

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 961 409**

(51) Int. Cl.:

**G01N 15/14** (2006.01)  
**G01N 15/00** (2006.01)  
**G06T 7/00** (2007.01)  
**G06T 7/60** (2007.01)  
**G06T 7/62** (2007.01)  
**G06V 20/69** (2012.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2012 E 21179105 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2023 EP 3904859**

---

(54) Título: **Sistema y procedimiento para determinar un volumen plaquetario para una muestra de sangre, programa informático y medio legible por ordenador**

(30) Prioridad:

15.04.2011 US 201161476170 P  
15.04.2011 US 201161476179 P  
22.07.2011 US 201161510614 P  
22.07.2011 US 201161510710 P  
23.01.2012 US 201261589672 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.03.2024**

(73) Titular/es:

**ROCHE DIAGNOSTICS HEMATOLOGY, INC.**  
(100.0%)  
9115 Hague Rd.  
Indianapolis IN 46250, US

(72) Inventor/es:

**ZAHNISER, MICHAEL y  
ZAHNISER, RUSSELL**

(74) Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 961 409 T3

---

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

**DESCRIPCIÓN**

Sistema y procedimiento para determinar un volumen plaquetario para una muestra de sangre, programa informático y medio legible por ordenador

- 5           **Campo técnico**
- La presente divulgación se refiere a la medición del volumen de plaquetas.
- 10          **Antecedentes**
- El volumen de los glóbulos sanguíneos, tal como los eritrocitos (RBC) o las plaquetas, es una métrica importante que se puede usar para determinar otras cantidades fisiológica y terapéuticamente pertinentes. Por ejemplo, la medición del volumen celular medio de los eritrocitos de un paciente se puede usar para valorar si el paciente padece anemia. La medición de los constituyentes de los glóbulos sanguíneos es otra métrica importante que se puede usar para una variedad de propósitos de diagnóstico. Por ejemplo, el contenido de hemoglobina celular medio de los eritrocitos de un paciente también se puede usar para valorar si un paciente padece anemia. Dichas cantidades pertinentes de volúmenes celulares y constituyentes, tales como hemoglobina, se pueden usar a continuación para una variedad de propósitos de diagnóstico, incluyendo identificar las afecciones presentes en un paciente y evaluar posibles cursos de acción terapéuticos.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- El documento US 2009/0238438 A1 analiza un procedimiento para la determinación de los índices de eritrocitos, incluyendo el volumen, y el contenido y la concentración de hemoglobina de los eritrocitos individuales, así como las estadísticas de la población de eritrocitos, incluyendo el número total de eritrocitos presentes en la muestra y los valores medios para cada uno de los índices mencionados anteriormente dentro de una muestra de sangre sustancialmente no diluida.
- El documento US 6.235.536 B1 analiza un procedimiento para medir componentes de un hemograma completo en una muestra inactiva sustancialmente no diluida de sangre completa anticoagulada.
- El documento US 2003/030783 A1 se refiere a un sistema de hematología basado en citometría de flujo.
- Sumario**
- La reivindicación de procedimiento independiente 1, a la que el usuario se debe referir ahora, define un procedimiento de determinación de un volumen de una plaqueta. La reivindicación independiente 9 define un sistema asociado. Los modos de realización dependientes se definen en las reivindicaciones dependientes.
- Los modos de realización de los procedimientos, sistemas y dispositivos también pueden incluir cualquiera de los otros rasgos característicos y etapas divulgados en el presente documento, como sea apropiado.
- Aunque se describen combinaciones específicas de rasgos característicos y modos de realización, cualquiera de los rasgos característicos divulgados en el presente documento se puede combinar y subcombinar con cualquiera de los otros rasgos característicos divulgados en el presente documento en los procedimientos, sistemas y dispositivos, excepto donde se excluya expresamente.
- En consecuencia, se ha de entender que los modos de realización de los procedimientos, sistemas y dispositivos divulgados en el presente documento pueden incluir cualquier combinación de los rasgos característicos descritos en relación con cualquiera de los modos de realización divulgados en el presente documento.
- A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la presente divulgación. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o pruebas, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.
- Los detalles de uno o más modos de realización se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otros rasgos característicos y ventajas serán evidentes a partir de la descripción, los dibujos y las reivindicaciones.
- Descripción de los dibujos**
- La FIG. 1A es un diagrama esquemático de un eritrocito situado sobre un sustrato.
- La FIG. 1B es una curva esquemática que muestra la intensidad de luz transmitida en función de la posición de la célula de la FIG. 1A.

La FIG. 2 es un diagrama esquemático de un sistema para medir volúmenes y constituyentes de células en una muestra biológica.

5 La FIG. 3A es un diagrama esquemático que muestra una serie de etapas para determinar métricas celulares para células en una muestra biológica.

La FIG. 3B es un diagrama esquemático que muestra una serie de etapas para seleccionar un conjunto representativo de células de una o más imágenes de una muestra biológica.

10 La FIG. 4 es una imagen esquemática de una célula que muestra el límite de la célula.

La FIG. 5 es un diagrama esquemático que muestra dos células y envolventes convexas determinadas para cada una de las células.

15 La FIG. 6 es una imagen esquemática de una célula que muestra variaciones en la densidad óptica entre los píxeles de la célula.

La FIG. 7 es una imagen esquemática de una muestra de sangre.

20 La FIG. 8 es una imagen esquemática de la muestra de sangre de la FIG. 7 después de aplicar una condición de umbral a la imagen.

Las FIGS. 9A y 9B son imágenes de una muestra de sangre.

25 La FIG. 10 es un diagrama esquemático de un sistema de procesamiento de muestras automatizado.

La FIG. 11 es un diagrama esquemático de un sistema informático para medir el volumen y los constituyentes de las células.

30 Los símbolos de referencia similares en los diversos dibujos indican elementos similares.

#### **Descripción detallada**

35 El análisis manual de muestras de sangre, que típicamente implica preparar un frotis de sangre en un portaobjetos de vidrio y a continuación evaluar el frotis bajo un microscopio, se ve afectado por una serie de desventajas que hacen que dichos procedimientos sean inadecuados para su uso en entornos de alto rendimiento. La preparación de frotis de sangre por parte de un técnico humano es propensa a errores no sistemáticos, en particular la distribución no uniforme de sangre por todo el frotis. Con frecuencia, determinadas regiones de dichos frotis son más gruesas que otras regiones, lo que dificulta el análisis cuantitativo exacto por un usuario a menos que se acepten compromisos significativos (por ejemplo, examinar solo una región pequeña del frotis global, difiriendo dicha región típicamente en tamaño y localización de un frotis a otro). Además, cuando se aplican tintes a muestras de sangre, se pueden producir variaciones en el protocolo de tinción de una muestra a otra como resultado de un error humano. Estas variaciones pueden, a su vez, provocar variaciones en las mediciones cuantitativas tomadas de las muestras que no corresponden necesariamente a variaciones subyacentes en las cantidades de constituyentes celulares en la muestra. Además, la preparación de frotis de sangre individuales por un técnico humano es un proceso que requiere mucho tiempo y puede dar como resultado el uso de grandes cantidades de soluciones preparativas (por ejemplo, tintes, soluciones de enjuague, soluciones tampón, fijadores). El consumo de dichas soluciones puede ser costoso. Además, la generación de grandes volúmenes de estas soluciones también presenta dificultades y costes relacionados con la eliminación de los volúmenes de residuos de las soluciones.

50 Los sistemas de preparación de muestras automatizados actuales pueden reducir significativamente los errores no sistemáticos asociados con los procesos de preparación manual. Sin embargo, todavía existen variaciones en las muestras preparadas que usan dichos sistemas. Por ejemplo, con una muestra de sangre preparada en un portaobjetos de microscopio, los teñidores automáticos pueden no teñir uniformemente toda la muestra; dependiendo del grosor de la muestra, el tiempo de secado de la muestra y otras variables asociadas con la preparación de la muestra y el proceso de tinción, la muestra puede presentar porciones con niveles variables de concentraciones de tinción en las células.

60 En el presente documento se divultan procedimientos y sistemas para la medición automatizada de los volúmenes de células individuales y las concentraciones de constituyentes celulares en células de muestras biológicas preparadas. Los procedimientos y sistemas se pueden usar en muestras que se preparan manualmente por un operario humano capacitado. Además, los procedimientos y sistemas se pueden usar para analizar muestras preparadas en un sistema automatizado. De esta manera, los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento permiten un análisis completamente automatizado de alto rendimiento de una variedad de muestras biológicas extraídas de pacientes.

