



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI 0714332-0 A2**



(22) Data de Depósito: 04/07/2007  
(43) Data da Publicação: 07/05/2013  
(RPI 2209)

(51) *Int.Cl.:*  
G01N 15/14  
G01M 11/02  
G01N 33/48

(54) **Título:** APARELHO DE MEDIÇÃO, MÉTODO E PROGRAMA DE COMPUTADOR

(30) **Prioridade Unionista:** 19/07/2006 SE 0601575-4,  
20/04/2007 SE 0700958-2

(73) **Titular(es):** Hemocue Ab

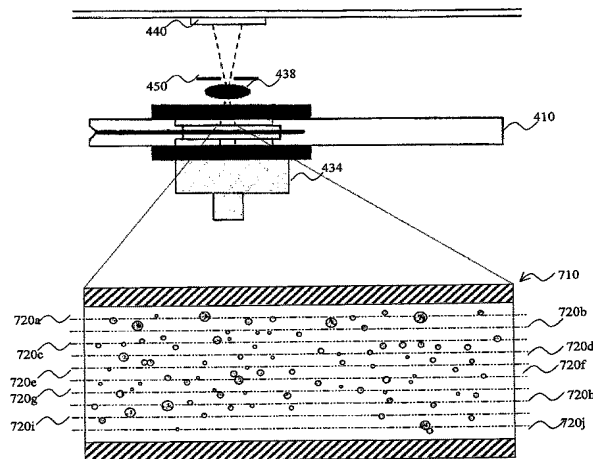
(72) **Inventor(es):** Stellan Lindberg, Tom Olesen

(74) **Procurador(es):** Dannemann, Siemsen, Bigler &  
Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT SE2007000656 de  
04/07/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/010761 de  
24/01/2008

(57) **Resumo:** APARELHO DE MEDIÇÃO, MÉTODO E PROGRAMA DE COMPUTADOR. A presente invenção refere-se a um aparelho de medição para enumeração de partículas de glóbulos brancos em uma amostra compreendendo: um prendedor, que está disposto para receber um dispositivo de aquisição de amostra que prende uma amostra, um sistema de imagem, compreendendo um dispositivo de ampliação e pelo menos um dispositivo de aquisição de imagem, o dito sistema de imagem estando disposto para adquirir pelo menos uma imagem digital da amostra, e um analisador de imagem, que está disposto para analisar imagem digital, para identificar partículas ou glóbulos brancos e determinar o número de partículas ou glóbulos brancos e que está disposto para analisar a imagem digital para identificar partículas ou glóbulos brancos que estejam retratados no foco, determinar os tipos dessas partículas ou glóbulos brancos, os tipos sendo distinguido pelos características físicas e determinado a proporção de tipos diferentes de partículas ou glóbulos brancos.



## Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "APARELHO DE MEDIÇÃO, MÉTODO E PROGRAMA DE COMPUTADOR".

### Campo Técnico

5 A presente invenção refere-se um aparelho de medição e um método para enumeração de partículas, como, por exemplo, células em uma amostra, como, por exemplo, uma amostra sanguínea. A presente invenção também se refere a um programa de computador para analisar a amostra.

### Antecedentes da Invenção

10 Determinar uma contagem de glóbulos brancos no sangue é frequentemente importante com relação ao tratamento de um paciente. Essa análise pode ser necessária para diagnosticar, por exemplo, leucemia, ou doenças infecciosas presente invenção inflamatórias ou para monitorar tratamentos. É desejável possibilitar que os resultados da análise sejam obtidos o mais rápido possível a fim de minimizar os tempos de espera para os  
15 pacientes e possibilitar que um médico tome uma decisão de tratamento e diagnostique diretamente ao fazer um primeiro exame no paciente. Portanto, é preferível proporcionar um método de análise que possa ser realizado rapidamente pelo médico ou uma enfermeira sem que seja preciso enviar um testa para um laboratório. A determinação da contagem de glóbulos brancos  
20 é um dos testes mais comuns a ser realizado nos pacientes no estabelecimento de um diagnóstico. Portanto, é vantajosa a obtenção de um método rápido e simples de realizar a análise.

Nos dias de hoje, uma contagem de glóbulos brancos é normalmente obtida através de procedimento manual manchando uma amostra  
25 sanguínea e visualizando microscopicamente a amostra em uma câmara de contagem especial, por exemplo, uma câmara Bürker. A câmara de contagem é provida de uma grade dividindo a câmara em volumes pequenos bem definidos. Os glóbulos brancos são assentados no fundo da cama de contagem a fim de possibilitar que o microscópio focalize nas células na câmara e,  
30 portanto, facilite a contagem. Assim, a amostra precisa ser assentada por vários minutos antes da realização da contagem. A contagem de célula pode então ser determinada pela contagem do número de glóbulos brancos por

caixa na grade. A contagem de célula é obtida é obtida manualmente por um analista, que precisa ser experiente na realização de análise a fim de ser capaz de realizar uma análise confiável.

5 A análise é demorada. Ademais, é realizada manualmente, os resultados da análise podem variar dependendo da pessoa que realiza a análise.

Há poucos métodos de análise automatizada para determinar uma contagem de glóbulo branco. A contagem de glóbulo branco pode ser determinada por meio do princípio Coulter, que é baseado na determinação do tamanho da célula e, por meio disso, o tipo de célula pela percepção de uma impedância. Um método para contagem de glóbulos brancos pelo princípio Coulter está descrito no Documento US 5.262.302. Um aparelho de medição de acordo com o princípio Coulter é caro e, portanto, um investimento considerável. Assim, um hospital ou laboratório irá relutar a investir em mais do que um aparelho. Isso implica no fato de que será necessário realizar a análise em um local centralizado e um paciente precisará aguardar pelos resultados da análise.

O Princípio Coulter é o método de análise automatizado dominante que está sendo usado no momento. Contudo, foram descritos poucos outros métodos. Tal método para determinar uma contagem de glóbulo branco está descrito do Documento US 5.585.246. Aqui, uma amostra sanguínea deve ser preparada sendo misturada com um corante fluorescente e complexo ligante que etiqueta os glóbulos brancos. A amostra é introduzida em um vaso capilar e é irradiada por uma fonte laser que examina a amostra no vaso capilar. A fluorescência é medida a fim de determinar o número de glóbulos brancos. Um método similar está descrito no Documento WO 97/02482, usando um corante florescente e uma fonte laser examinando o vaso capilar. Esse método está adaptado para enumeração dos glóbulos brancos nos produtos aféreses contendo um número baixo de glóbulos brancos. Aqui, o vaso capilar é relativamente espesso e é necessário aguardar até que os glóbulos brancos tenham assentado no fundo do vaso capilar antes do vaso capilar ser examinado.

No Documento WO 99/45384, está ilustrada uma câmara contendo uma amostra variando em espessura. A variação da espessura separa compostos diferentes de sangue. A amostra sanguínea é manchada com um corante para realçar diferencialmente pelo menos três tipos diferentes de glóbulos brancos na amostra sanguínea. Os glóbulos brancos podem ser enumerados usando um instrumento de exame óptico para visualizar uma parte da câmara.

No Documento WO 98/50777, está descrito um método para avaliação do número de células somáticas. O método compreende a aplicação de um volume de uma amostra em um compartimento de amostra e transmitir sinais eletromagnéticos, tendo passado de um compartimento de amostra, para um arranjo de elementos de detecção. As intensidades dos sinais eletromagnéticos detectados são processadas e os resultados são relacionados ao número de células presente na amostra.

É também necessário acelerar e simplificar os métodos automatizados existentes para determinar uma contagem de glóbulo branco de maneira que a análise possa ser realizada por qualquer usuário, não requerendo treinamento especial, e de maneira que os aparelhos de medição possam ser relativamente baratos. Isso implica no fato de que a análise pode ser proporcionada em um ponto de atenção. Ademais, uma vez que a contagem de glóbulo branco é uma análise comumente realizada, qualquer aperfeiçoamento no método de análise terá um impacto positivo no cuidado com o paciente. Um método de análise proporcionado a possibilidade de obtenção de resultados em um ponto de atenção será particularmente vantajoso.

Ainda, pode ser vantajoso obter uma contagem de glóbulo branco diferencial, isto é, examinar a distribuição dos diferentes tipos de glóbulos brancos em uma amostra sanguínea. Essa contagem de glóbulo branco diferencial pode revelar se os glóbulos estão presentes em uma distribuição normal, ou se qualquer tipo de célula aumentou ou diminuiu. A informação pode ser útil no diagnóstico de tipos específicos de doenças. Por exemplo, um aumento nos neutrófilos pode indicar uma infecção bacteriana, enquanto que um aumento nos linfócitos é comum em infecções viróticas agudas.

A contagem de glóbulo branco diferencial pode também ser obtida pela visualização microscópica a contagem manual de glóbulos brancos manchados em uma câmara Bürker. Existem também alguns métodos automatizados. Por exemplo, pode ser obtida uma contagem diferencial com o princípio Coulter pela análise da forma e do tamanho do pulso elétrico gerado por uma célula passando através de um campo elétrico. A forma e o tamanho do pulso podem ser relacionados ao tipo do glóbulo branco sendo detectado. Tal método está descrito no Documento US 4.528.274.

No Documento US 5.123.055, está descrito outro método para identificar tipos diferentes de glóbulos brancos. Esse método requer parâmetros de tamanho e cor a ser sequencialmente analisado a fim de diferenciar os tipos de glóbulos brancos.

É ainda desejado acelerar e simplificar os métodos automatizados existentes para determinar uma contagem de glóbulo branco diferencial. É particularmente vantajoso proporcionar um método de análise rápido, simples e relativamente barato de maneira que a análise possa ser proporcionada em qualquer ponto de atenção.

#### Sumário da Invenção

É um objetivo da invenção proporcionar uma análise simples para determinar enumeração volumétrica de partículas, como, por exemplo, glóbulos brancos em uma amostra, como, por exemplo, uma amostra sanguínea e determinar uma contagem de partícula diferencial, como, por exemplo, uma contagem de glóbulo branco diferencial.

Portanto, de acordo com um aspecto da invenção, é proporcionado um aparelho de medição para enumeração de partículas, como, por exemplo, glóbulos brancos em amostra sanguínea, como, por exemplo, uma amostra sanguínea.

O aparelho compreende um prendedor, que está disposto para receber uma amostra de dispositivo de obtenção compreendendo uma cavidade de medição que prende uma amostra, um sistema de imagem adaptado para adquirir pelo menos uma imagem digital ampliada da amostra. O aparelho também compreende um analisador de imagem, que está disposto

para analisar a pelo menos uma imagem digital adquirida para identificar as partículas e determinar o número de partículas na amostra, na qual o analisador de imagem está disposto para analisar a pelo menos uma imagem digital adquirida para identificar as partículas que são retratadas em foco e  
5 determinando os tipos e o número dessas partículas, os tipos sendo distinguidos pelas características físicas das partículas, determinando, por meio disso, a proporção dos tipos diferentes de partículas na amostra.

O sistema de imagem pode compreender um dispositivo de ampliação e pelo menos um dispositivo de aquisição de imagem digital.

10 De acordo com uma modalidade o aparelho está adaptado para enumeração dos glóbulos brancos em uma amostra sanguínea, a cavidade de medição está adaptada para prender uma amostra sanguínea manchada e hemolizada, e onde o analisador de imagem está disposto para analisar a  
15 pelo menos uma imagem digital adquirida para identificar os glóbulos brancos manchados e determinar o número de glóbulos brancos na amostra, onde o analisador de imagem está disposto para analisar a pelo menos uma imagem digital adquirida para identificar os glóbulos brancos que estão retratados em foco e determinar os tipos e o número desses glóbulos brancos, os tipos sendo distinguidos por características geométricas dos glóbulos brancos,  
20 por meio do qual é determinada a proporção de tipos diferentes de glóbulos brancos na amostra.

De acordo com outro aspecto da invenção, é proporcionado um método para enumeração e partículas nas amostra, o dito método compreende: adquirir uma amostra na cavidade de medição de um dispositivo de  
25 aquisição de amostra, adquirir pelo menos uma imagem digital de uma ampliação da amostra irradiada na cavidade de medição, analisar digitalmente a pelo menos uma imagem digital para identificar as partículas e determinar o número de partículas na amostra, e analisar digitalmente a pelo menos uma imagem digital para identificar partículas que são retratadas em foco e  
30 determinar os tipos e número dessas partículas, os tipos sendo distinguidos pelas características geométricas das partículas, por meio disso é determinada a proporção dos diferentes tipos de partículas na amostra.

De acordo com uma modalidade o método está adaptado para enumeração dos glóbulos brancos em uma amostra sanguínea. O método compreende a aquisição de uma amostra sanguínea na cavidade de medição de um dispositivo de aquisição de amostra. A amostra sanguínea é misturada com um reagente, compreendendo um agente de hemolização para produzir lise celular dos glóbulos vermelhos na amostra sanguínea e um agente manchador para manchar os glóbulos brancos na amostra sanguínea. O agente manchador preferivelmente mancha seletivamente os glóbulos brancos e não mancha outros glóbulos na amostra sanguínea. O método compreende adicionalmente adquirir pelo menos uma imagem digital de uma ampliação da amostra na cavidade de medição. O método também compreende analisar digitalmente a pelo menos uma imagem digital para identificar glóbulos brancos manchados e determinar o número de glóbulos brancos na amostra, e analisar digitalmente a pelo menos uma imagem digital para identificar glóbulos brancos que sejam retratados no foco e determinar os tipos e número desses glóbulos brancos, os tipos sendo distinguidos pelas características geométricas das células manchadas, por meio disso é determinada a proporção dos tipos diferentes de glóbulos brancos na amostra sanguínea.

Tanto o aparelho de medição quanto o método da invenção possibilita análise simples de uma amostra de todo sangue. Com essa finalidade, o aparelho de medição está disposto para adquirir pelo menos uma imagem digital de uma amostra sanguínea, cuja amostra tenha sido misturada com um agente manchador para manchar os glóbulos brancos. A mancha dos glóbulos brancos implica no fato de que os glóbulos brancos podem ser distinguidos em uma imagem digital e diferentes tipos de glóbulos brancos podem ser distinguidos pelas características geométricas dos glóbulos na mesma ou outra imagem digital.

O aparelho de medição e o método estão, portanto, dispostos tanto para determinar uma enumeração volumétrica dos glóbulos brancos na amostra sanguínea quanto determinar uma contagem de glóbulo branco diferencial.

Considerando que muitos métodos existentes são capazes de

contar células sanguíneas diferentes e mesmo subgrupos de células sanguíneas, o aparelho de medição de acordo com a invenção é especificamente adaptado para análise dos glóbulos brancos. O reagente compreende um agente de hemolização que irá hemolizar os glóbulos vermelhos na amostra  
5 sanguínea. Isso destrói a possibilidade de enumerar os glóbulos vermelhos na amostra. Por outro lado, a produção de lise nos glóbulos vermelhos simplifica a distinção e identificação dos glóbulos brancos na amostra sanguínea.

Ademais, o aparelho de medição está especificamente adaptado  
10 para analisar a pelo menos uma imagem digital de maneira que sejam identificados as células que são retratados no foco. Isso permite a aquisição de uma imagem de uma amostra relativamente espessa, enquanto são contados apenas as células que estejam no foco. Essa característica é particularmente útil considerando que a enumeração do número total dos glóbulos  
15 brancos é mais facilmente feita do que a identificação do tipo de glóbulos brancos, uma vez que tipificação requer mais detalhes da célula a ser analisada. Assim, assegurando que apenas as células que estejam no foco sejam contados, a identificação do tipo de glóbulos brancos pode ser realizada em uma amostra que pode ser simultaneamente usada para determinar uma  
20 enumeração volumétrica estatisticamente confiável dos glóbulos brancos na amostra.

O aparelho de medição e o método da invenção proporcionam uma análise muito simples de uma amostra de todo sangue. A análise não requer aparelhos de medição complicados ou etapas avançadas a serem  
25 realizadas por um operador. Portanto, pode ser realizada em conexão direta para exame de um paciente, sem que seja necessário um técnico qualificado. Pode ser meramente requerido que a amostra sanguínea seja adquirida e misturada com um agente manchador. Então, a amostra sanguínea pode ser colocada no prendedor do aparelho de medição e, em resposta direta ao  
30 mesmo, o aparelho de medição pode apresentar resultados de análise.

De fato, a amostra sanguínea pode ser permitida a ser misturada com o reagente na cavidade de medição. Assim, não será necessário reali-

zar uma preparação de amostra manualmente. Dentro de poucos minutos, a reação da amostra sanguínea com o reagente terão hemolisado os glóbulos vermelhos e manchado os glóbulos brancos de maneira que a amostra esteja pronta para medição óptica para adquirir pelo menos uma imagem digital.

- 5 A amostra sanguínea pode ser misturada com o reagente por, por exemplo, dispersão ou difusão do reagente na amostra sanguínea ou vibrando ativamente ou movendo o dispositivo de aquisição de amostra de maneira que seja causada uma agitação na cavidade de medição.

10 O aparelho de medição pode também compreender uma fonte de radiação magnética, que está disposta para irradiar a amostra presa na cavidade de medição do dispositivo de aquisição de amostra.

O sistema de imagem pode estar disposto para adquirir uma pluralidade de imagens digitais da amostra usando ajustes ópticos diferentes, onde o analisador de imagem está disposta para analisar cada imagem digital adquirida para identificar partículas ou glóbulos brancos manchados e determinar o número de partículas ou glóbulos brancos na amostra, onde o analisador de imagem está disposto para analisar cada imagem digital adquirida para identificar partículas ou glóbulos brancos que são retratados em foco e determinar tipos e número dessas partículas ou glóbulos brancos, os tipos sendo distinguidos pelas características geométricas das partículas ou glóbulos brancos manchados, por meio do qual é determinada a proporção dos tipos deferentes de partículas ou de glóbulos brancos na amostra.

