura 2

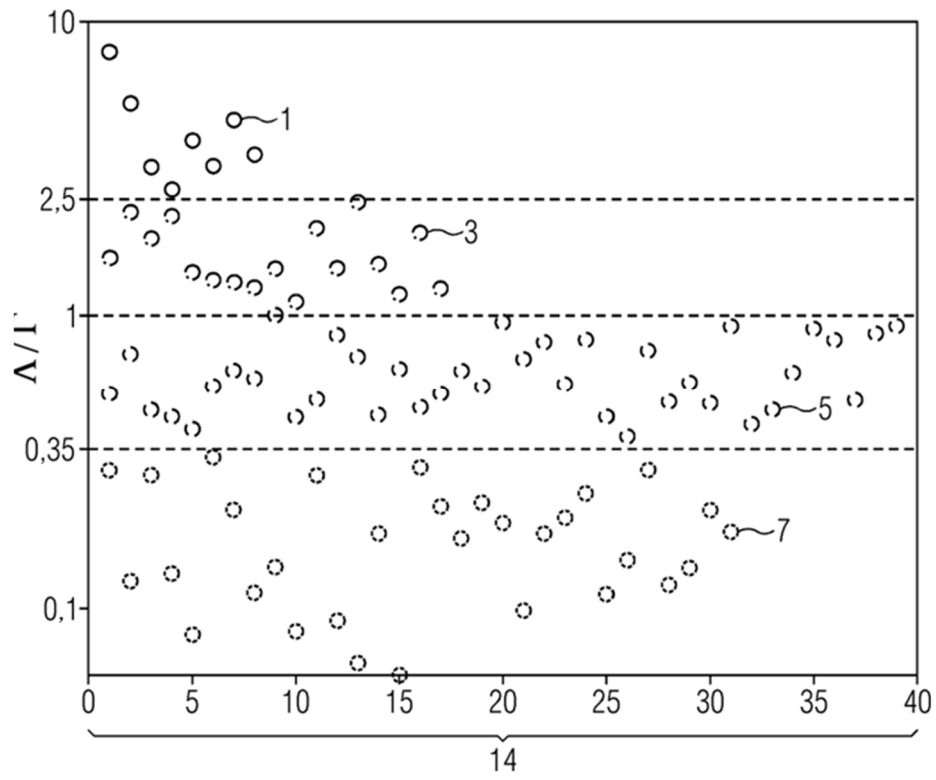


Figura 3