A modo de ejemplo, la presente divulgación describe medir los volúmenes y determinar el contenido de hemoglobina de eritrocitos individuales en una muestra de sangre tomada de un paciente humano. Sin embargo, la divulgación no se limita a dichas aplicaciones. En particular, los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento se pueden usar para medir, de forma automatizada, volúmenes de una variedad de diferentes tipos de células, incluyendo plaquetas. Además, se pueden medir otros constituyentes celulares tales como proteínas distintas de hemoglobina usando los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento. Además, no es necesario que las muestras que se van a analizar sean de pacientes humanos; los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento también se pueden usar en muestras de animales o en composiciones diseñadas para imitar sangre completa para controlar, calibrar y verificar la linealidad de los resultados obtenidos de un sistema de hematología automatizado.

Los sistemas automatizados para medir volúmenes de células y constituyentes celulares a partir de muestras biológicas preparadas se describirán con más detalle a continuación. Una vez que se prepara una muestra, se transporta al sistema de medición automatizado. El sistema de medición adquiere una o más imágenes bidimensionales de las células de la muestra y usa las imágenes para determinar, entre otras cantidades, los volúmenes y el contenido de hemoglobina de las células dentro de la muestra. Los volúmenes y el contenido de hemoglobina de las células se determinan a partir de información derivada de las imágenes de las células obtenidas dirigiendo luz incidente sobre las células y, a continuación, detectando la porción de la luz incidente que se transmite a través, o bien se refleja desde, las células. Cada imagen es una imagen bidimensional, donde un valor de intensidad de píxel individual dentro de la imagen corresponde a la cantidad de luz transmitida o reflejada que emerge de una localización espacial en la célula que corresponde al píxel.

### **Consideraciones generales**

El volumen de cualquier célula, tal como un eritrocito o una plaqueta, es una cantidad tridimensional. Determinar el volumen celular en base a información derivada de una imagen bidimensional de la célula es una de las dificultades que se abordan en el presente documento. Obtener una medición del volumen celular a partir de una imagen bidimensional implica estimar la conformación de la célula en la dirección transversal al plano bidimensional de la imagen a partir de información derivada de la imagen. Si todas las células tuvieran la misma conformación, determinar el volumen sería relativamente sencillo: el volumen de cualquiera de dichas células sería proporcional al área de sección transversal de la célula (que se puede obtener a partir de una imagen bidimensional) elevada a la potencia 3/2. Sin embargo, las células no se conforman uniformemente, por lo que el supuesto anterior no es fiable en todos los casos ni lo suficientemente exacto para propósitos de diagnóstico.

Como ejemplo, los eritrocitos presentan típicamente una variedad de conformaciones: algunos son aproximadamente esféricos, mientras que otros tienen una conformación que es más cercana a la toroidal. Además, los eritrocitos tienen una hendidura central de profundidad variable. Las imágenes de dichas células representan regiones de borde donde la intensidad de luz transmitida es relativamente más pequeña, y una región central de transmisión de luz incrementada denominada "palidez central". La FIG. 1A es un diagrama esquemático que muestra un eritrocito 10 situado sobre un sustrato 20. El grosor de la célula 10 a lo largo de la dirección x varía; el grosor es mayor cerca de los bordes de la célula y se reduce en la región central 15 de la célula. La FIG. 1B es una curva esquemática de la intensidad de luz transmitida en función de la posición a lo largo de la dirección x para una posición de sección transversal particular a través de la distribución de luz transmitida desde la célula 10. La distribución de intensidad mostrada en la FIG. 1B incluye un máximo de intensidad local 25 dentro de la palidez central de la célula, y mínimos de intensidad local 27 y 28 de menor transmisión de luz que corresponde a los bordes de la célula. Incluso los eritrocitos no teñidos presentarán el fenómeno mostrado en la FIG. 1B porque estas células contienen hemoglobina, que absorbe la luz azul.

La célula 10 se prepara típicamente (como parte de una muestra) aplicando uno o más tintes a la célula para obtener la distribución de intensidad mostrada en la FIG. 1B. El tinte se une al citoplasma de la célula y sirve como marcador del citoplasma en las imágenes de células. Cuando la célula se ilumina con luz incidente, el tinte absorbe una porción de la luz incidente; la cantidad de absorción en una localización particular de la muestra depende de la cantidad de tinte presente en esa localización. Si se supone que el tinte aplicado se une de modo uniforme a todo el citoplasma, entonces la intensidad de luz transmitida en un píxel de imagen dado debe ser proporcional al grosor del citoplasma en una localización correspondiente dentro de la célula. Como tal, se podría obtener una cantidad proporcional a un volumen celular sumando las contribuciones a la intensidad de luz transmitida de todos los píxeles dentro de una imagen que corresponde a la célula particular. En la práctica, sin embargo, las muestras preparadas de glóbulos sanguíneos presentan cierta variabilidad en la medida en que los tintes aplicados se unen uniformemente a todo el citoplasma.

Sin embargo, la cantidad de luz transmitida en cada localización de píxel también depende de las cantidades de diversos constituyentes de la muestra, tal como la hemoglobina en los eritrocitos, presentes en cada localización en una célula. Además, la distribución del tinte de una localización espacial a la siguiente también afecta a la cantidad de luz transmitida medida en cada localización de píxel para una célula o constituyente sanguíneo dado.

En vista de estas consideraciones, los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento están

- adaptados para determinar el volumen celular en base a información derivada de imágenes de células bidimensionales desacoplando la estimación del grosor celular de los efectos de absorción de concentraciones de constituyentes celulares que varían localmente (por ejemplo, hemoglobina) y diversos tintes aplicados. Para implementar dicho desacoplamiento, las intensidades de píxel se escalan de acuerdo con la intensidad de píxel máxima para cada célula. Como se describe además a continuación, los cálculos del volumen celular se basan en una combinación ponderada de valores de densidad óptica para cada color de iluminación usado para adquirir imágenes de células y el área celular. Los procesos descritos en el presente documento se pueden repetir para cada miembro de un conjunto de células seleccionadas para la medición del volumen, y los resultados para cada célula se pueden usar para calcular un volumen celular medio para la muestra.
- Las concentraciones de constituyentes celulares, tal como el contenido de hemoglobina de los eritrocitos, también se pueden determinar a partir de cálculos basados en valores de densidad óptica para cada color de iluminación usado para adquirir imágenes de células, como se describirá además a continuación, y la siguiente divulgación también engloba procedimientos y sistemas para la medición automatizada de uno o más constituyentes de las células a partir de muestras biológicas preparadas. A modo de ejemplo, la presente divulgación se centra en la medición de hemoglobina en eritrocitos en una muestra de sangre tomada de un paciente humano. Sin embargo, se ha de entender que la divulgación no se limita a dichas aplicaciones. En particular, los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento se pueden usar para medir, de forma automatizada, una variedad de diferentes constituyentes en una variedad de diferentes tipos de células. Además, no es necesario tomar muestras de células de pacientes humanos; los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento también se pueden usar en muestras tomadas de animales o en composiciones fabricadas para imitar sangre completa, que se usan típicamente para verificar el rendimiento de un sistema de medición automatizado.
- Los sistemas de medición automatizados convencionales, tales como los citómetros de flujo, determinan típicamente el contenido de hemoglobina celular lisando eritrocitos y midiendo la absorbancia de la muestra lisada en solución, o midiendo la luz dispersa de los eritrocitos individuales en una corriente de flujo. Los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento se pueden implementar sin lisar ningún componente de la muestra de sangre o una cubeta de lectura. Más bien, los constituyentes celulares tales como la hemoglobina se pueden medir a partir de imágenes bidimensionales de una muestra depositada en un portaobjetos de microscopio, que conserva la morfología natural de las células para otras mediciones y clasificación.
- El proceso de preparación de muestra para utilizar los procedimientos y sistemas automatizados descritos en el presente documento típicamente implica aplicar múltiples tintes a la muestra. Los tintes aplicados se unen de forma diferente a diferentes entidades químicas y/o estructurales dentro de la muestra, lo que permite el análisis selectivo de diferentes rasgos característicos de la muestra (por ejemplo, determinados tintes se unen preferencialmente a los núcleos de los glóbulos sanguíneos, mientras que otros se unen a las membranas celulares y todavía otros se pueden unir preferencialmente a determinados constituyentes dentro del citoplasma). A su vez, los tintes aplicados posibilitan que los sistemas automatizados realicen varias mediciones en la muestra, tales como identificar y contar eritrocitos, leucocitos y plaquetas, y realizar un diferencial de leucocitos de cinco partes. Sin embargo, con múltiples tintes presentes en las muestras, las mediciones espectroscópicas realizadas en las muestras se pueden ver afectados posiblemente por los efectos interferentes producidos por los diversos tintes. Por ejemplo, a una longitud de onda de medición dada, múltiples tintes pueden ser absorbentes significativos de luz incidente. Los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento tienen en cuenta la presencia de múltiples factores contribuyentes espectrales (por ejemplo, absorción de tintes y/o constituyentes celulares) dentro de una muestra y determinan las cantidades de uno o más factores contribuyentes presentes en las células en base a información medida en múltiples longitudes de onda.
- La cantidad de hemoglobina en los eritrocitos es una cantidad de interés, ya que el contenido de hemoglobina celular se puede usar para calcular una variedad de cantidades relacionadas con la sangre para una muestra (por ejemplo, concentración de hemoglobina celular media, hematocrito) que se usan por los médicos para propósitos de diagnóstico. La hemoglobina absorbe luz incidente con más fuerza dentro de determinadas regiones del espectro electromagnético que en otras y, por lo tanto, tiene una firma espectral característica. Cuando se aplican uno o más tintes a una muestra, el/los tinte(s) también tiene(n) firmas espectrales características y absorbe(n) luz incidente con más fuerza a determinadas longitudes de onda que a otras. En muchas aplicaciones, tanto un analito de interés tal como la hemoglobina como uno o más tintes aplicados pueden tener una absorción no despreciable a longitudes de onda particulares. En dichas aplicaciones, la cantidad de luz incidente transmitida a través de la muestra a una longitud de onda particular está relacionada con la cantidad de absorción por la hemoglobina, por los otros tintes aplicados a la muestra y por los otros constituyentes de la muestra.
- Para los propósitos de la siguiente divulgación y determinados ejemplos, se supone que se aplican al menos dos tintes a las muestras: eosina y azur. Sin embargo, los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento no se limitan a la aplicación de solo dos tintes o únicamente a eosina y azur. Por el contrario, los procedimientos y sistemas pueden realizar mediciones en muestras en las que se han aplicado menos tintes (por ejemplo, un tinte o ningún tinte) o más tintes (por ejemplo, un tinte rojo que comprende eosina y un tinte azul que comprende azur y azul de metileno, tres o más tintes, cuatro o más tintes, cinco o más tintes).