Adquirindo uma pluralidade de imagens digitais em níveis diferentes na direção da profundidade do campo na amostra, é possível analisar um volume relativamente grande de amostra mesmo ao usar uma ampliação alta. Devido à pequena profundidade resultante de campo, uma ampliação alta dificulta visualizar o volume completo em uma imagem. Uma vez que o nível de ampliação afeta a profundidade de campo, a etapa de aquisição de uma pluralidade de imagens digitais permite o uso de ampliação maior, que sucessivamente possibilita, em cada imagem, diferenciar entre os tipos de glóbulos brancos dependendo, dentre outras coisas, da forma, número e tamanho do núcleo.

De acordo com outra modalidade, o sistema de imagem está disposto para proporcionar informação a cerca da luz na imagem adquirida para facilitar a focalização, por meio da qual é possível deslocar o foco na imagem adquirida. Isso implica no fato de que a imagem pode ser usada tanto para enumeração do número total de glóbulos brancos na amostra analisando toda a profundidade da amostra de uma só vez, quanto para determinar a proporção dos tipos diferentes de glóbulos brancos na amostra sanguínea pela análise das células na imagem quando a imagem está ilustrada com uma parte da espessura da amostra sanguínea estando no foco. Uma imagem compreendendo informação de direção de luz na imagem pode ser obtida em um arranjo de lentes pequenas (por exemplo, uma lente composta) proporcionando habilidade para traçar raios na imagem adquirida de maneira que partes diferentes da imagem possam ser colocadas no foco.

O sistema de imagem pode estar disposto para adquirir uma primeira e uma segunda imagem digital da amostra usando tipos diferentes de ajustes ópticos, e onde o analisador de imagem está disposto para analisar uma primeira imagem digital adquirida para determinar o número de partículas ou glóbulos brancos na amostra e o analisador de imagem está disposto para analisar a segunda imagem digital adquirida para determinar a proporção dos tipos diferentes de partículas ou glóbulos brancos na amostra.

Assim, o aparelho de medição está especificamente adaptado para adquirir duas imagens digitais usando ajustes ópticos diferentes. Isso implica no fato de que os ajustes ópticos podem ser otimizados e adaptados para, primeiramente, determinar o número de glóbulos brancos em um volume e, em segundo lugar, determinar a proporção de tipos diferentes de glóbulos brancos.

O sistema de imagem pode compreender pelo menos duas partes separadas, que direcionam luz de uma amostra irradiada para uma primeira e uma segunda parte do sistema de imagem.

A ação para determinar se um glóbulo branco está ou não no foco pode ser realizada pelo uso do fato de que o citoplasma do glóbulo branco pode agir como uma lente refratando a luz. Para um glóbulo branco

retratado no foco o núcleo aparece como sombras escuras considerando que o citoplasma circundante é quase invisível. O núcleo aparece como regiões com intensidade de luz significativamente inferior considerando que o citoplasma deixa a luz intensamente sem ser afetada.

5                    Para uma contagem de glóbulo branco retratado muito próximo ao sistema de imagem (próximo demais para ser um foco) o núcleo aparece como sombras escuras considerando que o citoplasma circundante age como uma lente e refrata a luz que resulta em um círculo escuro ao redor do núcleo. O núcleo aparece como uma região com intensidade de luz significativa-  
10                    tivamente inferior com relação à imagem focada do núcleo e o citoplasma aparece como intensidade de luz baixa.

                      Para um glóbulo branco retratado longe demais de um sistema de imagem (longe demais para estar no foco) o núcleo aparece como sombras escuras considerando que o citoplasma circundante age como uma len-  
15                    te e refrata a luz resultante em um círculo brilhante ao redor do núcleo. O núcleo aparece como uma região com intensidade de luz significativamente inferior com relação a uma imagem focada do núcleo considerando que o citoplasma aparece com intensidade de luz alta.

                      Alternativamente, a identificação dos das células que são retra-  
20                    tados no foco pode ser realizada pela análise das bordas das células retratadas para avaliar se a célula é retratada no foco com base em uma inclinação de intensidade da borda. As células que não estão no foco irão apresentar uma diminuição lenta na intensidade nas bordas, considerando que as células no foco serão retratadas com uma borda pontuda representada como  
25                    uma diminuição grande na intensidade na borda da célula. Assim, analisando como a intensidade varia em uma borda de um a célula retratada, pode ser determinado se a célula está ou não retratada no foco.

                      Uma maneira alternativa para determinar o tipo de célula é, no analisador de imagem, para uma partícula ou célula específica, determinar o  
30                    número das ditas imagens no qual a dita partícula ou célula é retratada contando de uma imagem na qual a partícula ou célula é determinada como fora do foco em uma primeira direção para uma imagem na qual a partícula ou

célula é determinada como fora de foco em uma segunda direção.

O analisador de imagem pode estar disposto para determinar, com base no número de imagens contadas, uma característica geométrica relacionada ao tamanho da dita partícula ou célula.

5 O sistema de imagem com os ajustes ópticos usado para adquirir a dita pelo menos uma imagem digital pode ser dotado de uma potência de ampliação de 1 a 50x, mais preferivelmente de 1 a 20x, mais preferivelmente de 3 a 20x, mais preferivelmente de 5 a 20x e mais preferivelmente em torno de 10x.

10 O sistema de imagem pode estar disposto para obter a dita pelo menos uma imagem digital com uma profundidade de campo na variação de 2 a 60 micrometros, mais preferivelmente na variação de 2 a 30 micrometros, mais preferivelmente em torno de 8 a 10 micrometros.

15 Conforme usado nesse contexto, "profundidade de campo" implica uma extensão em uma direção ao longo do eixo geométrico óptico que é retratado em um foco suficiente para permitir análise de imagem para identificar células posicionadas nessa extensão. Essa "profundidade de campo" pode ser maior do que uma profundidade de campo convencional pelos ajustes ópticos. Com uma potência de ampliação aumentada, a profundidade de  
20 campo é diminuída.

A fonte de radiação eletromagnética pode ser disposta para irradiar uma extensão de onda correspondente a um pico na absorvância do agente manchador. Conseqüentemente, os glóbulos brancos manchados que contêm uma acumulação de agente manchador serão detectados por  
25 uma indicação de uma transmitância baixa de luz nas imagens digitais.

A fonte de radiação eletromagnética pode compreender uma fonte laser. A fonte laser pode proporcionar luz de uma extensão de onda bem definida encaixando a absorvância do agente manchador. Ademais, a fonte laser pode proporcionar luz colimada, minimizando distúrbios de luz de  
30 dispersão, de maneira que um ponto de transmitância de luz baixa será distintamente distinguido.

A fonte de radiação eletromagnética pode alternativamente

compreender um diodo emitindo luz. Essa fonte de radiação pode ainda proporcionar condições de irradiação suficiente para distinguir apropriadamente glóbulos brancos de outra matéria na amostra.

5 O analisador de imagem pode estar disposto para identificar áreas de absorvância de luz alta a fim de determinar o número de partículas ou glóbulos brancos na amostra. O analisador de imagem pode também estar disposto para identificar pontos negros ou escuros na amostra. Uma vez que os agentes manchadores podem ser acumulados no núcleo dos glóbulos brancos, a absorvância da luz pode ser dotada de picos em pontos separados. Esses pontos irão formar pontos pretos na imagem digital e podem ser classificados como glóbulos brancos.

15 O analisador de imagem pode estar disposto para distinguir tipos diferentes de partículas ou glóbulos brancos pela análise da forma e tamanho das áreas identificadas de absorvância de luz alta na pelo menos uma imagem digital. Uma vez que tipos diferentes de glóbulos brancos são dotados de tamanhos diferentes, o tipo de um glóbulo branco pode ser identificado para determinar o tamanho da célula sanguínea. Ademais, os tipos diferentes podem ser manchados diferentemente proporcionando formas diferentes das áreas identificadas na imagem digital. Isso pode também ser usado a fim de identificar o tipo de glóbulos brancos. Pode ser obtida uma contagem de glóbulo branco diferencial especificando a proporção de três tipos diferentes de glóbulos brancos pela análise do tamanho das células sanguíneas. Uma contagem de glóbulo branco diferencial distinguindo cinco tipos diferentes de glóbulos brancos pode requerer características adicionais das células sanguíneas a serem investigadas. Por exemplo, pode ser examinada uma quantidade de núcleos de cada célula, uma intensidade de radiação transmitida através da célula sanguínea, ou a forma da célula sanguínea.

30 O agente manchador pode estar disposto para manchar seletivamente o núcleo dos glóbulos brancos. Isso implica no fato de que os glóbulos brancos podem ser identificados como pontos coloridos e, portanto, serem facilmente distinguidos e contados em uma imagem digital. Ademais,

o tamanho e os pontos de mancha podem ser usados para identificar o tipo de glóbulos brancos, porque os tipos diferentes de glóbulos brancos são dotados de tamanhos diferentes.

5 O agente manchador pode ser qualquer um do grupo de hematoxilina, azul de metileno, verde de metileno, azul de metileno, acetato de cresil violeta, azul de toluidina, violeta genciana, "sudán análogo", galocianina, e fucsina análoga, ou qualquer combinação dos mesmos. Contudo, deve ser observado que o agente manchador não está limitado a esse grupo, mas podem ser contempladas quaisquer outras substâncias.

10 O agente de hemolização pode ser um sal de amônio quaternário, uma saponina, um ácido bile, como, por exemplo, um ácido deoxicólico, uma digitoxina, um veneno de cobra, um glucopiranosídeo ou um detergente não-iônico do tipo Tritão. Contudo, deve ser observado que o agente de hemolização não está limitado a esse grupo, mas podem ser contempladas  
15 muitas outras substâncias.

O aparelho de medição pode também compreender uma lente objetiva que seja compartilhada para os diferentes ajustes ópticos. Isso implica no fato de que as imagens digitais podem ser obtidas pela concepção ao longo do mesmo caminho óptico de maneira que as imagens sejam centradas no mesmo ponto na cavidade de medição. Isso torna o aparelho de  
20 medição compacto.

De acordo com uma modalidade, o sistema de imagem compreende pelo menos duas partes separadas, que direcionam luz de uma amostra irradiada para uma primeira e uma segunda parte do sistema de imagem.  
25 Isso implica no fato de que o caminho da luz da amostra para o sistema de imagem pode ser definido em um ajuste óptico fixo. Assim, o aparelho de medição pode ser forte e insensível a impacto.

O sistema de imagem pode também compreender um separador de feixe para direcionar luz da lente objetiva em direção à primeira e segunda parte do sistema de imagem. Isso implica no fato de que a primeira e a  
30 segunda imagens digitais podem ser obtidas simultaneamente, por meio do que a análise pode ser realizada muito rapidamente.

A primeira parte do sistema de imagem pode estar disposta para receber luz diretamente de um separador de feixe, isto é, nenhum elemento óptico está disposto entre a primeira parte do sistema de imagem e o separador de feixe. Alternativamente, a luz pode estar disposta para passar diretamente de uma lente objetiva para a primeira parte do sistema de imagem. Então, a fim de obter a segunda imagem digital, pode, em vez disso, ser inserido um espelho no caminho de luz para defletir para a segunda parte do sistema de imagem.

O sistema de imagem pode também compreender uma lente ocular entre o separador de feixe e a parte do sistema de imagem adaptado para adquirir imagens digitais. A lente ocular, portanto, proporciona uma ampliação adicional da amostra a fim de distinguir entre os diferentes tipos de glóbulos brancos. Preferivelmente, são usados os acondicionamentos de lente e o acondicionamento de lente ocular irá então mover um plano principal virtual no acondicionamento de lente objetiva para mudar a relação entre o plano de imagem e o acondicionamento de lente objetiva para permitir ampliação adicional.

O sistema de imagem pode também compreender um elemento óptico entre o separador de feixe e a parte do sistema de imagem adaptado para adquirir imagens digitais para afetar as células não posicionadas no foco do sistema de imagem, por meio disso é facilitada a identificação dos glóbulos brancos que estejam retratados no foco.

O elemento óptico permite a aquisição de uma imagem de uma espessura de amostra maior do que a profundidade de campo do sistema de imagem. O elemento óptico assegura que as células que estejam fora do foco possam ser retiradas da consideração a fim de aumentar a certeza da medição. Uma vez que o elemento óptico afeta a concepção das células do foco, as células no foco serão facilmente identificadas. O elemento óptico pode ser implementado como um filtro espacial que afete a imagem de uma célula de maneira que a borda da célula irá compreender uma intensidade de sobremodulação maior do que a intensidade de fundo, onde a célula é retratada pela absorção de luz.

De acordo com uma modalidade alternativa, o sistema de imagem pode também compreender um elemento de codificação de frente de onda entre o separador de feixe e a segunda parte do sistema de imagem. Um elemento de codificação de frente de onda distorce deliberadamente os raios de luz passando os mesmos através de uma placa de onda com uma forma tipo sela, que é relativamente chata no meio, mas com bordas festonadas. Isso provoca uma aberração óptica específica, a imagem parece manchada, mas o desfoque é o mesmo sobre uma grande variação de distâncias. Portanto, esse elemento de codificação de frente de onda aumenta uma profundidade ao longo do eixo geométrico óptico que pode ser analisado. As distorções na imagem são determinadas principalmente pela forma do desfoque do elemento de codificação de frente de onda, que é precisamente conhecido. Portanto, um computador é capaz de remover a mancha ponto por ponto. Um computador pode decodificar a imagem usando o que seja essencialmente um filtro digital, e, assim, criar uma imagem que seja pontuda sobre uma grande profundidade de campo. Dessa maneira, a profundidade de campo do sistema de imagem pode ser aumentada, possibilitando uma profundidade maior de uma amostra a ser retratada no foco.

De acordo com outra modalidade, uma parte do sistema de imagem está disposta para adquirir tanto a primeira quanto a segunda imagens e pelo menos parte do sistema de ampliação do sistema de imagem pode ser desviado a fim de adquirir a primeira e a segunda imagens digitais usando diferentes ajustes ópticos. Isso implica no fato de que o aparelho de medição precisa apenas compreender uma única parte do sistema de imagem. Ademais, isso permite que sejam usados vários ajustes ópticos diferentes por, por exemplo, proporcionando uma lente principal que seja móvel entre posições bem definidas ao longo do eixo geométrico óptico.

O sistema de imagem pode estar disposto sendo dotado de uma potência de ampliação maior nos ajustes ópticos usados para adquirir a segunda imagem digital do que nos ajustes ópticos usados para adquirir a primeira imagem digital. Isso implica no fato de que os detalhes podem ser mais bem visualizados na segunda imagem digital, por meio da qual tipos

diferentes de glóbulos brancos podem ser mais facilmente distinguidos uns dos outros.

O sistema de imagem com os ajustes ópticos usados para adquirir a primeira imagem digital podem ser dotados de uma potência de ampliação de 1 a 50x, mais preferivelmente de 1 a 20x, mais preferivelmente de 3 a 20x, mais preferivelmente de 3 a 10x e mais preferivelmente em torno de 4x. Dentro dessas variações de potência de ampliação, os glóbulos brancos são suficientemente ampliados a fim de serem detectados, enquanto o sistema de imagem pode estar disposto para conceber a espessura de amostra no foco suficiente a fim de acessar a quantidade de glóbulos brancos na imagem. Assim, o sistema de imagem pode ser dotado de uma profundidade de campo cobrindo a espessura da amostra. Contudo, não precisa ser retratada toda a espessura da amostra na profundidade de campo do sistema de imagem, usando uma definição convencional de profundidade de campo. As células que são retratadas ligeiramente fora do foco podem ainda ser contadas corretamente usando análise de imagem inteligente. Uma potência de ampliação baixa implica no fato de que pode ser obtida a "profundidade de campo". Assim, pode ser permitida uma espessura de amostra grande e pode ser analisado um volume grande. Contudo, se for usada uma potência de ampliação baixa, os glóbulos brancos podem ser difíceis de detectar porque cada célula sanguínea está retratada em muito poucos pixels, como, por exemplo, de 3 a 4 pixels. Pode ser usada uma potência de ampliação inferior pelo aumento do número de pixels na imagem adquirida, isto é, proporcionando a resolução da imagem digital. Dessa maneira, é possível usar uma potência de ampliação óptica de 1 a 4x, ao mesmo tempo em que possibilita que sejam detectados os glóbulos brancos.

O sistema de imagem com os ajustes ópticos usados para adquirir a segunda imagem digital podem ser dotados de uma potência de ampliação de 1 a 50x, mais preferivelmente de 1 a 20x, mais preferivelmente de 3 a 20x, mais preferivelmente de 5 a 20x e mais preferivelmente em torno de 10x. Dentro dessas variações de potência de ampliação, os glóbulos brancos são suficientemente ampliados a fim de distinguir entre os tipos diferen-

tes de glóbulos brancos. Pode ser usada uma potência de ampliação inferior usando um elemento óptico para enfatizar as células que sejam retratadas no foco e facilitar a identificação dessas células.