### Sistemas de medición automatizados

La FIG. 2 muestra un diagrama esquemático de un sistema 100 (que puede ser parte de un sistema mayor de procesamiento y análisis de muestras) para realizar mediciones automatizadas de volúmenes celulares y constituyentes de células de una muestra biológica. El sistema 100 incluye una fuente de iluminación 102, un detector 106 y un sistema de control electrónico 108. El sistema de control electrónico 108 puede incluir una pantalla 110, una unidad de interfaz humana 112 y un procesador electrónico 114. El sistema de control electrónico 108 está conectado a la fuente de iluminación 102 y al detector 106 por medio de líneas de control 120 y 122, respectivamente.

Suponiendo que se ha preparado una muestra (como se analizará además a continuación) para su análisis, la muestra preparada 104 (por ejemplo, una muestra de sangre depositada en un portaobjetos de microscopio y posteriormente fijada, teñida y enjuagada) se sitúa automáticamente cerca de la fuente 102. La fuente 102 dirige la luz incidente 116 hacia la muestra 104. Una porción de la luz incidente pasa a través de la muestra 104 como luz transmitida 118 y se detecta por el detector 106. La luz transmitida 118 forma una imagen de la muestra 104 sobre la superficie activa del detector 106; el detector capta la imagen y, a continuación, transmite la información de la imagen al sistema de control electrónico 108. En general, el sistema de control electrónico 108 dirige la fuente 102 para que produzca luz incidente 116 y también dirige el detector 106 para que detecte la imagen de la muestra 104. El sistema de control 108 puede indicar a la fuente 102 que use diferentes longitudes de onda de iluminación cuando el detector 106 adquiera imágenes de la muestra 104 a partir de la luz transmitida 118.

El proceso analizado anteriormente se puede repetir en múltiples imágenes de la muestra 104, si se desea. Antes de adquirir una nueva imagen, el sistema de control electrónico 108 puede cambiar la longitud de onda de la luz incidente 116 producida por la fuente 102. Como tal, las imágenes de la muestra 104 corresponden cada una a diferentes longitudes de onda de la luz incidente 116 y, por lo tanto, a diferentes longitudes de onda de la luz transmitida 118. El proceso se repite hasta que se ha adquirido al menos suficiente información para realizar una determinación exacta del volumen de las células en la muestra o la cantidad de uno o más constituyentes en la muestra. Típicamente, la cantidad de información que proporciona una determinación exacta del volumen de las células en la muestra o la cantidad de uno o más constituyentes en la muestra se determina durante un proceso de calibración. Por ejemplo, el proceso de calibración se puede usar para determinar (como se describe además a continuación) que se puede lograr una determinación exacta del volumen de las células en la muestra y/o la cantidad de uno o más constituyentes en la muestra cuando el número de imágenes de la muestra obtenido es igual o superior al número de factores contribuyentes espectrales (por ejemplo, absorbentes) factorizados en el análisis de la muestra.

Como ejemplo, para una muestra preparada que comprende eritrocitos que incluyen hemoglobina como un absorbente presente de forma natural, y eosina y azur como tintes aplicados (para un total de tres factores contribuyentes espectrales), el sistema 100 puede continuar adquiriendo imágenes de la muestra hasta que ha obtenido imágenes a un mínimo de tres longitudes de onda diferentes. También se pueden obtener imágenes adicionales, correspondientes a otras longitudes de onda diferentes, y usar en la determinación de los constituyentes celulares y los volúmenes celulares de la muestra.

La fuente de iluminación 102 puede incluir una fuente o una pluralidad de fuentes iguales o diferentes para dirigir luz incidente a una muestra. En algunos modos de realización, la fuente 102 puede incluir múltiples elementos emisores de luz tales como diodos (LED), diodos láser, lámparas fluorescentes, lámparas incandescentes y/o lámparas de destellos. Por ejemplo, la fuente 102 puede incluir cuatro LED que tienen longitudes de onda de salida en las regiones roja, amarilla, verde y azul del espectro electromagnético, respectivamente (por ejemplo, 635, 598, 525 y 415 nm), o más en general, aproximadamente de 620 a 750 nm (rojo), aproximadamente de 575 a 600 nm (amarillo), aproximadamente de 525 a 570 nm (verde) y aproximadamente de 400 a 475 nm (azul). En determinados modos de realización, la fuente 102 puede incluir una o más fuentes láser. En lugar de tener múltiples emisores de luz, en otros modos de realización, la fuente 102 puede incluir un único emisor de banda ancha que se puede configurar para alterar su longitud de onda de salida (por ejemplo, bajo el control del sistema de control electrónico 108). Por ejemplo, la fuente 102 puede incluir una fuente de banda ancha (por ejemplo, una lámpara incandescente) acoplada a un sistema de filtro configurable (por ejemplo, una pluralidad de filtros ajustables mecánicamente y/o un filtro ajustable electrónicamente basado en cristal líquido) que produce un espectro de salida variable bajo el control del sistema 108. En general, la fuente 102 no emite luz de iluminación 116 en una única longitud de onda, sino en una banda de longitudes de onda centrada alrededor de una longitud de onda central (por ejemplo, la longitud de onda de máxima intensidad en la banda). Cuando el análisis en el presente documento se refiere a la longitud de onda de luz de iluminación 116, esta referencia es a la longitud de onda central de la banda de iluminación.

El detector 106 puede incluir una variedad de diferentes tipos de detectores. En algunos modos de realización, el detector 106 incluye un dispositivo de acoplamiento de carga (CCD). En determinados modos de realización, el detector 106 puede incluir fotodiodos (por ejemplo, una matriz de fotodiodos bidimensional). En algunos modos de realización, el detector 106 puede incluir otros elementos sensibles a la luz tales como sensores basados en CMOS y/o fotomultiplicadores. El detector 106 también puede incluir uno o más elementos de filtrado, como se describe

anteriormente en relación con la fuente 102. En algunos modos de realización, se obtienen imágenes de la muestra correspondientes a diferentes longitudes de onda iluminando la muestra 104 con la luz de iluminación 116 que tiene una distribución relativamente amplia de longitudes de onda y, a continuación, filtrando la luz transmitida 118 para seleccionar solo una porción de la luz transmitida correspondiente a una pequeña banda de las longitudes de onda. El filtrado se puede realizar en cualquiera o ambos del lado de excitación (por ejemplo, en la fuente 102) y el lado de detección (por ejemplo, en el detector 106) para garantizar que las imágenes obtenidas usando el detector 106 corresponden cada una a una distribución específica de longitudes de onda de luz con una longitud de onda central particular.

## 10 Metodología general

Los sistemas y procedimientos divulgados en el presente documento adquieren imágenes de células en una muestra (por ejemplo, una muestra de sangre) y determinan cantidades tales como el volumen celular y las cantidades de constituyentes celulares en base a las imágenes. La FIG. 3A muestra un diagrama de flujo 300 que incluye diversas etapas para determinar estas cantidades. En una primera etapa 302, se selecciona un conjunto de células representativas. Las imágenes de las células en el conjunto representativo son las que se usan para la determinación posterior de las cantidades celulares para la muestra. En la siguiente etapa 304, se determinan diversos rasgos característicos de imagen en base a las imágenes de las células en el conjunto representativo. Como se analizará a continuación, los rasgos característicos de imagen pueden incluir valores de intensidad que se miden directamente por un detector y otros valores que se calculan a partir de los datos de imagen. En la etapa 306, se calculan métricas celulares tales como el volumen celular y la cantidad de constituyentes celulares (por ejemplo, hemoglobina) en base a los rasgos característicos de imagen determinados en la etapa 304. El proceso termina en la etapa 308. Cada una de las etapas del diagrama de flujo 300 se describe con mayor detalle a continuación.

### 25 (i) Selección de un conjunto de células representativas

Antes de calcular las métricas celulares, los sistemas y procedimientos divulgados en el presente documento identifican un conjunto de células representativas para un análisis adicional de una pluralidad de células en una muestra biológica preparada. Por ejemplo, y como se describe además a continuación para muestras de sangre, dichos sistemas y procedimientos usan mediciones de densidad óptica obtenidas a partir de imágenes de la muestra para identificar un conjunto representativo de eritrocitos adecuados para el análisis del volumen y los constituyentes. Este proceso típicamente implica diferenciar y excluir otros tipos de células, tales como leucocitos y plaquetas, eritrocitos superpuestos o deformados, y artefactos y restos no celulares de un análisis adicional.

35 Utilizando imágenes adquiridas por medio del detector 106, los valores de intensidad para cada píxel en una imagen de la muestra se pueden correlacionar con un valor de densidad óptica usado en la selección de un conjunto representativo de células y el posterior análisis del volumen celular y los constituyentes. La intensidad de luz transmitida  $T(x,y)$  en un píxel de imagen dado  $(x,y)$  está relacionada con el coeficiente de absorción  $\alpha$  y la longitud de la trayectoria  $\epsilon(x,y)$  de la luz incidente a través de la porción de la muestra correspondiente a ese píxel:

$$T(x,y) = 10^{-\alpha \cdot \epsilon(x,y)} \quad (1)$$

45 Para cada píxel en una imagen, la proporción de la intensidad de píxel con respecto a la máxima intensidad de píxel posible (por ejemplo, intensidad de píxel/255 a una resolución de 8 bits) representa la fracción de luz transmitida en la localización espacial del píxel. La fracción de luz transmitida se puede expresar en unidades de densidad óptica ( $DO$ ) tomando el logaritmo de la ecuación (1):

$$DO(x,y) = -\log(T) = \alpha \cdot \epsilon(x,y) \quad (2)$$

50 Este proceso se puede repetir para cada píxel en la imagen de la muestra. De esta manera, la densidad óptica en cada píxel de cada imagen corresponde a la cantidad total (por ejemplo, el producto del coeficiente de absorción y el grosor) de material absorbente en la muestra en la localización correspondiente al píxel.

55 La FIG. 3B muestra un diagrama de flujo 320 que incluye una serie de etapas para seleccionar un conjunto de eritrocitos representativos en una muestra de sangre preparada. Después de que se adquieran imágenes de la muestra, el sistema de control electrónico 108 y, en particular, el procesador electrónico 114, procesa la información de la imagen para diferenciar las células para su inclusión en el conjunto de eritrocitos representativos de los otros tipos de células, agrupaciones de células y artefactos presentes en la muestra.

60 En primer lugar, en la etapa 322 de la FIG. 3, el sistema 100 localiza los eritrocitos en una o más imágenes de la muestra para su procesamiento adicional. Los eritrocitos típicamente absorben la luz azul (por ejemplo, 415 nm) debido a la presencia de hemoglobina en las células. Sin embargo, los leucocitos no contienen hemoglobina y, por lo tanto, no absorben la luz azul del mismo modo que los eritrocitos. Se puede usar una imagen de la muestra adquirida bajo luz azul para identificar los eritrocitos; los leucocitos en dichas imágenes aparecen débilmente y distorsionados porque estas células absorben mínimamente la luz azul, reduciendo de este modo las

contribuciones a la imagen y, típicamente, haciéndolas no identificables.

En algunos modos de realización, se puede usar una etapa de establecimiento de umbrales para garantizar que el sistema 100 identifique solo los eritrocitos para un análisis adicional. Por ejemplo, el sistema 100 puede utilizar solo píxeles de imagen por debajo de un valor de intensidad (o gris) de 160 (para imágenes captadas con una resolución de 8 bits). Se pueden usar otros umbrales de valor de intensidad que varían de 100 a 180 para identificar los eritrocitos de la imagen, mientras que se excluyen los leucocitos de un análisis adicional.

Seguidamente, en la etapa 324, el sistema 100 identifica un conjunto de píxeles para cada eritrocito en la imagen de la muestra. Se puede usar una variedad de procedimientos diferentes para identificar conjuntos de píxeles asociados a las células. Por ejemplo, en algunos modos de realización, el sistema 100 realiza la etapa de identificación usando un proceso de etiquetado de componentes conectados. Este procedimiento correlaciona píxeles individuales de la imagen de la muestra con un objeto en la imagen. Por ejemplo, dos píxeles cualesquiera en la imagen que no estén separados por un píxel asignado al fondo se asignan a la misma célula.

Además, el sistema 100 puede excluir píxeles situados dentro de una región de borde de una célula de determinadas mediciones relacionadas con el análisis del volumen celular y los constituyentes. En particular, los eritrocitos tienen a menudo bordes gruesos y oscuros debido al modo en que estas células refractan la luz de iluminación, por ejemplo, como se muestra en la FIG. 9. Las densidades ópticas de estos píxeles no son típicamente fiables debido a esta refracción. Después de completar el proceso de etiquetado de componentes conectados, el sistema 100 puede aplicar una máscara de erosión de píxel a las células identificadas para retirar las  $n$  capas de píxeles más externas (por ejemplo, el/los píxel(es) que corresponde(n) a la región límitrofe donde la refracción es máxima). En general, la máscara de erosión de píxel se puede seleccionar para retirar cualquier número  $n$  de capas de píxeles (por ejemplo, una capa de píxeles o más, dos capas de píxeles o más, tres capas de píxeles o más, cuatro capas de píxeles o más, cinco capas de píxeles o más, seis capas de píxeles o más, ocho capas de píxeles o más, diez capas de píxeles o más) dependiendo de la ampliación de la imagen. Se ha determinado experimentalmente que una máscara de erosión de píxel que comprende los 0,5  $\mu\text{m}$  más externos para el perímetro de eritrocito es, en general, adecuada para reducir significativamente las contribuciones erróneas a la medición del volumen celular y del contenido de hemoglobina de los eritrocitos, donde cada píxel corresponde a una porción de la célula que es 0,148  $\mu\text{m} \times 0,148 \mu\text{m}$ . Utilizando los conjuntos de píxeles corregidos por máscaras de erosión, se pueden medir diversos rasgos característicos de las células, tales como una densidad óptica media y máxima para cada célula, que contribuyen al análisis del volumen celular y los constituyentes.

En la etapa 326, el sistema 100 continúa el proceso de identificación de un conjunto de eritrocitos representativos a partir de la(s) imagen/ágenes de la muestra confirmando que el conjunto contiene solo eritrocitos completos y conformados y dimensionados normalmente. En general, la etapa 326 sirve para descartar células parciales, células superpuestas, agrupaciones de células, plaquetas y artefactos no celulares de la inclusión en el conjunto de eritrocitos representativos. Por ejemplo, las células que están cortadas por, o bien tocando, el borde del marco de la imagen se pueden excluir de un análisis adicional, evitando de este modo mediciones inexactas. Además, se pueden excluir del análisis las células deformadas, que pueden presentar variaciones en el volumen celular determinado que están relacionadas con sus conformaciones no estándar. Además, se pueden excluir del conjunto de células representativas los resultados de medición obtenidos de células superpuestas, que pueden ser poco fiables cuando se usan para calcular volúmenes celulares o contenido de constituyentes. Por estos motivos, las conformaciones de cada una de las células identificadas se comprueban en la etapa 326, y las células deformadas y/o superpuestas se excluyen de un análisis adicional.

Se puede usar una variedad de procedimientos diferentes para comprobar la conformación de las células identificadas. Por ejemplo, en algunos modos de realización, la conformación de cada célula se puede comprobar comparando el perímetro y el área de la célula. La FIG. 4 muestra un diagrama esquemático de una comparación de este tipo. En la FIG. 4 se ha identificado una célula 400 como un conjunto de píxeles de una imagen de la muestra. Los píxeles correspondientes al límite de la célula 400 están sombreados más claros en la FIG. 4 que los píxeles interiores para propósitos de demostración; no aparecen necesariamente de esta manera en la imagen real. El área de la célula 400 se puede determinar contando el número de píxeles en el conjunto.