O sistema de imagem pode estar disposto para obter a primeira  
5 imagem com uma profundidade de campo de pelo menos a espessura da  
cavidade de medição do dispositivo de aquisição de amostra. Isso implica no  
fato de que um foco suficiente é obtido de toda espessura da amostra de  
maneira que toda a espessura da cavidade de medição possa ser simulta-  
neamente analisada na imagem digital da amostra. Assim, não é necessário  
10 esperar que os glóbulos brancos assentem na cavidade de medição, por  
meio do que é reduzido o tempo para fazer uma análise. Contudo, pode ser  
necessário aguardar uma reação levando os glóbulos brancos a serem he-  
molisados e aguardar que se assentem os movimentos provocados pela in-  
trodução da amostra na cavidade de medição. Esses tempos de espera se-  
15 riam muito curtos, na ordem de 30 segundos ou menos. Escolhendo não  
focar muito precisamente em uma parte específica da amostra, é obtido um  
foco suficiente de toda espessura da amostra para permitir identificar a  
quantidade de glóbulos brancos na amostra. Isso implica no fato de que um  
glóbulo branco pode estar de alguma forma manchado e ainda ser conside-  
20 rado no foco da profundidade de campo. O volume analisado da amostra  
pode, assim, ser bem definido pela espessura da cavidade de medição e o  
tamanho da imagem digital especificando a área de seção transversal da  
cavidade de medição sendo retratada.

O sistema de imagem pode estar disposto para obter a primeira  
25 imagem com uma profundidade de campo na variação de 50 a 200 microme-  
tros. Essa profundidade de campo pode ser adaptada para corresponder à  
profundidade ou espessura da cavidade de medição. Uma profundidade de  
pelo menos 50 micrometros permite a análise de um volume maior de san-  
gue sobre uma área em corte transversal pequena, evitando, assim, a com-  
30 pressão das células sanguíneas da amostra em uma monocamada. Assim,  
pode ser analisado um volume suficientemente grande da amostra sangüí-  
nea a fim de fornecer valores confiáveis da contagem do glóbulo branco u-

sando uma imagem relativamente pequena da amostra sanguínea. Adicionalmente, é difícil alcançar uma profundidade de campo excedendo 200 micrometros ao mesmo tempo obtendo uma imagem digital com uma ampliação suficiente. É do mesmo modo difícil alcançar uma profundidade de campo excedendo 170 micrometros.

5 O sistema de imagem pode estar disposto para obter a segunda imagem com uma profundidade de campo na variação de 2 a 60 micrometros. Isso pode ser alcançado pela concepção de uma parte da espessura da cavidade de medição. Nesse caso, apenas essa parte da espessura da cavidade de medição é retratada no foco. A segunda imagem digital é então analisada apenas considerando os glóbulos brancos que são retratados em foco suficiente a fim de determinar seu tipo. Uma vez que a segunda imagem digital é usada para determinar a proporção de tipos diferentes dos glóbulos brancos, não é importante conceber um volume bem definido. Assim, é possível obter uma primeira e uma segunda imagens apropriadas pela concepção da mesma parte da cavidade de medição. Contudo, a segunda imagem pode alternativamente ser adquirida concebendo uma parte diferente da cavidade de medição, por meio do que essa parte pode ser dotada de uma espessura correspondente à profundidade de campo do sistema de imagem para obter a segunda imagem.

20 O analisador de imagem pode estar disposto para ampliar eletronicamente a pelo menos uma imagem adquirida. Enquanto a amostra está sendo ampliada para adquirir uma imagem digital ampliada da amostra, a própria imagem digital adquirida pode ser ampliada eletronicamente para simplificar a distinção entre objetos que estejam retratados muito próximos uns dos outros na imagem digital adquirida.

25 De acordo com outro aspecto da invenção, é proporcionado um dispositivo de aquisição de amostra para enumerar glóbulos brancos em uma amostra sanguínea. O dispositivo de aquisição de amostra compreende uma cavidade de medição para receber uma amostra sanguínea. A cavidade de medição é dotada de uma primeira e uma segunda espessuras fixas pre-determinadas definidas entre as paredes internas da cavidade de medição,

30

onde a primeira espessura está adaptada para determinar a enumeração volumétrica total dos glóbulos brancos na amostra sanguínea e a segunda espessura está adaptada para determinar uma proporção de tipos diferentes de glóbulos brancos na amostra sanguínea. O dispositivo de aquisição de amostra também compreende um reagente, que está disposto em uma forma seca em uma superfície definindo a cavidade de medição. O reagente compreende um agente de hemolização para lisar os glóbulos vermelhos na amostra sanguínea, e um agente manchador para manchar seletivamente glóbulos brancos na amostra sanguínea.

O dispositivo de aquisição de amostra proporciona uma possibilidade de obter diretamente uma amostra de todo sangue na cavidade de medição e proporcionar a mesma para análise. Não é necessária a preparação da amostra. Na realidade, a amostra sanguínea pode ser sugada para a cavidade de medição diretamente de um dedo picado de um paciente. O provimento de um dispositivo de aquisição de amostra com um reagente possibilita uma reação no dispositivo de aquisição de amostra que prontifica a amostra para análise. Essa reação é iniciada quando a amostra sanguínea entra em contato com o reagente. Assim, não é necessário preparar manualmente a amostra, que torna a análise especialmente adequada a ser realizada diretamente na sala de exame enquanto o paciente aguarda.

Uma vez que o reagente é proporcionado em uma forma seca, o dispositivo de aquisição de amostra pode ser transportado e armazenado por muito tempo sem afetar a usabilidade do dispositivo de aquisição de amostra. Assim, o dispositivo de aquisição de amostra com o reagente pode ser fabricado e preparado muito antes de realizar a análise da amostra sanguínea.

Enquanto muitos métodos existentes são capazes de contar células sanguíneas diferentes e mesmo subgrupos de células sanguíneas, o dispositivo de aquisição de amostra de acordo com a invenção está especialmente adaptado para realizar enumeração de glóbulos brancos. O reagente compreende um agente de hemolização que irá lisar os glóbulos vermelhos na amostra sanguínea. Isso destrói as possibilidades de enumerar os

glóbulos vermelhos na amostra. Por outro lado, lisar os glóbulos vermelhos simplifica a distinção e identificação dos glóbulos brancos na amostra sanguínea.

5 O agente manchador proporciona uma marca dos glóbulos brancos individuais. Isso possibilita que os glóbulos brancos sejam visualizados ou detectados individualmente. Os glóbulos brancos podem, por exemplo, ser detectados pelo exame da cavidade de medição ou obtendo uma imagem da cavidade de medição.

10 O dispositivo de aquisição de amostra também proporciona uma primeira espessura da cavidade de medição especialmente adaptada para facilitar a determinação de uma contagem de glóbulo branco volumétrica. A cavidade de medição pode ser dotada de uma espessura suficiente para permitir a análise de um grande volume de amostra sanguínea e, portanto, permitir uma boa estatística para determinar a contagem de glóbulo branco  
15 volumétrica. A contagem de glóbulo branco pode, portanto, ser obtida somando o número dos glóbulos brancos detectados individualmente em um volume definido.

O dispositivo de aquisição de amostra também proporciona uma segunda espessura da cavidade de medição especificamente adaptada para  
20 facilitar a distinção entre tipos diferentes de glóbulos brancos. A esse respeito, a segunda espessura pode ser mais fina do que a espessura permitindo que toda a segunda espessura seja retratada na profundidade de campo de uma ampliação maior. Tal ampliação maior pode ser necessária ao distinguir entre os tipos diferentes de glóbulos brancos em comparação à imagem a  
25 fim de meramente determinar o número total dos glóbulos brancos, independente do tipo, na amostra sanguínea.

O dispositivo de aquisição de amostra pode compreender um membro de corpo sendo dotado de duas superfícies planares formando paredes internas para definir a dita cavidade de medição. As superfícies planares podem estar dispostas em uma distância predeterminada uma da outra  
30 para determinar uma profundidade de amostra para uma medição óptica. Isso implica no fato de que o dispositivo de aquisição de amostra proporcio-

na uma profundidade bem definida para a medição óptica, que pode ser usada para determinar precisamente a contagem de glóbulo branco por unidade volumétrica. Um volume de uma amostra analisada será bem definido pela profundidade da cavidade de medição e uma área da amostra sendo retratada. Assim, o volume bem definido pode ser usado para associar o número de glóbulos brancos ao volume da amostra sanguínea de maneira que seja determinada a contagem do glóbulo branco.

A cavidade de medição é preferivelmente dotada de uma primeira profundidade uniforme de 50 a 200 micrometros. Uma profundidade de pelo menos 50 micrometros implica no fato de que a cavidade de medição não força a amostra sanguínea a ser manchada em uma monocamada permitindo, por meio disso, um volume maior de sangue a ser analisado sobre uma área de seção transversal pequena. Assim, pode ser analisado um volume suficientemente grande de amostra sanguínea a fim de fornecer valores confiáveis da contagem de glóbulo branco usando uma imagem relativamente pequena da amostra sanguínea. A primeira profundidade é mais preferivelmente de pelo menos 100 micrometros, que permite uma área de seção transversal ainda menor a ser analisada ou um volume de amostra maior a ser analisado. Adicionalmente, a primeira profundidade de pelo menos 50 micrometros e mais preferivelmente 100 micrometros também simplifica a fabricação da cavidade de medição sendo dotada de uma profundidade bem definida entre duas superfícies planares.

Para a maioria das amostras dispostas em uma cavidade sendo dotada de uma espessura de até 200 micrometros, a contagem de glóbulo branco é tão lenta que haverá apenas pequenos desvios devido os glóbulos brancos estarem dispostos sobrepondo uns aos outros. Contudo, o efeito de tais desvios estarão relacionados à contagem de glóbulo branco e pode, assim, pelo menos até certo ponto, ser manuseado por meio de resultados de correção estatisticamente pelo menos para grandes valores de contagem de glóbulo branco. A correção estatística pode ser baseada em calibrações do aparelho de medição. Os desvios serão ainda menores para uma cavidade de medição sendo dotada de uma primeira espessura de até 170 microme-

tros, e ainda menores para uma cavidade de medição sendo dotada de uma primeira espessura de até 150 micrometros, por meio do que pode ser usada uma calibração simples. A espessura pode até mesmo não requerer qualquer calibração para sobrepor células sanguíneas.

5                   Adicionalmente, a primeira espessura da cavidade de medição é suficientemente pequena para possibilitar que o aparelho de medição obtenha uma imagem digital de maneira que toda profundidade da cavidade de medição possa ser analisada simultaneamente. Uma vez que deva ser usado um sistema de ampliação no aparelho de medição, não é fácil obter uma  
10 grande profundidade de campo. Portanto, a primeira espessura da cavidade de medição não deveria exceder 150 micrometros para que toda espessura seja analisada simultaneamente na imagem digital. A profundidade de campo pode estar disposta para manejar uma primeira espessura da cavidade de medição de 170 micrometros ou mesmo 200 micrometros.

15                   A cavidade de medição é preferivelmente dotada de uma segunda espessura uniforme de 20 a 60 micrometros. A segunda espessura da cavidade de medição permite que toda a segunda espessura seja retratada na profundidade de campo de uma ampliação necessária para distinguir entre os diferentes tipos de glóbulos brancos. Ademais, a segunda espessura  
20 pode ainda permitir a concepção de um volume suficiente possibilitando a análise de um número substancial de glóbulos brancos. Isso permite a determinação da proporção de tipos diferentes de glóbulos brancos com uma boa certeza estatística. Tipicamente, é desejado analisar o tipo de 200 glóbulos brancos.

25                   O dispositivo de aquisição de amostra pode ser provido de um reagente que tenha sido aplicado à superfície dissolvido em um líquido volátil que tenha evaporado para deixar o reagente em uma forma seca.

Foi concluído que o reagente é vantajosamente dissolvido em um líquido volátil antes de ser inserido na cavidade de medição. Isso implica  
30 no fato de que o líquido pode ser evaporado de maneira efetiva de um espaço estreito da cavidade de medição durante a fabricação e preparação do dispositivo de aquisição de amostra.

O reagente pode estar preferivelmente disposto em uma forma seca na parte da cavidade de medição da primeira espessura.

5 O reagente pode ser preferivelmente dissolvido em um solvente orgânico e mais preferivelmente ser dissolvido em metanol. Tais solventes são voláteis e podem ser usados apropriadamente para secar o reagente na superfície da cavidade de medição.

10 O dispositivo de aquisição de amostra pode também compreender uma entrada de amostra comunicando a cavidade de medição com a parte externa do dispositivo de aquisição de amostra, onde a entrada está disposta para adquirir uma amostra sanguínea. A entrada de amostra pode estar disposta para tirar uma amostra sanguínea por uma força capilar e a cavidade de medição pode também tirar sangue da entrada para a cavidade. Ainda, o dispositivo de aquisição de amostra pode estar disposto para primeiro tirar a amostra na parte da cavidade de medição da primeira espessura. Parte da amostra pode então ser também transportada por força capilar na parte da cavidade de medição da segunda espessura. Como resultado, a amostra sanguínea pode facilmente ser adquirida na cavidade de medição simplesmente movendo a entrada da amostra em contato com ao sangue. Então, as forças capilares da entrada da amostra e a cavidade de medição irão tirar uma quantidade bem definida de sangue na cavidade de medição. Alternativamente, a amostra sanguínea pode ser sugada ou retirada na cavidade por meio da aplicação de força de bombeamento externa para o dispositivo de aquisição de amostra. De acordo com alternativa, a amostra sanguínea pode ser adquirida em uma pipeta e então ser introduzida na cavidade de medição por meio da pipeta.

25 O dispositivo de aquisição de amostra pode ser descartável, por exemplo, está disposto para ser usado apenas uma vez. O dispositivo de aquisição de amostra proporciona um kit para realizar uma contagem de glóbulo branco, uma vez que o dispositivo de aquisição de amostra é capaz de receber uma amostra sanguínea e prender todos os reagentes necessários a fim de apresentar a amostra para a contagem de célula. Isso é particularmente possibilitado porque o dispositivo de aquisição de amostra está a-

daptado para uso apenas uma vez e pode ser formado sem consideração das possibilidades para limpar o dispositivo de aquisição de amostra e reapplicar um reagente. Ainda, o dispositivo de aquisição de amostra pode ser moldado em material plástico e por meio disso ser fabricado a baixo custo.

- 5 Assim, pode ser ainda de custo eficaz usar um dispositivo de aquisição de amostra descartável.

A invenção também se refere a um produto de programa de computador, incorporado em um meio legível de computador, para análise de uma amostra, compreendendo: código de computador para analisar digitalmente pelo menos uma imagem de uma amostra para determinar uma quantidade de partículas na amostra; código de computador para analisar digitalmente a pelo menos uma imagem da amostra para identificar um ou mais tipos de partículas na região focada da amostra, cada tipo de partícula estando associada a uma ou mais características físicas distintas; e um código de computador para transferir informação correspondente para a quantidade de tipos de partículas na amostra. A invenção também se relaciona a um programa de computador para analisar uma amostra, o programa de computador compreendendo código de programa de computador para: analisar pelo menos uma imagem digital para identificar as partículas e determinar o número de partículas na amostra, e analisar a pelo menos uma imagem digital para identificar partículas que sejam retratadas no foco e determinar os tipos e o número dessas partículas, os tipos sendo distinguidos pelas características físicas das partículas, por meio do que é determinada a proporção dos tipos diferentes de partículas na amostra.

25 Breve Descrição dos Desenhos

A invenção será agora descrita mais detalhadamente por meio de exemplo sob referência dos desenhos que a acompanham.

A figura 1 é uma vista esquemática de um dispositivo de aquisição de amostra.

30 A figura 2 é um diagrama em bloco esquemático de um aparelho de medição de acordo com uma primeira modalidade.

A figura 3 é um diagrama em bloco esquemático de um aparelho

de medição de acordo com uma segunda modalidade.

A figura 4 é o fluxograma de um método de acordo com uma modalidade da invenção.

5 A figura 5 é uma vista esquemática de uma disposição para uma lente móvel de acordo com uma modalidade da invenção.

A figura 6 é uma vista esquemática de uma disposição de acordo com uma modalidade da invenção.

A figura 7 ilustra um exemplo retratado em três camadas diferentes.

10 A figura 8a ilustra um glóbulo branco na câmara vista quando a célula está posicionada fora do foco de um aparelho de medição de acordo com a figura 10.

15 A figura 8b ilustra um glóbulo branco na câmara vista quando a célula está posicionada no foco de um aparelho de medição de acordo com a figura 10.

A figura 8c ilustra um glóbulo branco na câmara vista quando a célula está posicionada fora do foco de um aparelho de medição de acordo com a figura 10.

20 A figura 9a ilustra intensidades registradas de uma seção transversal de uma célula a ser analisada, quando a célula está posicionada fora do foco de um aparelho de medição de acordo com a figura 10.

A figura 9b ilustra intensidades registradas de uma seção transversal de uma célula a ser analisada, quando a célula está posicionada no foco de um aparelho de medição de acordo com a figura 10.

25 A figura 9c ilustra intensidades registradas de uma seção transversal de uma célula a ser analisada, quando a célula está posicionada fora do foco de um aparelho de medição de acordo com a figura 10.

A figura 10 é uma vista esquemática de um aparelho de medição de acordo com uma terceira modalidade.

30 A figura 11 é um fluxograma de um método de acordo com uma segunda modalidade da invenção.

A figura 12 é uma vista esquemática de um aparelho de medição

de acordo com uma quarta modalidade.

#### Descrição Detalhada das Modalidades Preferidas

Com relação à figura 1, será descrito um dispositivo de aquisição de amostra 10 de acordo com uma primeira modalidade. O dispositivo de aquisição de amostra 10 está preferivelmente descartável e deve ser descartado após ter sido usado para análise. Isso implica no fato de que o dispositivo de aquisição de amostra 10 não requer manipulação complicada. O dispositivo de aquisição de amostra 10 é preferivelmente formado em um material plástico e pode ser fabricado por moldagem por injeção. Isso torna a fabricação do dispositivo de aquisição de amostra 10 simples e barata, por meio da qual os custos do dispositivo de aquisição de amostra 10 podem ser mantidos baixos.