El perímetro celular se determina a partir de los píxeles límitrofes usando el conjunto de píxeles correspondiente a la célula 400. Esto se puede lograr conectando una línea a través del centro de cada píxel de perímetro para crear un polígono en la imagen y midiendo el perímetro del polígono. La proporción del cuadrado del valor del perímetro celular con respecto al valor del área celular (es decir, el área del polígono) se determina para comprobar la conformación de la célula. El valor de esta proporción es  $4\pi$  para una célula ideal, perfectamente circular. El valor de la proporción se incrementa a medida que la conformación de la célula se aparta de un contorno circular. Usando este criterio, las células con una proporción del cuadrado del perímetro con respecto al área que supera el valor mínimo de  $4\pi$  en una cantidad de umbral o más se excluyen de un análisis adicional. Típicamente, la cantidad de umbral es un porcentaje del valor mínimo de  $4\pi$  (por ejemplo, un 5 % o más, un 10 % o más, un 15 % o más, un 20 % o más, un 25 % o más).

Además de excluir las células individuales deformadas de un análisis adicional, el procedimiento analizado

anteriormente también puede excluir las células superpuestas. En las imágenes de la muestra, las células superpuestas aparecen típicamente como células individuales grandes y deformadas (con variaciones en la intensidad de luz transmitida debido al grosor incrementado del material a través del que se propaga la luz incidente). Las células superpuestas se identifican en general como células individuales grandes con límites irregulares cuando se aplican algoritmos de análisis a dichas imágenes. Como tal, cuando se realiza la comparación del perímetro y el área celulares, la proporción se encuentra mucho más allá del umbral de varianza admisible con respecto al valor ideal, y se excluyen las células superpuestas.

Otro procedimiento para comprobar la conformación de las células identificadas utiliza la envolvente convexa de la representación poligonal del contorno de célula descrito anteriormente y compara el área encerrada por la envolvente convexa con el área celular determinada a partir de los píxeles de imagen. Se puede usar una alta proporción del área de envolvente convexa con respecto al área celular para identificar las células de conformación irregular y excluir dichas células de un análisis adicional. La FIG. 5 es un diagrama esquemático que incluye dos células 500A y 500B. Los perímetros de las células 500A y 500B están marcados como 502A y 502B, respectivamente, en la FIG. 5. Se dibuja una envolvente convexa 504A alrededor de la célula 500A y se dibuja una envolvente convexa 504B alrededor de la célula 500B. Como se muestra en la FIG. 5, la discrepancia entre el área de envolvente convexa y el área celular es mayor para la célula 500A que para la célula 500B. Dado el alto grado de irregularidad de la célula 500A, la célula 500A se puede excluir del conjunto de eritrocitos representativos.

En algunos modos de realización, las mediciones del área celular se pueden usar en la etapa 326 para excluir artefactos y células superpuestas del conjunto de glóbulos sanguíneos representativos. Por ejemplo, para las mediciones del volumen de eritrocitos se pueden considerar solo las células con un área que varía de 35 micrómetros cuadrados a 65 micrómetros cuadrados. Los objetos de las imágenes con un área inferior a 35 micrómetros cuadrados no son típicamente eritrocitos, sino artefactos, tales como una mota de polvo en la muestra. De forma similar, los objetos de las imágenes con un área superior a 65 micrómetros cuadrados no son típicamente eritrocitos; dicho objeto podría corresponder a una mancha de tinte o a varias células superpuestas. Si bien el ejemplo anterior describe un intervalo de área de 35 a 65 micrómetros cuadrados, se pueden usar otros intervalos para seleccionar eritrocitos para la medición (por ejemplo, de 20 micrómetros cuadrados a 80 micrómetros cuadrados), y el intervalo se puede ajustar a escala en base al tamaño celular promedio en la muestra, explicando de este modo la variabilidad entre pacientes. Se ha determinado experimentalmente que, si bien el intervalo de 35 a 65 micrómetros cuadrados puede excluir algunos eritrocitos, dicho intervalo es más eficaz para retirar artefactos de la imagen de la muestra en comparación con el intervalo de 20 a 80 micrómetros cuadrados.

Los valores de densidad óptica se pueden usar para seleccionar el conjunto de eritrocitos representativos en la muestra. Por ejemplo, si el valor de densidad óptica media de un objeto con imágenes realizadas bajo luz azul es demasiado bajo, el objeto puede ser un núcleo de leucocito en lugar de un eritrocito. Se puede usar un umbral de densidad óptica media (por ejemplo, densidad óptica media inferior o igual a 0,33) para las imágenes adquiridas usando luz azul para excluir los leucocitos del conjunto de eritrocitos representativos en la muestra (por ejemplo, es probable que una célula con una densidad óptica media inferior o igual a 0,33 sea un leucocito). Para imágenes adquiridas bajo iluminación azul o amarilla, se puede usar un valor de densidad óptica media para un objeto que supere un determinado umbral (por ejemplo, densidad óptica media superior o igual a 0,66) para identificar eritrocitos apilados, superpuestos y/o agrupados, que se pueden excluir de un análisis adicional (por ejemplo, es probable que un eritrocito con una densidad óptica media superior o igual a 0,66 esté superponiéndose a otro eritrocito).

El proceso mostrado en la FIG. 3B finaliza en la etapa 328 con la determinación final de un conjunto de células representativas para un análisis adicional.

#### (ii) Determinación de los rasgos característicos de imagen

Los sistemas y procedimientos divulgados en el presente documento usan combinaciones de rasgos característicos de imagen para calcular los valores del volumen celular y los constituyentes. Las combinaciones incluyen típicamente (pero no se limitan a) combinaciones lineales de dichos rasgos característicos de imagen que los autores de la invención han descubierto que proporcionan resultados exactos y reproducibles para una amplia variedad de muestras.

Una vez que se ha identificado un conjunto representativo de células como se describe anteriormente, algunos o todos los rasgos característicos divulgados en el presente documento se calculan para cada célula en el conjunto representativo en base a una o más imágenes de la célula obtenidas por el sistema 100. Un primer conjunto de rasgos característicos que se pueden calcular para cada célula es la densidad óptica integrada específica del color,  $DOI(c)$ , que se puede determinar como sigue:

$$DOI(c) = A \cdot DO_{media}(c) \quad (3)$$

donde  $A$  es el área de la célula y  $DO_{media}(c)$  es la densidad óptica media de píxeles en la célula cuando la célula se ilumina con luz de color  $c$ . Si se obtienen imágenes de una célula a diferentes longitudes de onda de iluminación, se

5 puede calcular un valor de  $DOI(c)$  para una célula en cada longitud de onda de iluminación. La FIG. 6 muestra una imagen esquemática, obtenida con luz de iluminación de color  $c$ , de una célula representativa 600 identificada a través del proceso descrito en relación con el diagrama de flujo 320. La imagen de la célula 600 incluye una pluralidad de píxeles. La densidad óptica media de píxeles en la célula 600,  $DO_{media}(c)$ , corresponde a la suma de las intensidades de píxel en la FIG. 6 dividido entre el número de píxeles en la imagen.

10 Un segundo conjunto de rasgos característicos que se puede calcular para cada célula en el conjunto representativo es el volumen específico del color de la célula,  $Vol(c)$ . El volumen de la célula 600 en la FIG. 6 se calcula sumando los valores de densidad óptica para cada uno de los píxeles que corresponden a la célula 600. En primer lugar, la "altura" de la célula 600 en cada píxel se puede estimar como:

$$\text{altura} = \frac{DO_{pixel}}{DO_{máx}} \quad (4)$$

15 donde  $DO_{pixel}$  es la densidad óptica asociada con el píxel dado, y  $DO_{máx}$  es la densidad óptica máxima entre todas las densidades ópticas asociadas con los píxeles de la célula. Por tanto, por ejemplo, el píxel 620 en la imagen de la célula 600 tiene una densidad óptica que es más pequeña que la densidad óptica máxima asociada con el píxel 610. La contribución del pixel 620 al volumen de la célula 600 es la proporción  $DO_{620}/DO_{máx}$ , donde  $DO_{620}$  es la densidad óptica del pixel 620 y  $DO_{máx}$  es la densidad óptica del pixel 610. A continuación, el volumen celular,  $V$ , se calcula sumando la proporción de la densidad óptica del píxel con respecto a la densidad óptica máxima para todos los píxeles en la célula 600:

$$V = \sum_{\text{pixeles}} \frac{DO_{pixel}}{DO_{máx}} = \frac{\sum_{\text{pixeles}} DO_{pixel}}{DO_{máx}} = \frac{N_{pixeles} \cdot DO_{media}}{DO_{máx}} \quad (5)$$

20 25 donde la suma de las densidades ópticas asociadas con cada uno de los píxeles en la célula 600 se reemplaza en la ecuación (5) por el producto del número de píxeles en la célula 600,  $N_{pixeles}$ , y la densidad óptica de píxel media para los píxeles en la célula 600,  $DO_{media}$ .

30 Típicamente, la densidad óptica para los píxeles cerca del borde de una célula no es un factor contribuyente válido a la medición del volumen porque la luz refractada en el borde de la célula crea un borde artificialmente oscuro alrededor de la célula. Para evitar este efecto de dichos píxeles de borde, el sistema puede erosionar la máscara en la periferia de la célula en uno o más píxeles como se describe previamente, medir la densidad óptica media y la densidad óptica máxima de la región enmascarada de la célula y, después de esto, extrapolar al borde de la célula multiplicando por el área de la máscara completa no erosionada.

35 40 Además, cuando se usan múltiples imágenes correspondientes a diferentes longitudes de onda de iluminación para obtener imágenes de una única célula, se puede realizar una determinación de cálculo de volumen celular en cada color de luz de iluminación. En consecuencia, el volumen celular específico del color se puede determinar como:

$$Vol(c) = \frac{A \cdot DO_{media}(c)}{DO_{máx}(c)} \quad (6)$$

45 donde  $A$  es el área de toda la célula, incluyendo la periferia de la célula,  $DO_{media}(c)$  es la densidad óptica media específica del color para los píxeles dentro de la región enmascarada de la célula, y  $DO_{máx}(c)$  es la densidad óptica máxima específica del color para la máscara erosionada de la célula (por ejemplo, el píxel 610 en la FIG. 6). El volumen celular específico del color calculado  $Vol(c)$  se puede escalar para expresar el volumen celular en unidades apropiadas (por ejemplo, femtolitros).

50 55 En algunos modos de realización, es útil añadir uno o más factores de corrección a la ecuación (6) para ajustar por el hecho de que parte de la oscuridad de una imagen de célula puede que no se deba realmente al contenido de hemoglobina de la célula. Además, se puede aplicar un factor de escalado para convertir la medición del volumen a una unidad de medición tal como femtolitros (fl). Para tener en cuenta estos factores de corrección y escalado, la ecuación (6) se puede reescribir como:

$$Vol(c) = \frac{S/A \cdot DO_{media}(c)}{DO_{máx}(c)+C} + B \quad (7)$$

60 donde  $S$  corresponde a un factor de escalado o pendiente,  $C$  corresponde a un factor de corrección para tener en cuenta el sesgo en la determinación de la densidad óptica máxima y  $B$  corresponde a un valor de intersección que corresponde a un valor de desviación global.

65 El factor de corrección, el factor de escalado y el valor de intersección se pueden determinar experimentalmente usando un conjunto de datos de valores de volumen conocidos para múltiples muestras de sangre procesadas, por ejemplo, en un citómetro de flujo calibrado. Un conjunto de factores de corrección ligeramente diferente proporcionará, en general, el mejor resultado para cada muestra diferente, aunque los factores de corrección se

pueden determinar en base a los resultados de un conjunto de datos completo. Por ejemplo, para un conjunto de datos que contiene valores de volumen conocidos para 1000 muestras de sangre, se puede determinar un factor de corrección que funcione mejor en promedio en el conjunto de datos completo seleccionando el factor de corrección que minimiza la suma del cuadrado de las diferencias entre los valores de volumen medidos y

- 5 esperados en el conjunto de datos completo. Se puede determinar un factor de escalado en el conjunto de datos completo seleccionando el factor de escalado que mejor convierte los valores de volumen sin procesar en una unidad de medición deseable, tal como femtolitros. El valor de intersección B se puede seleccionar para el conjunto de datos para garantizar que la ecuación (7) pase a través del origen cuando los datos se presenten en una curva bidimensional. El factor de corrección, el factor de escalado y el valor de intersección se pueden almacenar en una 10 unidad de memoria asociada con el sistema de control electrónico 108 y recuperar de la memoria cuando se determinan los volúmenes celulares específicos del color como se muestra en la ecuación (7) para el análisis de nuevas muestras.

- 15 Usando la ecuación (3) y la ecuación (6) o (7), se pueden determinar dos rasgos característicos (por ejemplo, densidad óptica integrada  $DOI(c)$  y volumen  $Vol(c)$ ) para cada color de luz de iluminación usado para obtener las imágenes de la muestra. Por ejemplo, si se usan cuatro colores diferentes de luz de iluminación, se pueden determinar un total de ocho rasgos característicos diferentes para cada célula del conjunto representativo. Además, como se explica anteriormente, el área  $A$  de cada célula individual se puede determinar a partir de una 20 imagen de la célula. Las densidades ópticas integradas y los volúmenes celulares específicos del color, y el área celular, se pueden usar a continuación para calcular métricas para cada célula.

### (iii) Cálculo de métricas celulares

- 25 Las métricas celulares tales como el volumen celular y las cantidades de constituyentes celulares se pueden calcular en base a combinaciones ponderadas de algunos o todos los rasgos característicos calculados para las células representativas divulgadas anteriormente. En general, una métrica  $M$  se puede determinar de acuerdo con:

$$M = \sum_n [\omega_{n,i} \cdot DOI(n) + \omega_{n,v} \cdot Vol(n)] + \omega_a \cdot A + K \quad (8)$$

- 30 donde  $n$  corresponde a cada uno de los colores de la luz de iluminación usada para obtener imágenes de una célula representativa, los valores de  $\omega_{n,i}$  son coeficientes de ponderación específicos del color para cada una de las densidades ópticas integradas específicas del color  $DOI(n)$ , los valores de  $\omega_{n,v}$  son coeficientes de ponderación específicos del color para cada uno de los volúmenes específicos del color  $Vol(n)$ ,  $\omega_a$  es un coeficiente de ponderación para el área celular  $A$ , y  $K$  es un valor de desviación. Por ejemplo, cuando se usan cuatro longitudes 35 de onda de iluminación diferentes para obtener imágenes de células (por ejemplo, rojo = r, amarillo = y, verde = g y azul = b), entonces el volumen de una célula,  $V$ , se puede determinar como:

$$V = \omega_{r,i} \cdot DOI(r) + \omega_{y,i} \cdot DOI(y) + \omega_{g,i} \cdot DOI(g) + \omega_{b,i} \cdot DOI(b) + \omega_{r,v} \cdot Vol(r) + \omega_{y,v} \cdot Vol(y) + \omega_{g,v} \cdot Vol(g) + \omega_{b,v} \cdot Vol(b) + \omega_a \cdot A + K \quad (9)$$

- 40 Las cantidades de constituyentes celulares se pueden determinar de forma similar. Por ejemplo, una concentración de hemoglobina en una célula,  $H$ , se puede calcular de acuerdo con:

$$H = \omega_{r,i} \cdot DOI(r) + \omega_{y,i} \cdot DOI(y) + \omega_{g,i} \cdot DOI(g) + \omega_{b,i} \cdot DOI(b) + \omega_{r,v} \cdot Vol(r) + \omega_{y,v} \cdot Vol(y) + \omega_{g,v} \cdot Vol(g) + \omega_{b,v} \cdot Vol(b) + \omega_a \cdot A + K \quad (10)$$

- 45 La diferencia entre las ecuaciones (9) y (10) anteriores está en los valores de los coeficientes de ponderación y la desviación  $K$ . Usando las ecuaciones (9) y (10), los volúmenes celulares y las cantidades de constituyentes (por ejemplo, la cantidad de hemoglobina) se pueden determinar para múltiples células en la muestra. Los resultados se pueden promediar para determinar el volumen celular medio y las concentraciones medias de constituyentes (por ejemplo, hemoglobina celular media) para la muestra. Se ha observado que la determinación de los volúmenes celulares y la cantidad de constituyentes celulares basada en combinaciones ponderadas de rasgos característicos de imagen específicos del color y el área celular mejora significativamente la exactitud de dichas mediciones, en comparación con las mediciones de volumen y constituyentes basadas en los valores de densidad óptica de un único color y el área celular.

- 50 Los coeficientes de ponderación asociados con los rasgos característicos específicos del color en la ecuación (8) se pueden determinar en base a los datos de entrenamiento disponibles, por ejemplo, determinando los coeficientes de regresión lineal que correlacionan los rasgos característicos de la muestra determinados experimentalmente con los datos de entrenamiento que comprenden valores de volumen y/o concentración de constituyentes conocidos para dichas muestras. Usar un enfoque de regresión lineal para determinar ponderaciones específicas del color puede mejorar la exactitud de las mediciones del volumen celular medio y la concentración de constituyentes media de la muestra corrigiendo factores incontrolables que tienen un impacto en la medición del volumen, tal como la variabilidad entre células en el grosor de la membrana y la absorción de tinte. 55 Después de que se han determinado los valores de ponderación específicos del color a partir de los datos de

entrenamiento, los valores de ponderación se pueden almacenar y más tarde recuperar de una unidad de almacenamiento (por ejemplo, una unidad de memoria electrónica) antes del análisis de cada muestra.

En general, se puede usar una amplia variedad de muestras diferentes para determinar los coeficientes de ponderación apropiados. Para obtener resultados altamente reproducibles, puede ser ventajoso usar datos de entrenamiento que abarquen el intervalo completo de valores de cantidades que se calculan. Además, si las muestras que se van a analizar incluyen rasgos característicos morfológicos inusuales, tal como acumulaciones de células, puede ser ventajoso usar datos de entrenamiento que incluyan muestras representativas de dichos rasgos característicos.