O dispositivo de aquisição de amostra 10 compreende um membro de corpo 12, que é dotado de uma base 14, que pode ser tocado por um operador sem provocar qualquer interferência nos resultados da análise. A base 14 pode ser também dotada de projeções 16 que podem encaixar um prendedor em um aparelho de análise. As projeções 16 podem estar dispostas de maneira que o dispositivo de aquisição de amostra 10 seja corretamente posicionado no aparelho de análise.

O dispositivo de aquisição de amostra 10 também compreende uma entrada de amostra 18. A entrada de amostra 18 está definida entre paredes opostas no dispositivo de aquisição de amostra 10, as paredes estando dispostas tão próximas uma da outra que uma força capilar pode ser criada na entrada da amostra 18. A entrada de amostra 18 se comunica com a parte externa do dispositivo de aquisição de amostra 10 para permitir que o sangue seja retirado no dispositivo de aquisição de amostra 10. O dispositivo de aquisição de amostra 10 também compreende uma câmara para contar glóbulos brancos na forma de uma cavidade de medição 20 disposta entre paredes opostas dentro do dispositivo de aquisição de amostra 10. A cavidade de medição 20 está disposta em comunicação com a entrada de amostra 18. As paredes definindo a cavidade de medição 20 estão dispostas mais próximas juntas do que as paredes da entrada da amostra 18, de ma-

neira que a força capilar possa retirar sangue da entrada de amostra 18 na cavidade de medição 20.

5 A cavidade de medição é dotada de uma primeira parte 20a sendo dotada de uma primeira espessura e uma segunda parte 2b sendo dotada de uma segunda espessura menor. A primeira parte 20a está em comunicação com a entrada de amostra 18, enquanto que a segunda parte 20b está em comunicação com a primeira parte 20a. Assim, uma força capilar pode tirar sangue da primeira parte 20a da cavidade de medição 20 na segunda parte 20b.

10 As paredes da primeira parte 20a da cavidade de medição 20 estão dispostas em uma distância uma da outra de 50 a 200 micrometros. A primeira parte 20a é preferivelmente de pelo menos 100 micrometros de espessura. Ademais, a primeira parte 20a é preferivelmente de até 150 micrometros de espessura. A distância é geralmente uniforme sobre toda a primeira parte 20a. A espessura da primeira parte 20a define o volume de sangue sendo examinado. Uma vez que o resultado da análise é comparado ao volume da amostra sanguínea sendo examinada, a espessura geralmente uniforme da primeira parte 20a precisa ser muito precisa, isto é, são permitidas apenas pequenas variações na espessura entre as primeiras partes 20a do dispositivo de aquisição de amostra diferente 10. A espessura é escolhida para permitir um volume de amostra relativamente grande a ser analisado em uma pequena área da cavidade de maneira que um número suficiente de partículas ou células esteja disponível para contagem. A primeira parte 20a da cavidade de medição 20 está especificamente adaptada para determinar um total volumétrico de contagem de glóbulo branco em uma amostra. Toda a espessura da primeira parte 20a pode ser escolhida para permitir que a mesma seja retratada em uma profundidade de campo de um sistema de imagem. Então, uma imagem pode ser analisada e o número de glóbulos brancos presentes na imagem pode ser contado para determinar a contagem volumétrica de glóbulo branco.

30 O dispositivo de aquisição de amostra 10 está tipicamente adaptado para medir contagens de glóbulos brancos acima de  $0,5 \times 10^9$  de célu-

las por litro de sangue. Em contagens de glóbulo branco muito abaixo o volume da amostra será pequeno demais para permitir quantidades estatisticamente significativas de glóbulos brancos a serem contadas. Ademais, quando a contagem de glóbulo branco excede  $12 \times 10^9$  de células por litro de sangue, o efeito das células sanguíneas estando dispostas sobrepostas umas nas outras começará a ser significativo na contagem de glóbulo branco medida. Nessa contagem de glóbulo branco, os glóbulos brancos cobrirão aproximadamente 8% da seção transversal da amostra sendo analisada, se a espessura da primeira parte 20a for de 140 micrometros. Assim, a fim de obter contagens de glóbulos brancos corretas, esse efeito deverá ser considerado. Portanto, pode ser usada uma correção estatística de valores de contagem de glóbulo branco acima de  $12 \times 10^9$  de células por litro de sangue. Essa correção estatística irá aumentar com o aumento das contagens de glóbulo branco, uma vez que o efeito das células sanguíneas em sobreposição aumenta com o aumento das contagens de glóbulo branco. Essa correção estatística pode ser determinada por meio de calibração de um aparelho de medição. Como uma alternativa, a correção estatística pode ser determinada em um nível geral para instalar aparelhos de medição a serem usados com relação ao dispositivo de aquisição de amostra 10. Essa correção estatística é de magnitude similar às correções estatísticas que são realizadas no momento no aparelho de análise que usa o princípio Coulter. É contemplado que o dispositivo de aquisição de amostra 10 possa ser usado para analisar contagens de glóbulo branco tão grandes quanto  $50 \times 10^9$  células por litro de sangue.

25           A segunda parte 20b da cavidade de medição 20 está especificamente adaptada para determinar uma proporção de tipos diferentes de glóbulos brancos em uma amostra sanguínea. Toda a espessura da segunda parte 20a deve ser retratada na profundidade de campo de um sistema de imagem. Então, uma imagem pode ser analisada e o número de glóbulos brancos de cada tipo presente na imagem pode ser contado para determinar a proporção dos tipos diferentes de glóbulos brancos.

30           As paredes da segunda parte 20b da cavidade de medição 20

estão dispostas em uma distância uma da outra de 20 a 60 micrometros. A distância é geralmente uniforme sobre toda a segunda parte 20b. Uma vez que a análise é intencionada principalmente para comparar o número de tipos diferentes de glóbulos brancos uns com os outros, não é crítico saber o volume exato sendo analisado. Portanto, a espessura da segunda parte 20b não precisa ser tão precisa quanto a espessura da primeira parte 20a. A espessura da segunda parte 20b precisa permitir uma quantidade suficiente de glóbulos brancos a serem analisados a fim de obter resultados estatísticos significativos. Ademais, conforme declarado acima, a espessura da segunda parte 20b deve estar adaptada para ser totalmente retratada em uma profundidade de campo de um sistema de imagem. Assim, todos os glóbulos brancos no sangue são retratados no foco e a análise da amostra não é obstruída por ruído na imagem proveniente de partes da amostra retratada fora do foco. A segunda parte 20b é mais fina do que a primeira parte 20a a fim de possibilitar o uso de uma ampliação maior ao mesmo tempo em que permite que toda a segunda parte seja retratada em uma profundidade de campo do sistema de imagem. A ampliação maior pode ser necessária para permitir não apenas contagem do número total de glóbulos brancos, mas também determinar o tipo de glóbulos brancos.

Uma superfície de uma parede da cavidade de medição 20 é pelo menos parcialmente revestida com um reagente 22. O reagente 22 pode ser seco por congelamento, seco por aquecimento ou seco a vácuo e aplicado na superfície da cavidade de medição 20. Quando uma amostra sanguínea é adquirida na cavidade de medição 20, o sangue irá contatar o reagente seco 22 e iniciar uma reação entre o reagente 22 e o sangue.

O reagente 22 é aplicado pela inserção de reagente 22 na cavidade de medição 20 usando uma pipeta ou dispensador. O reagente 22 é dissolvido em um líquido volátil, por exemplo, um solvente orgânico como, por exemplo, metanol, quando inserido na cavidade 20. O solvente com o reagente 22 pode encher a cavidade de medição 20. Então, é realizada a secagem de maneira que o solvente será evaporado e o reagente 22 será fixado na superfície da cavidade de medição 20.

Uma vez que o reagente deva ser seco na superfície de um espaço estreito, o líquido terá uma superfície muito pequena em contato com a atmosfera ambiente, por meio do que a evaporação é dificultada. Assim, é vantajoso usar um líquido volátil, como, por exemplo, metanol, que possibilita a evaporação do líquido de maneira efetiva de um espaço estreito da cavidade de medição.

De acordo com um método de fabricação alternativo, o dispositivo de aquisição de amostra 10 pode ser formado pela fixação de duas partes uma na outra, por meio do que uma parte forma a parede de fundo da cavidade de medição 20 e a outra parte forma a parede superior da cavidade de medição 20. Isso permite que um reagente 22 seja seco em uma superfície aberta antes das duas partes serem fixadas uma na outra. Assim, o reagente 22 pode ser dissolvido em água, uma vez que o solvente não precisa ser volátil.

O reagente 22 compreende um agente de hemolização de glóbulo vermelho e um agente manchador de glóbulo branco. O agente de hemolização pode ser um sal amoníaco quaternário, uma saponina, um ácido bile, como, por exemplo, um ácido deoxicólico, uma digitoxina, um veneno de cobra, um glucopiranosídeo ou um detergente não-iônico do tipo Triton. O agente manchador pode ser hematoxilina, azul de metileno, verde de metileno, azul de metileno, acetato de cresil violeta, azul de toluidina, violeta geniana, "sudan analogue", galocianina, ou uma fucsina análoga, ou qualquer combinação dos mesmos. Quando uma amostra sanguínea contata o reagente 22, o agente de hemolização age para lise os glóbulos vermelhos de maneira que os glóbulos vermelhos lisados seja misturado com o plasma sanguíneo. Ademais, o agente manchador irá se acumular no núcleo dos glóbulos brancos. O reagente 22 deve conter quantidades suficientes de agente manchador para manchar distintamente todos os núcleos dos glóbulos brancos. Assim, sempre haverá um excedente de agente manchador, que será internamente misturado no plasma sanguíneo. O excedente do agente manchador irá fornecer um nível de fundo baixo, homogêneo de agente manchador no plasma sanguíneo. O agente manchador acumulado nos gló-

bulos brancos será distinguível sobre um nível de fundo de agente manchador.

5 O reagente 22 pode também compreender outros constituintes, que podem ser ativos, isto é, participando na reação química com a amostra sanguínea, ou não-ativos, isto é, não participando na reação química com a amostra sanguínea. Os constituintes ativos podem, por exemplo, estar dispostos para catalisar a hemolização ou ação de manchar. Os constituintes não-ativos podem, por exemplo, estar dispostos para aperfeiçoar a fixação do reagente 22 na superfície de uma parede da cavidade de medição 20.

10 Em alguns minutos ou mesmo menos de um minuto, a amostra sanguínea terá reagido com o reagente 22, de maneira que os glóbulos vermelhos tenham sido lisados e o agente manchador tenha se acumulado no núcleo dos glóbulos brancos.

15 Com relação à figura 2, será descrita uma primeira modalidade de um aparelho de medição 30 para analisar glóbulos brancos em uma amostra sanguínea. O aparelho 30 compreende um prendedor de amostra 32 para receber um dispositivo de aquisição de amostra 10 com uma amostra sanguínea. O prendedor de amostra 32 está disposto para receber o dispositivo de aquisição de amostra 10 de maneira que a cavidade de medição 20 do dispositivo de aquisição de amostra 10 esteja corretamente posicionada no aparelho 30. O aparelho 30 compreende uma fonte de luz 34 para iluminar a amostra sanguínea no dispositivo de aquisição de amostra 10. A fonte de luz 34 pode ser uma lâmpada incandescente, que irradie luz em todo espectro visível. O agente manchador que está acumulado no núcleo dos glóbulos brancos irá absorver luz dos comprimentos de onda específicos, de maneira que o núcleo de todos os glóbulos brancos irá emergir em uma imagem digital da amostra. Se for adquirida uma imagem de cor, os glóbulos brancos irão emergir como pontos especificamente coloridos. Se for adquirida uma imagem preto e branco, os glóbulos brancos irão emergir como pontos escuros contra um fundo mais claro.

20  
25  
30

A fonte de luz 34 pode alternativamente ser um laser ou um diodo emitindo luz. Isso pode ser usado para aumentar o contraste na imagem

de maneira que os glóbulos brancos possam ser mais facilmente detectados. Nesse caso, a fonte de luz 34 está disposta para irradiar radiação eletromagnética de um comprimento de onda que corresponda a um pico de absorção do agente manchador. O comprimento de onda deve também ser  
5 escolhido de maneira que a absorção dos componentes dos glóbulos não brancos no sangue seja relativamente baixa. Ademais, as paredes do dispositivo de aquisição de amostra 10 devem ser essencialmente transparentes para o comprimento de onda. Por exemplo, quando é usado o azul de metileno como o agente manchador, a fonte de luz 34 pode estar disposta para  
10 irradiar com luz sendo dotada de um comprimento de onda de 667 nm.

O aparelho 30 também compreende um sistema de imagem 36, que está disposto um lado oposto do prendedor de amostra 32 com relação à fonte de luz 34. Assim, o sistema de imagem 36 está disposto para receber radiação que tenha sido transmitida através da amostra sanguínea. O sistema de imagem 36 nessa modalidade compreende um dispositivo de ampliação  
15 38 que está dividido em duas partes separadas. Uma primeira parte 38a do dispositivo de ampliação 38 está disposta para receber radiação que tenha sido transmitida através da amostra sanguínea na primeira parte 20a da cavidade de medição 20. O sistema de imagem também compreende um  
20 primeiro dispositivo de aquisição de imagem 40, que está disposto para receber a primeira parte 20a da cavidade de medição 20 conforme ampliada pela primeira parte 38a do dispositivo de ampliação 38. A primeira parte 38a do dispositivo de ampliação 38 está disposta para proporcionar uma potência de ampliação de 1 a 50x, mais preferivelmente de 1 a 20x, e mais preferivelmente de 1 a 4x. Dentre dessas variações de potência de ampliação, é  
25 possível distinguir os glóbulos brancos. A imagem pode ser adquirida com resolução aperfeiçoada a fim de permitir o uso de uma potência de ampliação inferior. Ademais, a profundidade de campo da primeira parte 38a do dispositivo de ampliação 38 pode estar disposta para incluir a espessura da  
30 cavidade de medição 20.

A primeira parte 38a do dispositivo de ampliação 38 compreende uma lente objetiva ou sistema de lente 42, que está disposta próximo ao

prendedor de amostra 32, e uma lente ocular ou sistema de lente 44, que está disposta em uma distância da lente objetiva 42. A lente objetiva ou sistema de lente 42 e a lente ocular ou sistema de lente 44 pode incluir uma ou uma pluralidade de lentes individuais ou outros componentes ópticos. A lente objetiva 42 proporciona uma primeira ampliação da amostra, que é também ampliada pela lente ocular 44. O dispositivo de ampliação 38 pode também compreender lentes para realizar uma ampliação apropriada e concepção da amostra. A primeira parte 38a do dispositivo de ampliação 38 está disposta de maneira que a amostra na primeira parte 20a da cavidade de medição 20 quando colocada no prendedor de amostra 32 seja focada em um plano de imagem do primeiro dispositivo de aquisição de imagem 40.

O primeiro dispositivo de aquisição de imagem 40 está disposto para adquirir uma primeira imagem digital da amostra. O primeiro dispositivo de aquisição de imagem 40 pode ser qualquer tipo de câmara digital, como, por exemplo, uma câmara CCD ou CMOS. Referência a uma câmara digital conforme aqui descrita deve ser considerada apenas como uma modalidade de uma parte de análise de imagem. O tamanho do pixel da câmara digital ajusta uma restrição no sistema de imagem 30 de maneira que o círculo de confusão no plano de imagem não exceda o tamanho do pixel na profundidade de campo. Contudo, os glóbulos brancos ainda podem ser detectados se os mesmos estiverem de alguma forma manchados e, portanto, o círculo de confusão pode ser permitido a exceder o tamanho do pixel ao mesmo tempo em que é considerado na profundidade de campo, conforme definido nesse contexto. Conforme aqui usado, "profundidade de campo" irá, portanto, implicar uma extensão em uma direção ao longo do eixo geométrico óptico que é retratado em um foco suficiente para permitir análise da imagem para identificar células posicionados dentro dessa extensão. Essa "profundidade de campo" pode ser diferente de uma profundidade de campo convencional definida pelos ajustes ópticos e pode depender da realização de uma análise de imagem específica.

A câmara digital 40 irá adquirir uma primeira imagem digital da amostra na primeira parte 20a da cavidade de medição 20, onde toda a es-

pessura da amostra é suficientemente focada na primeira imagem digital para contar os glóbulos brancos. O sistema de imagem 36 irá definir uma área da primeira parte 20a da cavidade de medição 20, que será retratada na primeira imagem digital. A área sendo retratada juntamente com a espessura da primeira parte 20a da cavidade de medição 20 define o volume da amostra sendo retratada.

Uma segunda parte 38b do dispositivo de ampliação 38 está disposta para receber radiação que tenha sido transmitida através de amostra sanguínea na segunda parte 20b da cavidade de medição 20. O sistema de imagem também compreende um segundo dispositivo de aquisição de imagem 41, que está disposto para conceber a segunda parte 20b da cavidade de medição 20 conforme ampliada pela segunda parte 38b do dispositivo de ampliação 38. A segunda parte 38b do dispositivo de ampliação 38 está disposta para proporcionar uma potência de ampliação de 5 a 200x, mais preferivelmente de 5 a 100x, e mais preferivelmente de 5 a 20x. Com essas variações de potência de ampliação, é possível distinguir entre os glóbulos brancos. A imagem pode ser adquirida com uma resolução aperfeiçoada a fim de permitir o uso de potência de ampliação inferior. Ademais, a potência de ampliação da segunda parte 38b do dispositivo de ampliação 38 pode ainda estar disposta para incluir a espessura da cavidade de medição 20.