Como ejemplo, después de determinar un conjunto de coeficientes de ponderación a partir de un conjunto de datos de entrenamiento para la determinación del volumen celular, la ecuación (9) se puede reescribir como sigue:

$$\begin{aligned} V = & (-4,04) \cdot DOI(r) + 8,49 \cdot DOI(y) + (-3,69) \cdot DOI(g) + 4,40 \cdot DOI(b) \\ & + 4,68 \cdot Vol(r) + (-8,20) \cdot Vol(y) + 3,57 \cdot Vol(g) + 0,0159 \cdot Vol(b) \\ & + (-0,125) A + 4,84 \end{aligned} \quad (11)$$

De forma similar, después de determinar coeficientes de ponderación adecuados a partir de un conjunto de datos de entrenamiento para la determinación de la hemoglobina celular, la ecuación (10) se puede reescribir como:

$$\begin{aligned} H = & (-1,05) \cdot DOI(r) + (-2,44) \cdot DOI(y) + 1,12 \cdot DOI(g) + 2,15 \cdot DOI(b) \\ & + 1,95 \cdot Vol(r) + (-0,112) \cdot Vol(y) + (-1,27) \cdot Vol(g) + 0,457 \cdot Vol(b) \\ & + (-0,221) A + -5,73 \end{aligned} \quad (12)$$

Los sistemas y procedimientos divulgados en el presente documento se pueden usar para analizar tanto muestras de sangre completa (por ejemplo, muestras tomadas de pacientes) como composiciones de control de calidad. Los coeficientes de ponderación que se muestran en las ecuaciones (9)-(12) se pueden usar para analizar tanto muestras de sangre completa como composiciones de control de calidad. Las composiciones de control de calidad incluyen típicamente diversos tipos de glóbulos sanguíneos de mamíferos conservados y están diseñadas para imitar muestras de sangre completa cuando se procesan en un sistema de hematología automatizado.

Las composiciones de control de calidad se pueden analizar para valorar el estado de funcionamiento de un dispositivo de análisis de sangre, tal como un sistema de hematología automatizado que incorpora y ejecuta los procedimientos divulgados en el presente documento. Por ejemplo, para realizar una valoración de un dispositivo, el dispositivo se puede usar para analizar una o más composiciones de control múltiples veces. Los resultados de análisis (por ejemplo, la determinación de cantidades tales como hemoglobina celular, volumen celular, hemoglobina celular media y volumen celular medio) de análisis repetidos de las mismas composiciones de control se pueden comparar para valorar la linealidad de los resultados producidos por el dispositivo.

En algunos modos de realización, se puede usar un dispositivo para analizar composiciones de control para valorar la exactitud de los resultados producidos por el dispositivo. Por ejemplo, los resultados del análisis de las composiciones de control por el dispositivo (por ejemplo, la determinación de cantidades tales como la hemoglobina celular, el volumen celular, la hemoglobina celular media y el volumen celular medio) se pueden comparar con valores de referencia de estas cantidades para las composiciones de control para valorar la exactitud del dispositivo. Si una diferencia entre los valores determinados y de referencia para una o más de estas cantidades supera un valor de umbral, el dispositivo se puede volver a calibrar. La nueva calibración puede incluir, por ejemplo, volver a determinar los valores de algunos o todos los coeficientes de ponderación en las ecuaciones (9)-(12) a partir de muestras de sangre de referencia, como se describe en el presente documento.

En las ecuaciones (9)-(12), se usan cuatro colores de luz de iluminación (rojo, amarillo, verde y azul) para iluminar la muestra, y las densidades ópticas integradas y los volúmenes celulares se calculan a partir de imágenes que corresponden a cada uno de estos colores. Las longitudes de onda de iluminación usadas para calcular los valores de densidad óptica integrada y volúmenes específicos del color pueden ser, por ejemplo, 635 nm, 598 nm, 525 nm y 415 nm, aunque se pueden usar otros valores dentro de las regiones roja, amarilla, verde y azul del espectro electromagnético en otros modos de realización. Más en general, se pueden usar diferentes números de longitudes de onda de iluminación, y se pueden obtener imágenes correspondientes a cada una de las longitudes de onda de iluminación y usar para calcular valores específicos del color de la densidad óptica integrada y/o del volumen celular. Por ejemplo, en algunos modos de realización, se usan tres longitudes de onda de luz diferentes para iluminar una muestra. En determinados modos de realización, se pueden usar más de cuatro longitudes de onda (por ejemplo, cinco longitudes de onda, seis longitudes de onda, siete longitudes de onda, ocho longitudes de onda, diez) de luz de iluminación, y las densidades ópticas integradas, volúmenes celulares y coeficientes de ponderación específicos del color, se pueden determinar en algunas o todas las longitudes de onda de iluminación. En general, las longitudes de onda de luz de iluminación se pueden seleccionar de modo que cada imagen en cada una de las diferentes longitudes de onda incluya información diferente sobre la muestra. Por ejemplo, si la muestra incluye tres factores contribuyentes espectrales, se pueden seleccionar tres longitudes de onda de luz de iluminación para su uso de modo que cada una de las tres longitudes de onda se absorba con mayor fuerza por uno

diferente de los factores contribuyentes espectrales.

Como se analiza anteriormente, los coeficientes de ponderación específicos del color en la ecuación (8) se pueden determinar correlacionando coeficientes de regresión lineal para rasgos característicos determinados experimentalmente para un gran número (por ejemplo, 1000) de muestras de sangre con un conjunto de datos de entrenamiento que comprende valores conocidos de volumen celular y/o concentraciones de diversos constituyentes celulares para dichas muestras, obtenidos, por ejemplo, de un sistema de citometría de flujo calibrado. Con cambios en los parámetros de preparación de la muestra (por ejemplo, modificaciones en las composiciones de los tintes que afectan a la apariencia de las células teñidas u otros factores que tienen un impacto en la forma en que las células absorben el tinte, tal como el grado de secado de la muestra antes de la fijación y la tinción), el proceso de determinación de ponderaciones específicas del color y un valor de intersección para la ecuación 8 se puede repetir para garantizar la determinación de valores de medición exactos del volumen y los constituyentes celulares para un conjunto dado de parámetros de preparación de la muestra. Sin embargo, una vez que los parámetros de preparación de la muestra se han optimizado para un sistema de preparación de muestras particular, los coeficientes de ponderación derivados experimentalmente y otros valores de parámetros en la ecuación (8) generarán mediciones exactas y reproducibles del volumen celular y/o las cantidades de constituyentes celulares.

En la ecuación (8), la métrica  $M$  se calcula como una combinación lineal ponderada de las densidades ópticas integradas específicas del color, los volúmenes específicos del color y el área celular. Sin embargo, no todos estos rasgos característicos se usan para determinar valores de métricas en todos los modos de realización. Por ejemplo, en algunos modos de realización, una métrica  $M$  se puede calcular como una combinación ponderada de solo las densidades ópticas integradas específicas del color o los volúmenes específicos del color. En determinados modos de realización, una métrica  $M$  se puede calcular como una combinación ponderada del área celular y las densidades ópticas integradas específicas del color o bien los volúmenes específicos del color. En algunos modos de realización, una métrica  $M$  se puede calcular como una combinación lineal ponderada de las densidades ópticas integradas específicas del color y los volúmenes específicos del color. En general, se puede determinar una combinación adecuada de rasgos característicos usada para calcular una métrica  $M$  particular usando muestras de referencia para las que los valores de la métrica  $M$  son conocidos.

Cuando se determina la cantidad de un constituyente particular en las células de la muestra, si solo está presente un único factor contribuyente espectral en la muestra (por ejemplo, un factor contribuyente absorbente tal como la hemoglobina), entonces la cantidad total de ese factor contribuyente presente en una célula particular se puede determinar sumando las contribuciones de intensidad de cada uno de los píxeles en la imagen que corresponden a la célula seleccionada. Ya que las contribuciones de intensidad corresponden solo a la absorción por la hemoglobina, solo se necesitaría una imagen de la muestra para determinar la cantidad total de hemoglobina presente en la célula.