Como a primeira parte 38a, a segunda parte 38b do dispositivo de ampliação 38 também compreende uma lente objetiva ou sistema de lente 43, que está disposta próximo ao prendedor de amostra 32, e uma lente ocular ou sistema de lente 45, que está disposto em uma distância da lente objetiva 43. Novamente, a lente objetiva ou sistema de lente 43 e a lente ocular ou sistema de lente 45 podem incluir uma ou uma pluralidade de lentes ou outros componentes ópticos. A lente objetiva 43 proporciona uma primeira ampliação da amostra, que é também ampliada pela lente ocular 45. O dispositivo de ampliação 38 pode também compreender lentes ou outros componentes ópticos para realizar uma ampliação apropriada e conceber a amostra. A segunda parte 38b do dispositivo de ampliação 38 está dis-

posta de maneira que a amostra na segunda parte 20b da cavidade de medição 20 quando colocada no prendedor de amostra 32 será focada no plano de imagem do segundo dispositivo de aquisição de imagem 41.

5 O segundo dispositivo de aquisição de imagem 41 está disposto para adquirir uma segunda imagem digital da amostra. O segundo dispositivo de aquisição de imagem 41 pode ser qualquer tipo câmara digital, como, por exemplo, uma câmara CCD ou CMOS. Uma vez que a segunda imagem deva ser usada para determinar tipos diferentes de glóbulos brancos, o círculo de confusão na imagem não deve exceder o tamanho do pixel na profundidade de campo. A câmara digital 41 irá adquirir uma segunda imagem digital da amostra na segunda parte 20a da cavidade de medição 20, onde toda a espessura da amostra é suficientemente focada na segunda imagem digital para identificar o tipo de glóbulos brancos presentes.

15 O sistema de imagem 36 pode estar disposto para conceber amostras sanguíneas nos dispositivos de aquisição de imagem 10 sem que seja necessário ajustar o sistema de imagem 36. Preferivelmente, o sistema de imagem 36 está disposto em um alojamento que mantenha o sistema de imagem em uma relação fixa para o prendedor de amostra.

20 O aparelho 30 também compreende um analisador de imagem 46. O analisador de imagem 46 está conectado à primeira e segunda câmaras digitais 40, 41 para receber primeira e segunda imagens digitais adquiridas pelas câmaras digitais 40, 41. O analisador de imagem 46 está disposto para identificar padrões na primeira imagem digital que correspondam a um glóbulos brancos para contagem de número de glóbulos brancos presentes na imagem digital. Assim, o analisador de imagem 46 pode estar disposto para identificar pontos escuros em um fundo mais claro. O analisador de imagem 46 pode estar disposto para ampliar eletronicamente a imagem digital antes de analisar a imagem digital. Isso implica no fato de que o analisador de imagem 46 pode ser capaz de distinguir mais facilmente glóbulos brancos que estejam retratados próximos uns aos outros, mesmo se a ampliação eletrônica da imagem digital torne a imagem digital manchada de  
30 alguma maneira.

O analisador de imagem 46 pode incluir um processador adaptado para receber informação de imagem da primeira e segunda câmaras digitais 40, 41. O processador pode estar configurado com um software ou algoritmos de análise de imagem, por exemplo, a natureza precisa do qual  
5 pode ser adaptada para realizar análises conforme aqui descrito.

O analisador de imagem 46 pode calcular o número de glóbulos brancos por volume de sangue dividindo o número de glóbulos brancos sendo identificados na primeira imagem digital com o volume da amostra sanguínea, que está bem definida conforme acima descrito. A contagem volumétrica do glóbulo branco pode ser apresentada em um monitor do aparelho  
10 30.

O analisador de imagem 46 está adicionalmente disposto para identificar padrões na segunda imagem digital que correspondam a um glóbulo branco para contar o número de glóbulos brancos presentes na imagem digital. O analisador de imagem 46 irá também analisar a forma e o tamanho de cada glóbulo branco detectado a fim de determinar o tipo de glóbulos branco. Assim, o analisador de imagem 46 pode estar disposto para identificar pontos escuros em um fundo mais claro como glóbulos brancos. O analisador de imagem 46 pode estar disposto para primeiro ampliar eletronicamente a imagem digital antes de analisar a imagem digital. Isso implica no fato de que o analisador de imagem 46 pode ser capaz de distinguir mais facilmente os glóbulos brancos que sejam retratados próximos uns aos outros, mesmo se a ampliação eletrônica da imagem digital torne a imagem digital manchada de alguma maneira. O analisador de imagem 46 irá então  
15 20 25 30 determinar o tipo de glóbulo branco por meio de vários critérios, um critério importante sendo o tamanho do glóbulo branco retratado. De acordo com literatura, os linfócitos são dotados de um diâmetro em torno de 5 a 11 micrometros, os granulócitos são dotados de um diâmetro em torno de 8 a 15 micrometros e os monócitos são dotados de um diâmetro em torno de 16 a 25 micrometros. Uma vez que os tamanhos esperados em alguns casos sobrepõem é preferivelmente usada informação adicional para discriminar tipos de glóbulo branco diferentes uns dos outros. Tal informação pode, por e-

xemplo, ser a forma e/ou tamanho do núcleo. Os granulócitos podem, por exemplo, ser identificados pela presença de dois ou mais pontos na célula correspondente a um núcleo segmentado. Isso pode ser usado para aperfeiçoar a avaliação feita pela classificação por tamanho.

5                   Pode ser obtida uma contagem de glóbulo branco diferenciada em cinco partes, onde os granulócitos são também diferenciados como eosinófilos, neutrófilos e basófilos, pode ser obtida usando características físicas adicionais. Ainda, as três partes de contagem de glóbulo branco podem ser aperfeiçoadas usando essas características físicas adicionais. Assim, a análise pode também examinar a forma dos glóbulos brancos detectados. Ainda, a análise pode também examinar uma intensidade de radiação transmitida através dos glóbulos brancos detectados.

10                   O analisador de imagem 46 pode calcular o número de glóbulos brancos de cada tipo. Tipicamente, o analisador de imagem 46 pode contar e classificar um determinado número, por exemplo, 1000 glóbulos brancos. A porcentagem ou proporção de cada tipo de glóbulos brancos pode então ser determinada como o número de glóbulos brancos classificados pertencentes ao tipo dividido com o número total dos glóbulos brancos analisados. Uma medida estatisticamente significativa pode determinar por análise em torno de 200 glóbulos brancos por tipo. Contudo, é desejado que seja analisado um número maior de glóbulos brancos por tipo a fim de aperfeiçoar as estatísticas. Ademais, o analisador de imagem 46 pode estar disposto para analisar glóbulos brancos que sejam retratados em foco suficiente para serem apropriadamente classificados. Ainda, quando dois ou mais glóbulos brancos estiverem muito próximos uns dos outros, pode ser difícil separar os mesmos corretamente, e, portanto, tais glóbulos brancos podem ser completamente desconsiderados pelo analisador de imagem 46. Por outro lado, uma vez que o sistema de imagem 36 está disposto para conceber toda espessura da segunda parte 20b da cavidade de medição 20 em foco, o analisador de imagem 36 pode determinar uma enumeração volumétrica de cada tipo de glóbulos brancos apenas da segunda imagem digital.

                  O analisador de imagem 46 pode ser retratado como uma uni-

dade de processamento, que compreende códigos para realizar a análise de imagem.

Com relação à figura 3, será descrita uma segunda modalidade de um aparelho de medição 130 para análise de glóbulos brancos em uma amostra sanguínea. O aparelho 130 compreende um prendedor de amostra 132 para receber um dispositivo de aquisição de amostra 110 com uma amostra sanguínea. O aparelho 130 está disposto para receber os dispositivos de aquisição de amostra 110, onde a cavidade de medição 120 é dotada de uma espessura uniforme sobre toda área sendo retratada. Assim, a cavidade de medição 120 é dotada de uma espessura correspondente à primeira parte 20a da cavidade de medição 20 do dispositivo de aquisição de amostra 10 de acordo com a modalidade descrita acima com relação à figura 1. O prendedor de amostra 132 está disposto para receber o dispositivo de aquisição de amostra 110 está corretamente posicionado no aparelho 130. O aparelho 130 compreende uma fonte de luz 132 para iluminar a amostra sanguínea no dispositivo de aquisição de amostra 110 em uma maneira correspondente como a fonte de luz 34 da primeira modalidade.

O aparelho 130 também compreende um sistema de imagem 136, que está disposto em um lado oposto do prendedor de amostra 132 com relação à fonte de luz 134. Assim, o sistema de imagem 136 está disposto para receber radiação que tenha sido transmitida através da amostra sanguínea. O sistema de imagem 136 nessa modalidade está disposto para adquirir uma primeira e uma segunda imagem digital ao longo do mesmo caminho óptico de maneira que as imagens sejam centradas na mesma parte na cavidade de medição 120. Ainda, a primeira e a segunda imagens digitais da amostra são adquiridas usando ajustes ópticos diferentes. Isso pode ser alcançado de muitas maneiras diferentes, conforme será descrito abaixo.

Conforme ilustrado na figura 3, o sistema de imagem compreende um dispositivo de ampliação 138 que compreende uma parte comum e duas partes separadas. O dispositivo de ampliação 138 pode compreender uma lente objetiva ou sistema de lente 142, que está disposta próximo ao prendedor de amostra 132 e que é compartilhada com os dois ajustes ópti-

cos para adquirir tanto a primeira quanto a segunda imagens digitais. A lente objetiva 142 proporciona uma primeira ampliação da imagem. O sistema de imagem 136 pode também compreender um separador de feixe 139 para direcionar luz em duas direções diferentes em direção a um primeiro e um  
5 segundo dispositivo de aquisição de imagem 140, 141, que podem ser qualquer tipo de câmara digital, como, por exemplo, uma câmara CCD. O dispositivo de ampliação 138 compreende uma primeira lente ocular ou sistema de lente 144, que está disposta entre o separador de feixe 139 e a primeira câmara digital 140. A lente objetiva 142 proporciona uma primeira ampliação  
10 da amostra, que é adicionalmente ampliada pela lente ocular 144. O dispositivo de ampliação 138 pode compreender lentes adicionais ou elementos ópticos para realizar uma ampliação e concepção apropriadas da amostra na primeira imagem digital.

O dispositivo de ampliação 138 também compreende uma se-  
15 gunda lente ocular ou sistema de lente 145, que está disposta entre o separador de feixe 139 e a segunda câmara digital 141. A lente objetiva 142 proporciona uma primeira ampliação da amostra, que ta também ampliada pela lente ocular 145. O dispositivo de ampliação 138 pode também compreender lentes ou elementos ópticos para realizar uma ampliação e concepção apro-  
20 priadas da amostra na segunda imagem digital. A lente objetiva 142 e a lente ocular 145 podem ser implementadas como acondicionamentos de lente e o condicionamento da lente ocular 145 irá então mover um plano principal virtual no acondicionamento de lente objetiva 142 para mudar a relação entre o plano de imagem e o acondicionamento de lente objetiva 142 para permitir a  
25 ampliação adicional, enquanto o dispositivo de aquisição de amostra 110 não é movido com relação ao acondicionamento de lente objetiva 142. Dessa maneira, podem ser obtidas ampliações diferentes na primeira e na segunda imagens digitais.

Especificamente, o dispositivo de ampliação 138, conforme ilus-  
30 trado nessa modalidade compreende um elemento óptico 147 que enfatiza concepção doa glóbulos brancos que estão colocados no foco. Isso aumenta as possibilidades para identificar quais os tipos de células sanguíneas que

estão sendo retratadas no foco e, por meio disso, devem ser consideradas ao distinguir entre tipos diferentes de glóbulos brancos.

O elemento óptico 147 permite a aquisição de uma imagem de uma espessura de amostra maior do que a profundidade de campo da parte do sistema de imagem 136 que captura a segunda imagem digital. O elemento óptico 147 assegura que as células que estejam fora de foco possam ser tiradas da consideração a fim de aumentar a certeza da medição. Uma vez que o elemento óptico 147 afeta a concepção das células fora do foco, as células no foco serão facilmente identificadas. O elemento óptico 147 pode ser implementado como um filtro espacial que afeta a concepção de uma célula de maneira que a borda da célula compreenda uma intensidade de sobreposição maior do que a intensidade de fundo, onde a célula é retratada pela absorção de luz. Isso pode ser facilmente detectado na análise de imagem e, portanto, essas células podem ser rapidamente descartadas da consideração.

De acordo com uma modalidade alternativa, o dispositivo de ampliação pode compreender um elemento de codificação de frente de onda entre o separador de feixe 139 e a segunda câmara digital 141. O elemento de codificação de frente de onda, portanto, substitui o elemento óptico 147. Um elemento de codificação de frente de onda distorce deliberadamente os raios de luz passando os mesmos através de uma placa de onda em forma de sela, que é relativamente chata no meio, mas as bordas são festonadas. Isso causa uma aberração óptica específica, a imagem parece manchada, mas o desfoco é o mesmo sobre uma grande variação de distâncias. Portanto o elemento de codificação de frente de onda aumenta uma profundidade ao longo do eixo geométrico óptico que pode ser analisado. As distorções na imagem são determinadas principalmente pela forma do elemento de codificação de frente de onda, que é precisamente conhecido. Portanto, um computador é capaz de remover a mancha ponto por ponto. Um computador pode decodificar a imagem usando o que é essencialmente um filtro digital, e, assim criar uma imagem que seja viva sobre uma grande profundidade de campo. Dessa maneira, o dispositivo de ampliação pode aumentar a profun-

didade do campo do sistema de imagem, possibilitando uma maior profundidade de uma amostra a ser retratada no foco.

5 Nessa modalidade, o separador de feixe pode ser substituído pelo sistema de imagem 136 e pode compreender um espelho ou outro elemento (não ilustrado) para direcionar essencialmente toda luz da amostra em direção a uma das duas câmaras digitais selecionadas 140, 141. O espelho pode então ser girado ou movido para deslocar a câmara 140, 141 que esteja visualizando a amostra. Isso permite maior passagem de luz para as câmaras digitais 140, 141 e, assim, fornece melhores condições de luz para  
10 aquisição de imagens. Contudo, as duas imagens podem não ser gravadas simultaneamente e o sistema de imagem 136 precisará mover partes. De acordo com uma alternativa, uma das câmaras pode estar disposta para visualizar a amostra quando o espelho for completamente removido do caminho óptico.

15 De acordo com outra alternativa, a lente objetiva 142 pode proporcionar toda ampliação necessária para obter a primeira imagem. Assim, a luz pode ser passada diretamente do separador de feixe ou espelho para a primeira câmara digital 140.

20 Ainda de acordo com outra alternativa, nenhuma lente objetiva é compartilhada pelo primeiro e segundo ajustes ópticos. Assim, um separador de feixe ou espelho pode estar disposto próximo ao prendedor de amostra 132 e o dispositivo de ampliação 138 pode compreender tanto uma lente objetiva quanto uma lente ocular em ambos os caminhos ópticos entre o separador de feixe e a primeira câmara digital 140 e entre o separador de feixe  
25 e a segunda câmara digital 141.

De acordo com alternativa, a primeira e a segunda imagens digitais são obtidas por meio de uma câmara digital. Nesse caso, o dispositivo de ampliação 138 precisa ser comutada ou alterada a fim de alterar os ajustes ópticos para obter duas imagens digitais. Assim, uma lente objetiva 242  
30 pode ser móvel entre duas posições diferentes bem definidas, conforme ilustrado na figura 5. A lente objetiva 242 pode, assim, estar disposta para ser movida ao longo do eixo geométrico óptico e irá contatar uma parada, por

exemplo, uma borda do eixo geométrico óptico contatando uma saliência 250, 252. A distância da lente objetiva e do dispositivo de aquisição de amostra pode, deste modo, ser precisamente controlada para controlar a ampliação de uma imagem a ser adquirida.

5                   Em qualquer das alternativas acima descritas, a primeira câmara digital 140 está disposta para conceber a cavidade de medição 120 com um primeiro ajuste óptico proporcionado pelo dispositivo de ampliação 138. O dispositivo de ampliação 128 está, deste modo, disposto para proporcionar uma potência de ampliação de 1 a 50x, mais preferivelmente de 1 a 20x, e  
10 mais preferivelmente de 1 a 4x. Dentro dessas variações da potência de ampliação, é possível distinguir os glóbulos brancos. A imagem pode ser adquirida com uma resolução aperfeiçoada a fim de permitir o uso de potência de ampliação inferior. Ademais, a profundidade de campo do dispositivo de ampliação 138 pode ainda estar disposta para incluir a espessura da ca-  
15 vidade de medição 120.

Conforme descrito com relação à primeira modalidade ilustrada na figura 2, a primeira câmara digital 140 na segunda modalidade está disposta para adquirir uma primeira imagem digital da amostra. A primeira câmara digital 140 visualiza a amostra de maneira que toda a espessura da  
20 cavidade de medição 120 esteja dentro da profundidade de campo conforme definido para a primeira modalidade. O sistema de imagem 136 irá definir uma área da cavidade de medição 120, que irá ser retratada na primeira imagem digital. A área sendo retratada junto com a espessura da cavidade de medição 120 define o volume da amostra sendo retratada.

25                   Adicionalmente, em qualquer das modalidades acima descritas, a segunda câmara digital 141 está disposta para conceber a cavidade de medição 120 com um segundo ajuste óptico proporcionado pelo dispositivo de ampliação 138. O dispositivo de ampliação 138 está disposto para proporcionar potência de ampliação de 5 a 200x, mais preferivelmente de 5 a  
30 100x, e mais preferivelmente de 5 a 20x. Dentro dessas variações de potência de ampliação, é possível distinguir os glóbulos brancos. A imagem pode ser adquirida com uma resolução apropriada a fim de permitir o uso de po-

tência de ampliação inferior. Contudo, uma vez que a segunda imagem digital visualiza a mesma parte da cavidade de medição 120 como a primeira imagem digital, a ampliação maior usada no segundo ajuste óptico pode impedir a concepção de espessura da cavidade de medição 120 na profundidade de campo. A segunda imagem digital irá, desta maneira, conceber os glóbulos brancos em foco, mas também irá conceber glóbulos brancos e outras partes da amostra sanguínea que estejam fora de foco provocando um distúrbio de mancha na imagem. Nessas condições, o elemento óptico 147, conforme acima descrito, irá aperfeiçoar as chances para identificar células que sejam retratadas no foco facilitando a classificação quanto ao tipo.

O dispositivo de ampliação 138 pode vantajosamente estar disposto para colocar uma parte superior da espessura da cavidade de medição 120 no foco no plano de imagem da segunda câmara digital 141. Isso implica no fato de que os distúrbios das partes da amostra sanguínea que estão fora de foco estejam perto do fundo e permaneçam relativamente baixas. Contudo, é concebível que qualquer parte da cavidade de medição 120 seja retratada no foco na segunda imagem digital. Ademais, o dispositivo de ampliação 138 pode estar disposto para tipicamente conceber uma espessura de 20 a 60 micrometros da cavidade de medição 120 no foco.

Ainda de acordo com outra alternativa, conforme ilustrado na figura 6, é adquirida apenas uma imagem digital. Contudo, essa imagem digital precisa proporcionar informação da direção da luz sendo detectada. Isso implica no fato de que a imagem digital contenha informação não apenas da radiação detectado, como também de um ponto no espaço do qual a radiação detectada foi emitida. Essa imagem digital pode então ser apresentada de tal maneira que o foco da imagem digital possa ser deslocada conforme desejado. A imagem digital pode, dessa maneira, ser usada primeiramente para contar o número total de glóbulos brancos em toda profundidade da cavidade de medição e, em segundo lugar, para deslocar o foco para uma parte da espessura, para determinar a proporção de tipos diferentes de glóbulos brancos na amostra. Essa alternativa pode ser implementada conforme ilustrado na figura 6 compreendendo uma fonte de luz 334, uma lente

objetiva 342 e uma câmara digital 340. Essas partes podem ser implementadas e uma maneira similar, conforme descrito acima. O aparelho também compreende um arranjo de lentes pequenas 360 sendo proporcionado no caminho óptico entre o dispositivo de aquisição de amostra 110 e a câmara digital 340. O arranjo de lentes pequenas 360 proporciona uma possibilidade para traçar raios na imagem adquirida de maneira que partes diferentes da imagem sejam colocadas no foco.

Voltando à figura 3, o aparelho 130 também compreende um analisador de imagem 146. O analisador de imagem 146 está conectado à primeira e segunda câmaras digitais 140, 141 para receber primeira e segunda imagens digitais adquiridas pelas câmaras digitais 140, 141. Alternativamente, o analisador de imagem 146 recebe apenas uma imagem digital contendo informação da direção de luz conforme descrito no parágrafo acima. O analisador de imagem 146 está disposto para analisar a primeira e segunda imagens digitais em uma maneira similar conforme descrito para o analisador de imagem 46 da primeira modalidade acima. Contudo, uma vez que a segunda imagem digital pode ser obtida concebendo apenas parte da espessura da amostra na profundidade de campo, o analisador de imagem 146 pode precisar manusear a segunda imagem digital mais cuidadosamente. Primeiramente, o analisador de imagem 146 irá apenas analisar glóbulos brancos que sejam identificados como imagem no foco. Isso é possível porque o analisador de imagem 146 pode apenas determinar a proporção de tipos diferentes de glóbulos brancos e, portanto, não irá precisar conhecer exatamente o volume da amostra sendo analisada. As células que são retratadas fora do foco podem ser manchadas de maneira que o analisador de imagem 146 pode determinar tamanhos incorretos das células e, portanto, classificar as células incorretamente. Assim, assegurando que apenas as células que sejam retratadas no foco sejam analisadas, a certeza da análise será aperfeiçoada.

A figura 7 ilustra uma amostra 710 retratada em três camadas diferentes de 720a - c da amostra 710. A camada 720b indica um plano de foco a ser comentado em detalhes abaixo. Um sistema óptico é dotado de

uma profundidade de campo na qual os objetos podem ser considerados estando no foco mesmo se os mesmos não estiverem posicionados exatamente no plano de foco. Na figura 7 a profundidade de campo do plano de foco 720b está indicada pela área pontilhada 720b'.

5                   As figuras de 8a a c ilustram três glóbulos brancos diferentes na concepção de câmara e as figuras de 9a a 9c ilustram suas respectivas distribuições de luz.

10                   A figura 8b ilustra um glóbulo branco retratado em foco. O núcleo aparece como sombras escuras enquanto que o citoplasma circundante é quase invisível. Na figura 9b está ilustrada a distribuição da intensidade de luz. O núcleo aparece como partes com intensidade de luz significativamente inferior enquanto que o citoplasma não afeta a intensidade de luz.

15                   A figura 8a ilustra um glóbulo branco retratado próximo demais do dispositivo de aquisição de imagem 441 a estar no foco. O núcleo aparece como sombras escuras enquanto que o citoplasma circundante age como uma lente e refrata e difunde a luz que resulta em um círculo escuro ao redor do núcleo. Na figura 9a está ilustrada a distribuição da intensidade de luz. O núcleo aparece como uma parte com intensidade de luz significativamente inferior e o citoplasma aparece com uma intensidade de luz baixa.

20                   A figura 8c ilustra um glóbulo branco retratado longe demais do dispositivo de aquisição de imagem 441 a estar no foco. O núcleo aparece como sombras escuras enquanto que o citoplasma circundante age como uma lente e refrata a luz resultando em um círculo brilhoso ao redor do núcleo. Na figura 9c está ilustrada a distribuição da intensidade de luz. O núcleo aparece como uma parte com uma intensidade de luz significativamente inferior enquanto que o citoplasma aparece com alta intensidade de luz.

25                   O analisador de imagem 146 está também disposto para determinar o tamanho dos glóbulos brancos retratados no foco. Esse tamanho determinado pode ser então usado para classificar os glóbulos brancos em  
30                   uma maneira correspondente à maneira descrita acima com relação à primeira modalidade. Uma vez que a segunda imagem digital pode estar um pouco manchada e difícil de ser analisada, o analisador de imagem 146 po-

de estar disposto para contar e classificar apenas um número relativamente pequeno, digamos 200, de glóbulos brancos. Isso pode ainda ser suficiente para formar um resultado estatisticamente significativo da proporção de tipos diferentes de glóbulos brancos na amostra. Como uma alternativa, o analisador de imagem 146 pode estar disposto para realizar medição de tamanho e verificar se uma célula está retratada no foco na mesma etapa de processamento de imagem. Desta maneira é determinado o tamanho de cada célula retratada, mas apenas as células que estão retratadas no foco são consideradas ao examinar a proporção dos diferentes tipos de glóbulos brancos na amostra.

O analisador de imagem 146 pode ser retratado como uma unidade de processamento, que compreende códigos para realizar a análise de imagem.

Ao usar o ponto fundamental das figuras de 7 a 9a a c e o ajuste da figura 10 o aparelho 30 pode estar disposto para adquirir várias imagens digitais da amostra usando ajustes ópticos diferentes. Por exemplo, as várias imagens digitais podem conceber dez camadas diferentes 720a a j da amostra 710, conforme ilustrado na figura 10. O analisador de imagem está disposto para, para uma partícula ou célula específica, determinar o número das ditas imagens nas quais a dita partícula ou célula é retratada. A contagem de imagens começa de uma imagem na qual a partícula ou célula seja determinada como estando no foco em uma primeira direção contínua por via da imagem(s) na qual a partícula ou célula é determinada como estando no foco e termina em uma imagem na qual a partícula ou célula seja determinada fora de foco em uma segunda direção. A primeira e segunda direção são basicamente opostas normais para o plano de foco. Nas figuras 8a e 9a a célula é determinada como estando fora de foco em uma primeira direção. O limite para estar fora de foco nessa direção é determinado para ser a imagem na qual o contraste maior é medido para uma célula específica para as áreas diferentes (área central e de círculo). Para as células estando situadas ainda mais próximas ao sistema de imagem será detectada a mesma forma básica com o círculo escuro ao redor de um núcleo, mas as mesmas serão

mais manchadas e o contraste será mais baixo do que a imagem determinada como o limite para estar fora de foco na primeira direção. Similarmente, será determinado o outro limite identificando em qual imagem é detectado o maior contraste entre o núcleo escuro e a luz circundando o núcleo. Nas  
5 imagens com um plano de foco ainda mais longe do sistema de imagem, as células serão detectadas como um núcleo escuro e um círculo claro, mas as mesmas serão mais manchadas e o contraste será mais baixo do que na imagem que é considerada como o limite para estar fora de foco na segunda direção.

10 Isso fornecerá informação com relação ao raio de curvatura do respectivo glóbulo branco. Um glóbulo branco comparativamente pequeno fornecerá uma extensão de foco comparativamente curta e irá, ao contar as imagens entre as imagens-limite, resultar em um número de imagens comparativamente baixo. Isso pode também ser dito como aquelas que se mo-  
15 vem rapidamente dentro e fora do foco. Um glóbulo branco comparativamente grande irá fornecer uma extensão de foco mais longa e a distância entre a imagem na qual as mesmas estão fora de foco em uma direção e a imagem na qual as mesmas estão fora de foco na outra direção será comparativa-  
20 mente maior. Isso pode também ser dito como aquelas que se movem vagarosamente fora de foco ao comparar as diferentes imagens adquiridas com imagens das camadas vizinhas. Pode ser observado que a extensão de foco e as imagens-limite referem-se a uma distância, mas com uma distância específica no plano e foco para imagem respectiva uma distância pode, em vez disso, ser denotada como um número de imagens.

25 A modalidade da figura 10 compreende uma fonte de luz 434, um dispositivo de aquisição de amostra 410, um sistema óptico 438 (com um fator de ampliação de 10x), um diagrama 450 direcionando a luz para um dispositivo de aquisição de imagem 440. Com relação à figura 4, será descrito um método para enumeração volumétrica de glóbulos brancos. O método  
30 compreende a aquisição de uma amostra sanguínea em um dispositivo de aquisição de amostra, etapa 102. É adquirida uma amostra não-diluída de todo sangue no dispositivo de aquisição de amostra. A amostra pode ser

adquirida do sangue capilar ou sangue venoso. Uma amostra sanguínea capilar pode ser retirada para a cavidade de medição diretamente de um dedo picado de um paciente. A amostra sanguínea contata um reagente no dispositivo de aquisição de amostra iniciando uma reação. Os glóbulos vermelhos serão lisados e o agente manchador será acumulado no núcleo dos glóbulos brancos. Dentro de alguns minutos a partir da aquisição da amostra sanguínea, a amostra está pronta para ser analisada. Alternativamente, é adquirida uma amostra sanguínea e misturada com um agente de hemolização e um agente manchador antes de ser introduzida no dispositivo de aquisição de amostra. O dispositivo de aquisição de amostra é então colocado em um aparelho de análise, etapa 104. Uma análise pode ser iniciada pressionando um botão do aparelho de análise. Alternativamente, a análise é iniciada automaticamente pelo aparelho detectando a presença do dispositivo de aquisição de amostra.

15 A amostra é irradiada, etapa 106, e é adquirida uma primeira e uma segunda imagem digital, etapa 108, usando diferentes ajustes ópticos. A amostra está sendo irradiada com radiação eletromagnética de um comprimento de onda correspondente a um pico de absorção do agente manchador. Isso implica no fato de que as imagens digitais irão conter pontos pretos ou mais escuros nas posições do núcleo do glóbulo branco.

20 As imagens digitais adquiridas são transferidas para um analisador de imagem, que realiza análise da imagem das primeira e segunda imagens digitais, etapa 110. O analisador de imagem conta o número de pontos pretos na primeira imagem digital a fim de determinar uma enumeração volumétrica de todos os glóbulos brancos na amostra sanguínea. O analisador de imagem também analisa o tamanho e a forma de um determinado número de pontos pretos na segunda imagem digital a fim de classificar os glóbulos brancos e obter uma proporção de tipos diferentes de glóbulos brancos na amostra sanguínea.

30 De acordo com outra modalidade ilustrada na figura 11, a etapa de aquisição de imagem 108b envolve a aquisição de uma pluralidade de imagens digitais em diferentes camadas.

No analisador de imagem a respectiva imagem digital (de cada camada) é analisada a fim de determinar quais os glóbulos brancos estão no foco e para esses glóbulos brancos a imagem é analisada para classificar os glóbulos brancos e obter uma proporção de diferentes tipos de glóbulos brancos na amostra sanguínea.

Deve ser enfatizado que as modalidades preferidas aqui descritas não são de modo algum limitadores e que são possíveis muitas modalidades alternativas no escopo de proteção definido pelas reivindicações em anexo.

O aparelho da figura 10 pode ser uma unidade separa porque o número total de glóbulos brancos pode ser determinado ao determinar a classificação do respectivo glóbulo branco. Alternativamente, o aparelho da figura 10 pode ser usado como dispositivo de aquisição de imagem 41 na modalidade da figura 2 ou como dispositivo de aquisição de imagem 141 na modalidade da figura 3. Tal projeto está no princípio ilustrado na figura 2. Essa modalidade compreende uma fonte de luz 534, um diafragma 550, um dispositivo de aquisição de amostra 510, um separador de feixe 539, um primeiro sistema óptico 538a (com um primeiro fator de ampliação em torno de 3x) direcionando a luz para um primeiro dispositivo de aquisição de imagem 540 e um segundo sistema óptico 538b (com um segundo fator de ampliação em torno de 10x) direcionando a luz para um segundo dispositivo de aquisição de imagem 541 por via de um espelho 534. O segundo sistema óptico também compreende dispositivo para mudar o foco 542 ou pode ser móvel. Por meio disso o segundo dispositivo de aquisição 541 é capaz de adquirir uma pluralidade de imagens digitais. Em uma modalidade o primeiro dispositivo de aquisição de imagem 540 é omitido e o número total de partículas ou glóbulos brancos é determinado a partir das imagens adquiridas pelo segundo dispositivo de aquisição de imagem 541.

## REIVINDICAÇÕES

1. Aparelho de medição para enumeração de partículas em uma amostra, o aparelho compreendendo:

5 um prendedor, que está disposto para receber um dispositivo de aquisição de amostra compreendendo uma cavidade de medição que prende uma amostra,

um sistema de imagem adaptado para adquirir pelo menos uma imagem digital ampliada da amostra, e

10 um analisador de imagem, que está disposto para analisar pelo menos uma imagem digital adquirida para identificar partículas e determinar o número de partículas na amostra, em que o analisador de imagem está disposto para analisar pelo menos uma imagem digital adquirida para identificar partículas que sejam retratadas no foco e terminar tipos e número dessas partículas, os tipos sendo distinguidos pelas características físicas das  
15 partículas, em que é determinada a proporção dos tipos diferentes de partículas na amostra.

2. Aparelho de medição, de acordo com a reivindicação 1, em que o aparelho está adaptado para enumeração de glóbulos brancos em uma amostra sanguínea, a cavidade de medição está adaptada para prender  
20 uma amostra sanguínea manchada e hemolizada, e em que o analisador de imagem está disposto para analisar pelo menos uma imagem digital adquirida para identificar glóbulos brancos manchados e determinar o número de glóbulos brancos na amostra, em que o analisador de imagem está disposto para analisar pelo menos uma imagem digital adquirida para identificar gló-  
25 bulos brancos que sejam retratados no foco e determinar tipos e número desses glóbulos brancos, os tipos sendo distinguidos pelas características físicas dos glóbulos brancos, por meio do qual é determinada a proporção dos diferentes tipos de glóbulos brancos na amostra.

3. Aparelho de medição, de acordo com a reivindicação 1 ou 2,  
30 compreendendo adicionalmente uma fonte de radiação eletromagnética, que está disposta para irradiar a amostra presa na cavidade de medição do dispositivo de aquisição de amostra.

4. Aparelho de medição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, em que o sistema de imagem está disposto para adquirir uma pluralidade de imagens digitais da amostra usando diferentes ajustes ópticos, em que o analisador de imagem está disposto para analisar cada imagem digital adquirida para identificar partículas ou glóbulos brancos manchados e determinar o número de partículas ou glóbulos brancos na amostra, em que o analisador de imagem está disposto para analisar cada imagem digital adquirida para identificar partículas ou glóbulos brancos que estejam retratados no foco e determinar tipos e número dessas partículas ou glóbulos brancos, os tipos sendo distinguidos pelas características físicas das partículas ou glóbulos brancos manchados, por meio do que é determinada a proporção de tipos diferentes das partículas ou glóbulos brancos na amostra.

5. Aparelho de medição, de acordo com a reivindicação 1, em que o sistema de imagem está disposto para proporcionar informação da direção de luz na imagem adquirida, por meio da qual é possibilitado o deslocamento do foco na imagem adquirida.

6. Aparelho de medição, de acordo com a reivindicação 1, em que o sistema de imagem está disposto para adquirir uma primeira e uma segunda imagem digital da amostra usando ajustes ópticos diferentes, e em que o analisador de imagem está disposto para analisar a primeira imagem digital adquirida para determinar o número de partículas ou glóbulos brancos na amostra e o analisador de imagem está disposto para analisar a segunda imagem digital adquirida para determinar a proporção de tipos diferentes de partículas na amostra.

7. Aparelho de medição, de acordo com a reivindicação 6, em que o sistema de imagem compreende pelo menos duas partes separadas, que direcionam luz proveniente de uma amostra irradiada para uma primeira e uma segunda parte do sistema de imagem.

8. Aparelho de medição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, em que o analisador de imagem está disposto para analisar bordas de partículas ou células retratadas para avaliar se a partícula

ou célula está retratada no foco com base em uma inclinação de intensidade na borda.

5 9. Aparelho de medição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, em que o analisador de imagem está disposto para, para uma partícula ou célula específica, determinar o número das ditas imagens nas quais a dita partícula ou célula está retratada contando a partir de uma imagem na qual a partícula ou célula seja determinada como estando fora do foco em uma primeira direção, para uma imagem na qual a partícula ou célula seja determinada como estando fora de foco em uma segunda direção.

10 10. Aparelho de medição, de acordo com a reivindicação 9, em que o analisador de imagem está disposto para determinar, com base no número contado de imagens, uma característica física relacionada ao tamanho da dita partícula ou célula.

15 11. Aparelho de medição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, em que o sistema de imagem com os ajustes óticos usado para adquirir a dita pelo menos uma imagem digital é dotado de uma potência de ampliação de 1 a 50x, mais preferivelmente de 1 a 20x, e mais preferivelmente de 3 a 20x, mais preferivelmente de 5 a 20x e mais preferi-

20 velmente em torno de 10x.

12. Aparelho de medição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 11, em que o sistema de imagem está disposto para obter a dita pelo menos uma imagem digital com uma profundidade de campo na variação de 2 a 60 micrometros, mais preferivelmente na variação de 2 a

25 30 micrometros, mais preferivelmente em torno de 8 a 10 micrometros.

13. Aparelho de medição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 3 a 12, em que a fonte de radiação eletromagnética está disposta para irradiar com um comprimento de onda de luz correspondente a um pico de absorvância de um agente manchador.

30 14. Aparelho de medição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 3 a 13, em que a dita fonte de radiação eletromagnética compreende uma fonte laser.

15. Aparelho de medição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 3 a 13, em que a dita fonte de radiação eletromagnética compreende um diodo de emissão de luz.

5 16. Aparelho de medição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 4 a 15, em que o analisador de imagem está disposto para identificar áreas de alta absorvância de luz a fim de determinar o número de partículas ou glóbulos brancos na amostra.

10 17. Aparelho de medição, de acordo com a reivindicação 16, em que o analisador de imagem está disposto para identificar pontos escuros a fim de determinar o número de partículas ou glóbulos brancos na amostra.

15 18. Aparelho de medição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 4 a 17, em que o analisador de imagem está disposto para distinguir tipos diferentes de partículas ou glóbulos brancos pela análise da forma e tamanho de áreas identificadas de alta absorvância de luz em pelo menos uma imagem digital.

19. Método para enumeração de partículas na amostra, o dito método compreendendo:

adquirir uma amostra em uma cavidade de medição de um dispositivo de aquisição de amostra,

20 adquirir pelo menos uma imagem digital de uma ampliação de uma amostra irradiada na cavidade de medição,

analisar digitalmente a pelo menos uma imagem digital para identificar as partículas e determinar o número de partículas na amostra, e

25 analisar digitalmente a pelo menos uma imagem digital para identificar as partículas que estejam retratadas no foco e determinar tipos e número dessas partículas, o tipos sendo distinguidos por características físicas das partículas, por meio do qual é determinada a proporção de tipos diferentes de partículas na amostra.

30 20. Método, de acordo com a reivindicação 19, em que o método está adaptado para enumeração de glóbulos brancos em uma amostra sanguínea, o dito método compreendendo:

adquirir uma amostra sanguínea em uma cavidade de medição

de um dispositivo de aquisição de amostra, a amostra sanguínea sendo misturada com um reagente compreendendo um agente de hemolização para lisar os glóbulos vermelhos na amostra sanguínea e um agente manchador para manchar os glóbulos brancos na amostra sanguínea,

5                   adquirir pelo menos uma imagem digital de uma ampliação da amostra irradiada na cavidade de medição,

                  analisar digitalmente a pelo menos uma imagem digital para identificar glóbulos brancos pela mancha seletiva e determinar o número de glóbulos brancos na amostra e,

10                  analisar digitalmente a pelo menos uma imagem digital para identificar glóbulos brancos que sejam retratados no foco e determinar tipos e número desses glóbulos brancos, os tipos sendo distinguidos por características físicas das células manchada, por meio do qual é determinada a proporção dos diferentes tipos de glóbulos brancos na amostra sanguínea.

15                  21. Método, de acordo com a reivindicação 19, em que a amostra é misturada com um reagente na cavidade de medição.

                  22. Método, de acordo com a reivindicação 19, compreendendo adicionalmente irradiar a amostra presa na cavidade de medição do dispositivo de aquisição de amostra.

20                  23. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 19 a 22, em que uma pluralidade de imagens digitais da amostra é adquirida usando ajustes ópticos diferentes, em que cada imagem digital adquirida é analisada para identificar partículas ou glóbulos brancos manchados e determinar o número de partículas ou glóbulos brancos na amostra, em que  
25                  cada imagem digital adquirida é analisada para identificar partículas ou glóbulos brancos que sejam retratados no foco e determinar tipos e número dessas partículas ou glóbulos brancos, os tipos sendo distinguidos pelas características físicas das partículas ou glóbulos brancos manchados, por meio do qual é determinada a proporção de tipos diferentes de partículas ou  
30                  glóbulos brancos na amostra.

                  24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 19 a 23, em que a pelo menos uma imagem digital é adquirida de maneira

que seja registrada informação de direção de luz na imagem adquirida, por meio do qual é possibilitado o deslocamento do foco na imagem adquirida, e em que a análise é realizada pelo deslocamento seqüencial do foco.

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 5 19 a 24, em que a aquisição de pelo menos uma imagem digital compreende adquirir uma primeira imagem digital de uma primeira ampliação da amostra na cavidade de medição e adquirir uma segunda imagem digital de uma segunda ampliação da amostra na cavidade de medição, em que a segunda ampliação é maior do que a primeira, e em que a primeira imagem digital 10 adquirida é analisada para determinar o número de partículas ou glóbulos brancos na amostra e a segunda imagem digital adquirida é analisada para determinar a proporção de tipos diferentes de partículas ou glóbulos brancos na amostra.

26. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 15 19 a 25, compreendendo adicionalmente determinar, para uma célula específica, o número das ditas imagens nas quais a dita célula é retratada contando a partir de uma imagem na qual a partícula ou célula é determinada para estar fora de foco em uma primeira direção, para uma imagem na qual a partícula ou célula é determinada para estar fora de foco em uma segunda 20 direção.

27. Método, de acordo com a reivindicação 26, em que, com base no número de imagens contadas, é determinada uma característica física relacionada ao tamanho da dita célula.

28. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 25 19 a 27, em que a dita pelo menos uma imagem digital é adquirida usando uma potência de ampliação de 1 a 50x, mais preferivelmente de 1 a 20x, mais preferivelmente de 3 a 20x, mais preferivelmente de 5 a 20x e mais preferivelmente em torno de 10x.

29. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 30 19 a 28, em que o sistema de imagem está disposto para obter a dita pelo menos uma imagem digital com uma profundidade de campo na variação de 2 a 60 micrometros, mais preferivelmente na variação de 2 a 30 microme-

tros, mais preferivelmente em torno de 8 a 10 micrometros.

30. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 22 a 29, em que a amostra é irradiada por luz de uma comprimento de onda correspondente a um pico na absorvância do agente manchador.

5 31. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 22 a 30, em que a dita irradiação é realizada por meio de uma fonte laser.

32. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 22 a 31, em que a dita irradiação é realizada por meio de um diodo de emissão de luz.

10 33. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 19 a 32, em que a dita análise compreende identificar áreas de absorvância de luz a fim de determinar o número de partículas ou glóbulos brancos na amostra.

15 34. Método, de acordo com a reivindicação 33, em que a dita análise compreende identificar pontos escuros para determinar o número de partículas ou glóbulos brancos na amostra.

20 35. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 19 a 34, em que a dita análise compreende distinguir tipos diferentes de partículas ou glóbulos brancos pela análise da forma e tamanho de áreas identificadas de absorvância de luz alta na pelo menos uma imagem digital.

36. Produto de programa de computador, concretizado em um meio legível de computador, para análise de uma amostra, compreendendo:

25 código de computador para analisar digitalmente pelo menos uma imagem de uma amostra para determinar o número de partículas na amostra;

código de computador para analisar digitalmente a pelo menos uma imagem da amostra para identificar um ou mais tipos de partículas em uma região focada da amostra, cada tipo de partícula estando associada a uma ou mais características físicas de distinção;

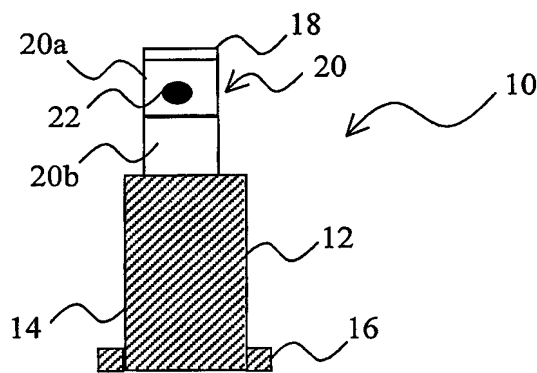
30 código de computador para transferir informação correspondente ao número e tipos de partículas na amostra.

37. Programa de computador para analisar uma amostra, o có-

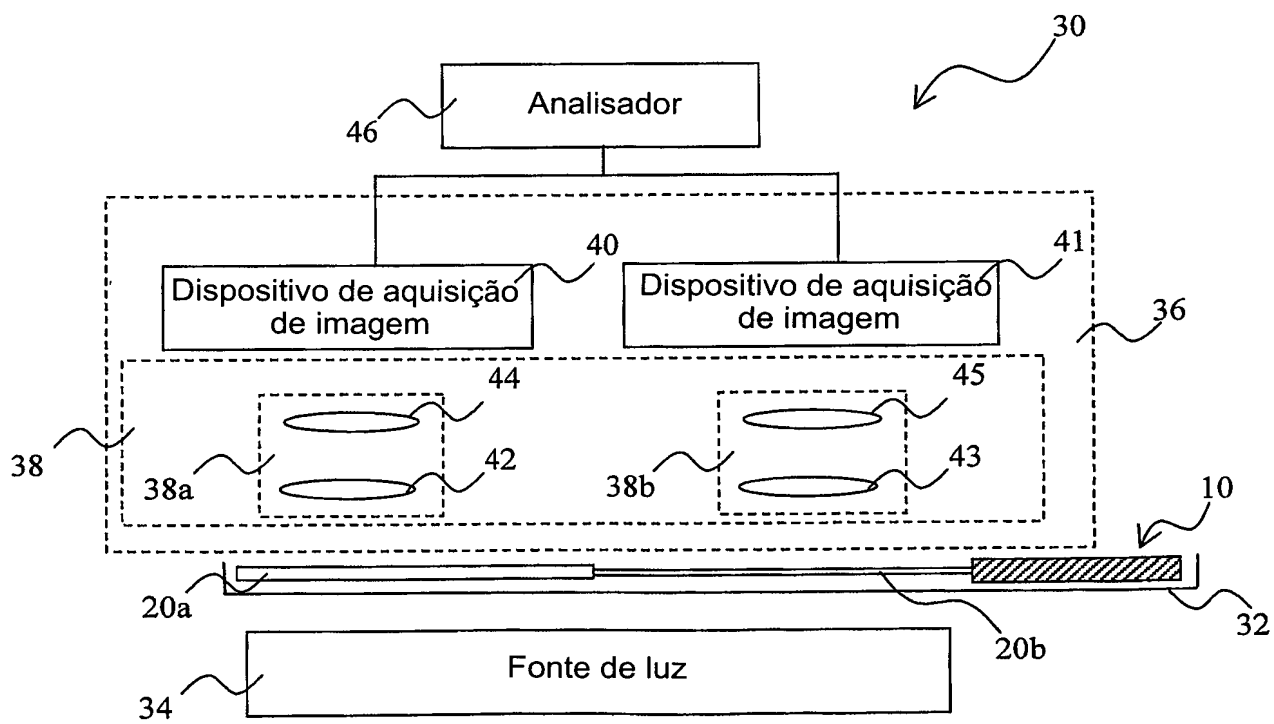
digo de computador compreendendo código de programa de computador para:

analisar pelo menos uma imagem digital para identificar as partículas e determinar o número de partículas na amostra, e

- 5 analisar a pelo menos uma imagem digital para identificar partículas que estejam retratadas no foco e determinar tipos e número dessas partículas, os tipos sendo distinguidos pelas características físicas das partículas, pelo meio do qual é determinada a proporção de tipos diferentes de partículas na amostra.



**Fig. 1**



**Fig. 2**

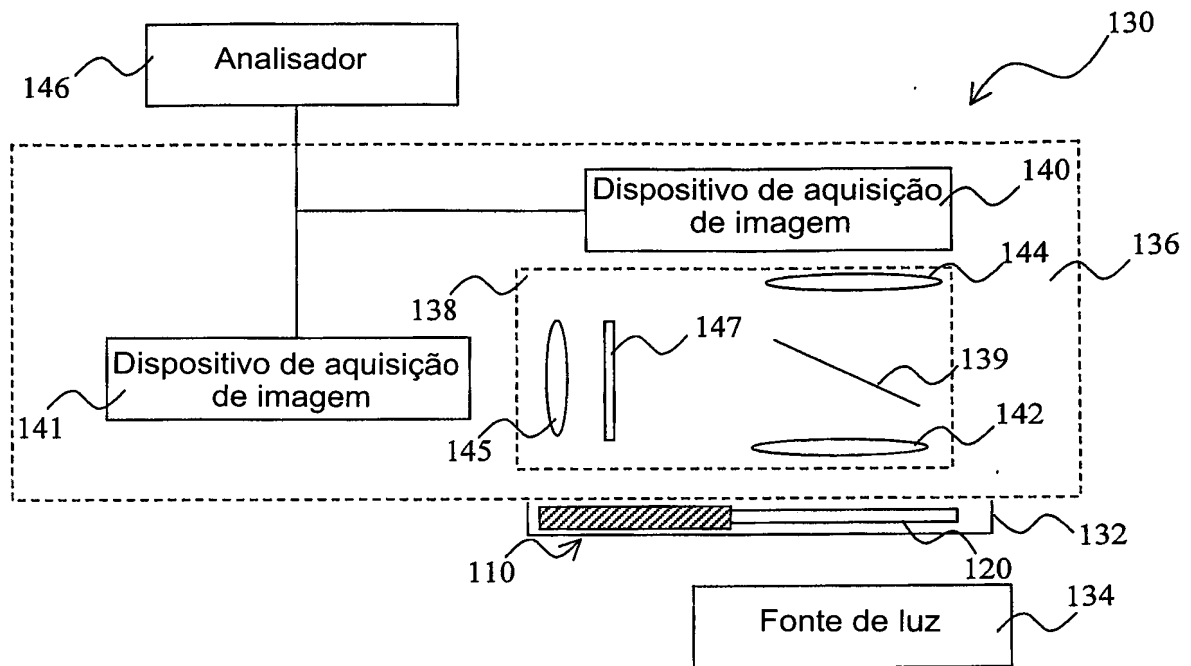


Fig. 3

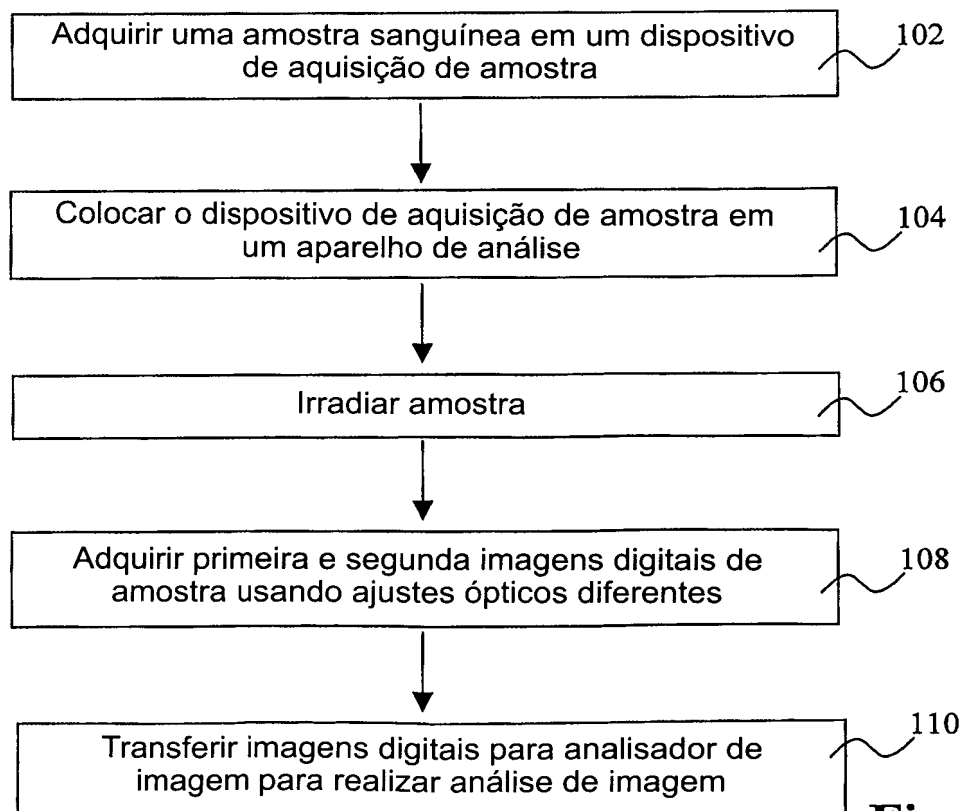
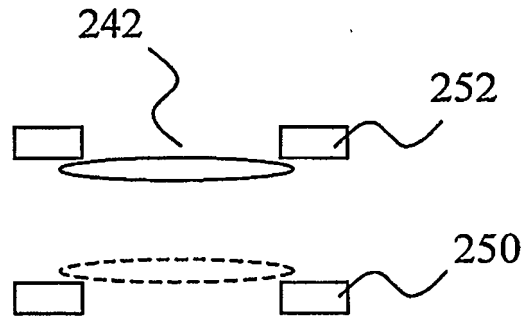
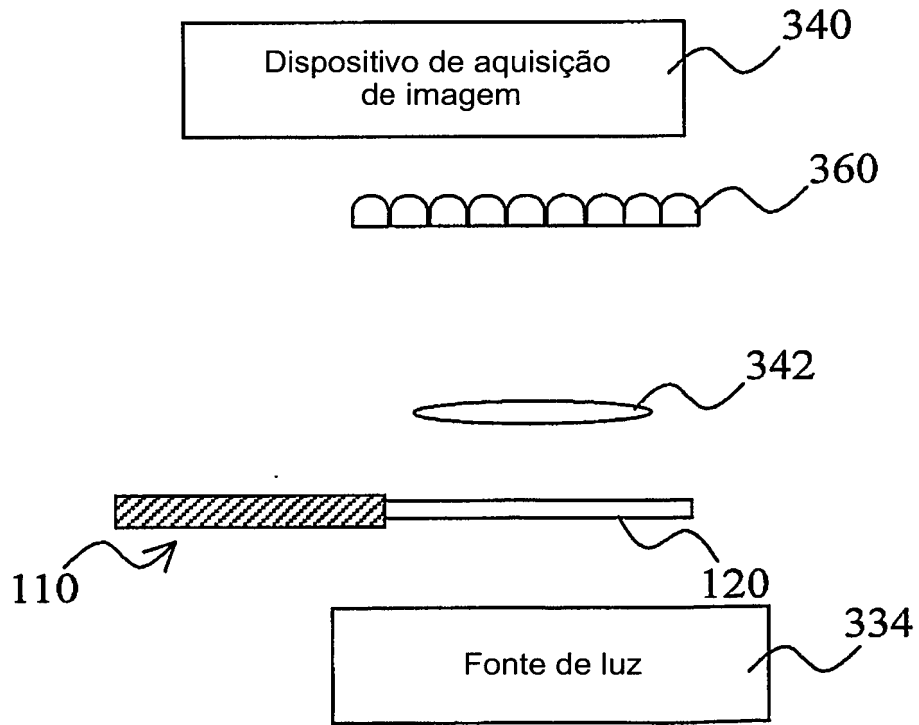


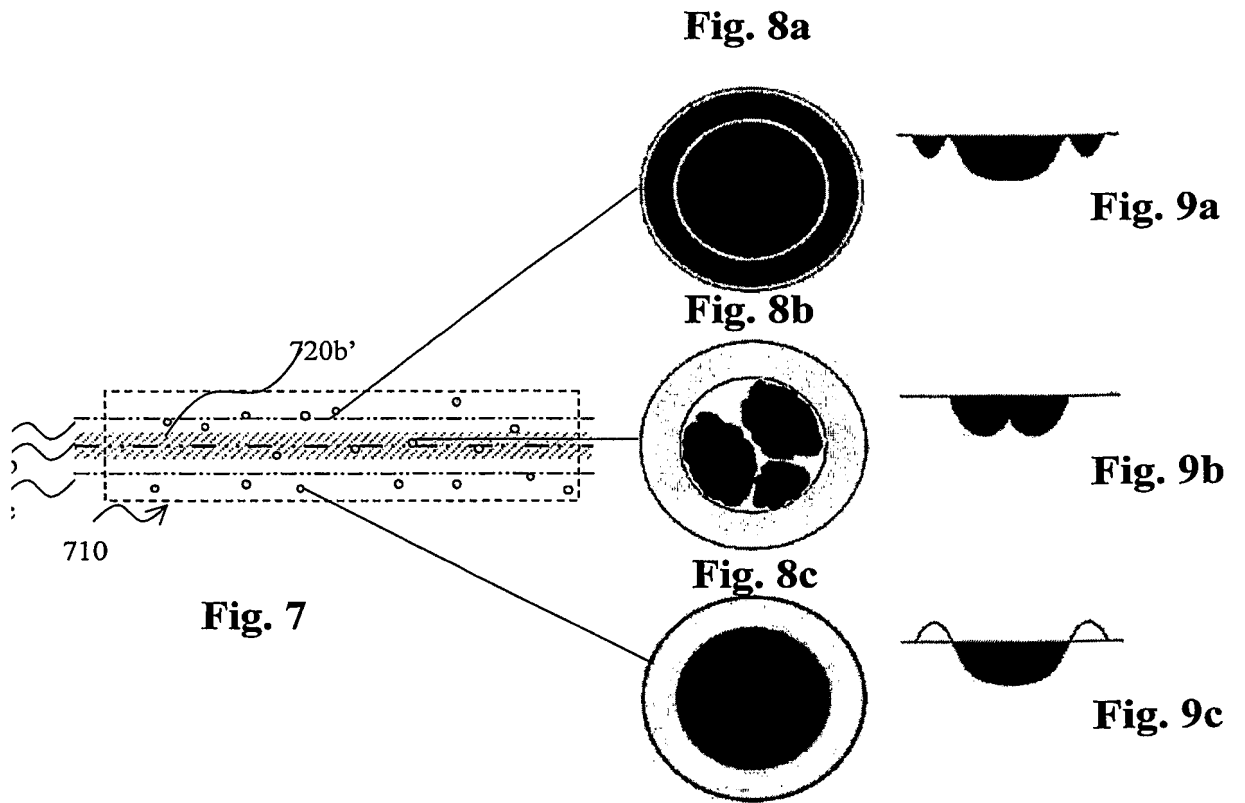
Fig. 4



**Fig. 5**



**Fig. 6**



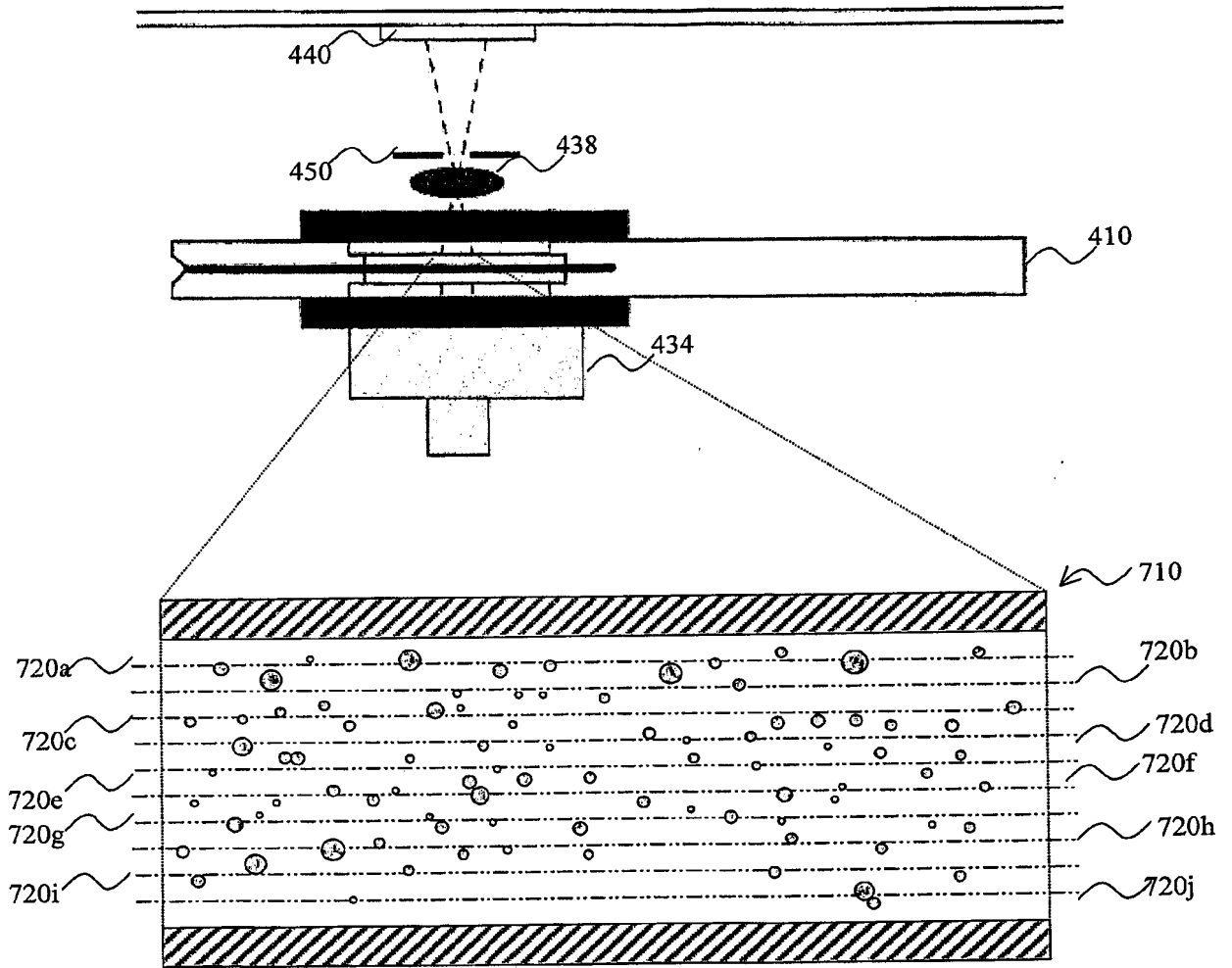
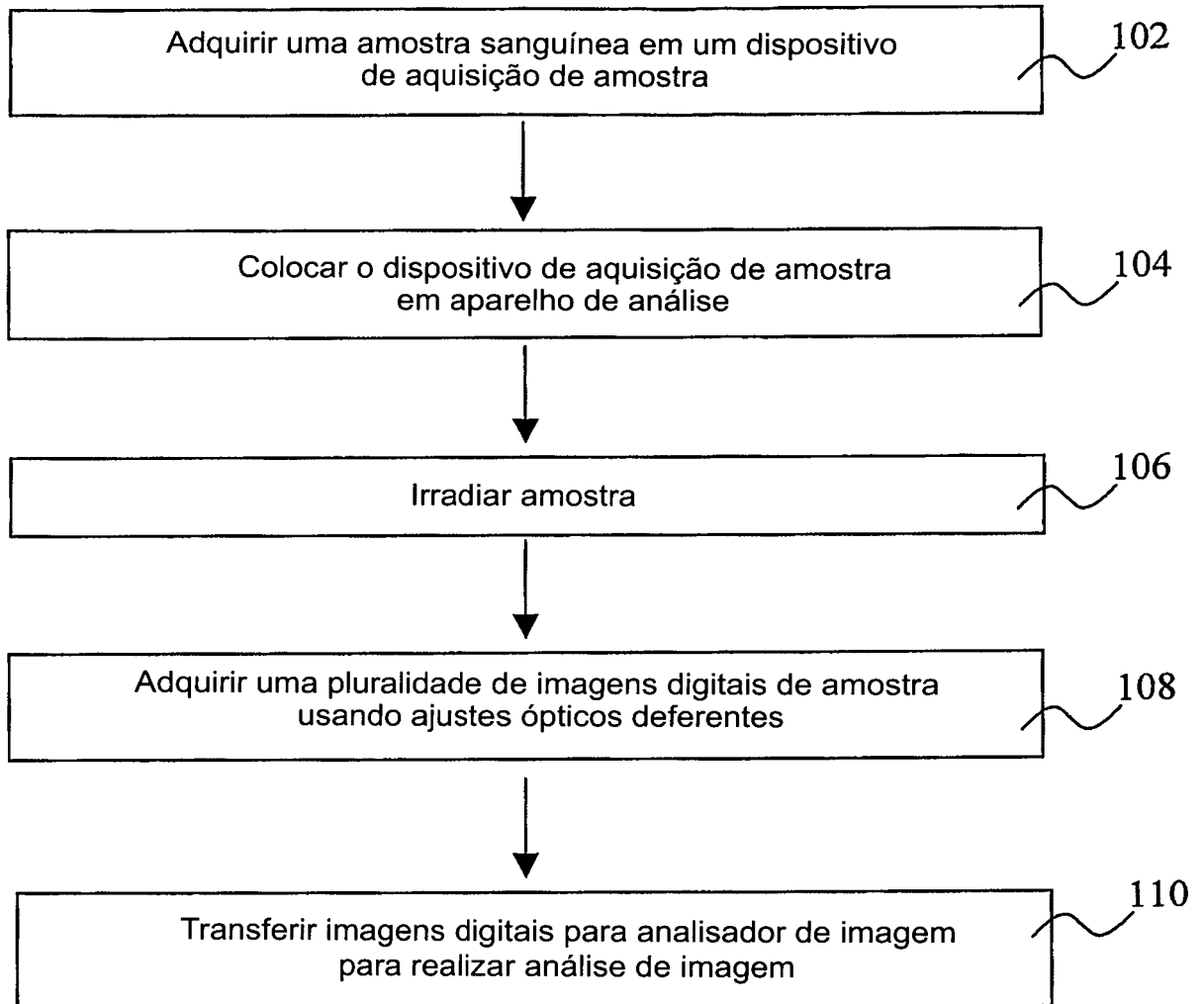
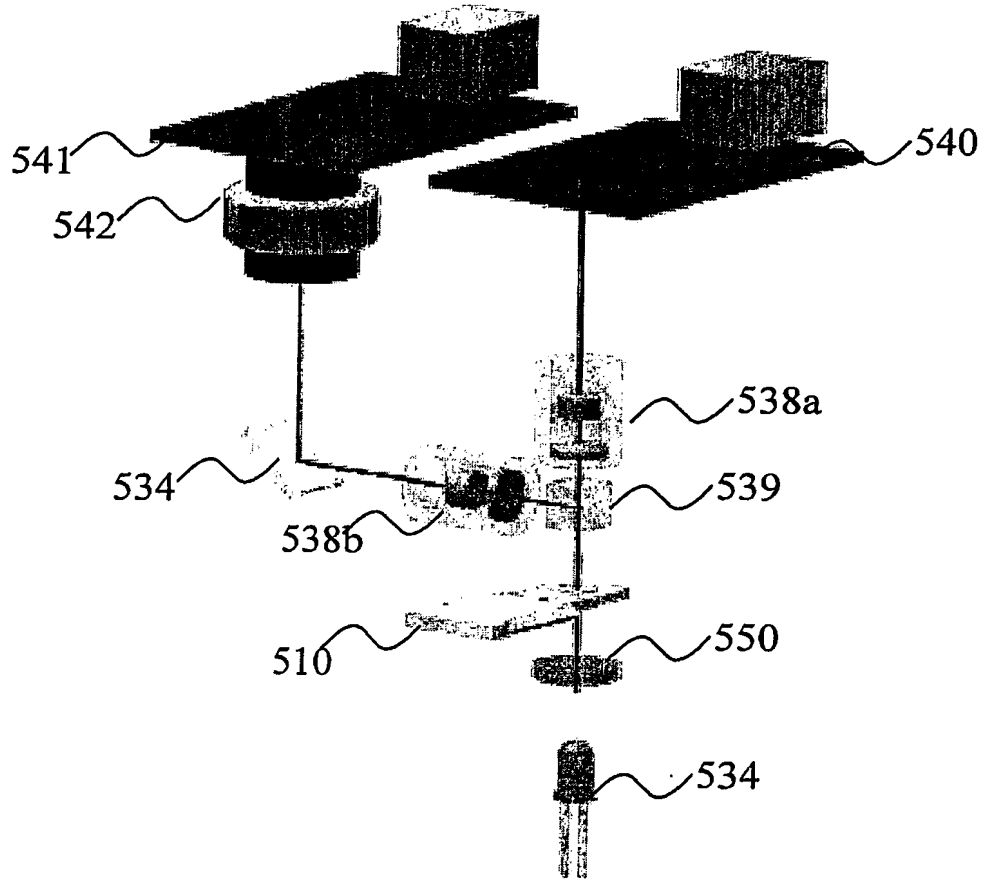


Fig. 10

**Fig. 11**

717



**Fig. 12**

## RESUMO

Patente de Invenção: **"APARELHO DE MEDIÇÃO, MÉTODO E PROGRAMA DE COMPUTADOR"**.

5 A presente invenção refere-se a um aparelho de medição para enumeração de partículas de glóbulos brancos em uma amostra compreendendo: um prendedor, que está disposto para receber um dispositivo de aquisição de amostra que prende uma amostra, um sistema de imagem, compreendendo um dispositivo de ampliação e pelo menos um dispositivo de aquisição de imagem, o dito sistema de imagem estando disposto para  
10 adquirir pelo menos uma imagem digital da amostra, e um analisador de imagem, que está disposto para analisar a imagem digital, para identificar partículas ou glóbulos brancos e determinar o número de partículas ou glóbulos brancos e que está disposto para analisar a imagem digital para identificar partículas ou glóbulos brancos que estejam retratados no foco, determi-  
15 nar os tipos dessas partículas ou glóbulos brancos, os tipos sendo distinguidos pelas características físicas e determinado a proporção de tipos diferentes de partículas ou glóbulos brancos.