En la práctica, sin embargo, las muestras se preparan típicamente con uno o más tintes para ayudar a un técnico o un sistema de formación de imágenes automatizado a identificar, contar y clasificar diversos tipos de células. Con múltiples factores contribuyentes espectrales en la muestra, la absorción en cada longitud de onda de iluminación es una combinación de absorción debida a cada factor contribuyente en la muestra; la contribución total a cualquier longitud de onda para una célula particular todavía corresponde a la suma de las contribuciones en esa longitud de onda de cada uno de los píxeles que representan la célula. Por tanto, con los factores contribuyentes espectrales hemoglobina (H), eosina (E) y azur (A) presentes en la muestra, y suponiendo que tres imágenes de la muestra corresponden a luz de iluminación que tiene longitudes de onda centrales en las regiones amarilla (y), verde (g) y azul (b) del espectro electromagnético, se puede suponer que las densidades ópticas  $DO$  en cada una de estas tres longitudes de onda para una célula particular (o para todos los píxeles en la imagen que corresponden a una o más células) son una combinación lineal de la absorción debida a cada uno de los constituyentes espectrales en cada longitud de onda:

$$\begin{aligned} DO(y) &= H \cdot \alpha_{y,H} + E \cdot \alpha_{y,E} + A \cdot \alpha_{y,A} \\ DO(g) &= H \cdot \alpha_{g,H} + E \cdot \alpha_{g,E} + A \cdot \alpha_{g,A} \\ DO(b) &= H \cdot \alpha_{b,H} + E \cdot \alpha_{b,E} + A \cdot \alpha_{b,A} \end{aligned} \quad (13)$$

donde  $\alpha_{ij}$  es el coeficiente de absorción para el factor contribuyente espectral  $j$  (por ejemplo, hemoglobina H, eosina E o azur A) a la longitud de onda  $i$  (por ejemplo, amarillo y, verde g o azul b).

Cada una de las longitudes de onda centrales de la luz se puede determinar pasando un espectro de luz conocido a través de la muestra hasta el detector y midiendo la absorbancia de la muestra. Por ejemplo, el detector puede adquirir tres imágenes de la muestra usando una fuente de iluminación con espectros de iluminación estrechos en las regiones amarilla, verde y azul, respectivamente. Donde cada factor contribuyente espectral tiene un espectro de absorción que contiene un máximo local, se pueden seleccionar fuentes de iluminación de modo que los espectros de emisión correspondan o se aproximen mejor a los máximos locales del factor contribuyente espectral. Por ejemplo, la iluminación azul se puede seleccionar como la longitud de onda que corresponde al pico de

absorbancia de hemoglobina en la muestra (por ejemplo, 415 nm). La iluminación amarilla se puede correlacionar con la longitud de onda que corresponde al pico de absorbancia del tinte de azur en la muestra (por ejemplo, 598 nm). De forma similar, la longitud de onda de iluminación verde se puede seleccionar en la longitud de onda que corresponde al pico de absorbancia del tinte de eosina en la muestra (por ejemplo, 525 nm). Se pueden seleccionar longitudes de onda de iluminación adicionales para que se correlacionen con los valores de los picos de absorbancia para factores contribuyentes espectrales adicionales en la muestra.

Las cantidades de densidad óptica  $DO(y)$ ,  $DO(g)$  y  $DO(b)$  se pueden determinar a partir de la información de la imagen, y los coeficientes de absorción  $a_{ij}$  se pueden obtener de fuentes bibliográficas o determinarse experimentalmente. Por tanto, el sistema de la ecuación (13) incluye tres incógnitas, H, E y A, y se puede resolver para proporcionar las cantidades de cada uno de estos tres factores contribuyentes espectrales presentes en cada célula en particular, o colectivamente para todas las células en la muestra si los píxeles seleccionados para el análisis corresponden conjuntamente a todas las células identificadas en las imágenes.

No obstante, los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento presentan un procedimiento más sencillo y más eficaz para determinar cantidades de constituyentes celulares. Como se muestra anteriormente, la ecuación (8), con coeficientes de ponderación adecuados, se puede usar para determinar las cantidades de constituyentes de solo aquellos constituyentes de interés, incrementando la velocidad con la que se puede completar el análisis de la muestra. Además, en muestras complejas donde no es bien conocido el número de factores contribuyentes espectrales, puede ser difícil construir un sistema de ecuaciones tal como en la ecuación (13). Sin embargo, la ecuación (8) permite determinar las cantidades de constituyentes celulares específicos incluso si la presencia de otros factores contribuyentes espectrales en la célula no está bien establecida. Por tanto, si bien en algunos modos de realización, las contribuciones espectrales de hemoglobina, eosina y azur en el sistema de la ecuación (13) se pueden distinguir obteniendo imágenes en tres longitudes de onda de iluminación diferentes, usar más de tres rasgos característicos y/o más de tres longitudes de onda de iluminación como se describe en el presente documento para determinar valores de métricas celulares tales como hemoglobina celular, volumen celular, hemoglobina celular media y volumen celular medio permite la corrección para otras fuentes de error sistemáticas y no sistemáticas cuando se miden muestras de sangre.

Además de densidades ópticas integradas y volúmenes específicos del color, y el área celular, se pueden usar otros rasgos característicos de imagen para determinar volúmenes celulares y/o cantidades de constituyentes celulares. En algunos modos de realización, por ejemplo, la ecuación (8) puede incluir un término adicional que corresponde al producto del perímetro de una célula y un coeficiente de ponderación. Se puede determinar un factor de ponderación apropiado para el término del perímetro de la célula a partir de los datos de entrenamiento, como se describe anteriormente. Más en general, en la ecuación (8) se puede incluir una variedad de términos adicionales derivados de imágenes de células, con coeficientes de ponderación adecuados determinados a partir de datos de entrenamiento. Dichos términos pueden incluir rasgos característicos de imagen geométricos relacionados con la morfología de las células y/o mediciones específicas del color de la densidad óptica integrada y del volumen a más de tres o cuatro longitudes de onda de iluminación. Sin quedar vinculado a ninguna teoría, los términos adicionales pueden permitir que el ajuste, que se realiza simultáneamente en la información de la muestra de referencia para determinar los valores de todos los factores de ponderación, corrija efectos tales como anomalías en la formación de imágenes, la absorción de otros componentes de la muestra y errores de medición sistemáticos, que no se tienen en cuenta completamente por el modelo de la ecuación (8). Por ejemplo, se ha descubierto que la inclusión de términos de densidad óptica integrada y de volumen celular correspondientes a una longitud de onda de iluminación roja y un término correspondiente al área celular mejora la exactitud de la determinación de la hemoglobina celular en muchas muestras en comparación con las técnicas de medición que no usan imágenes de la muestra adquiridas a una longitud de onda de iluminación roja o mediciones del área celular.

En general, los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento se pueden usar para determinar cantidades de constituyentes naturalmente presentes en las muestras (por ejemplo, hemoglobina en eritrocitos) y/o cantidades de constituyentes que se han añadido a las muestras (por ejemplo, tintes que se han aplicado, y que se unen a componentes celulares). Además, en algunos modos de realización, los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento se pueden usar para determinar las cantidades de más de un constituyente presente en la muestra. Por ejemplo, aplicando tintes adecuados y/o seleccionando longitudes de onda centrales apropiadas para las imágenes de la muestra, se pueden determinar las cantidades de dos o más constituyentes. Considérese una muestra que incluye hemoglobina como constituyente absorbente natural. La muestra se puede teñir con dos tintes ampliamente absorbentes S(1) y S(2), y con un tercer tinte S(3) con una banda de absorción relativamente estrecha. S(3) se une selectivamente a un constituyente particular de interés en las células de modo que, midiendo la cantidad de S(3) presente, se proporciona una medición del constituyente.

Si los espectros de absorción de hemoglobina y S(3) están lo suficientemente separados espectralmente de modo que la hemoglobina tenga una absorción significativa solo en las longitudes de onda  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  y  $\lambda_3$ , pero no en  $\lambda_4$ , y S(3) tenga una absorción significativa solo en las longitudes de onda  $\lambda_2$ ,  $\lambda_3$  y  $\lambda_4$ , pero no en  $\lambda_1$ , entonces suponiendo que S(1) y S(2) tienen una absorción significativa en las cuatro longitudes de onda, la cantidad de hemoglobina celular se puede determinar de acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento para medir las cantidades de constituyentes celulares a partir de imágenes de la muestra correspondientes a las longitudes de

onda de iluminación  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  y  $\lambda_3$ , y la cantidad de S(3) se puede determinar de acuerdo con los mismos procedimientos a partir de imágenes de la muestra correspondientes a las longitudes de onda de iluminación  $\lambda_2$ ,  $\lambda_3$  y  $\lambda_4$ . Estos enfoques se pueden generalizar además a un número mayor de constituyentes de interés y a un número mayor o más pequeño de factores contribuyentes espetrales ampliamente absorbentes tales como S(1) y S(2).

5

### **Informe de resultados**

En determinados modos de realización, los volúmenes celulares, las cantidades de constituyentes, el volumen celular medio y las concentraciones de constituyentes medias determinados se pueden visualizar a un operario del sistema usando, por ejemplo, la pantalla 110. Los resultados se pueden visualizar por célula o como resultados promediados para la muestra completa. Además, los resultados numéricos calculados (por ejemplo, para células individuales) se pueden superponer encima de una o más imágenes de las células. En general, un operario del sistema puede ejercer control sobre el modo en que se visualizan los resultados usando la unidad de interfaz humana 112 (por ejemplo, un teclado y/o ratón y/o cualquier otro dispositivo de entrada). El operario del sistema también puede ejercer control sobre cualquiera de los otros parámetros, condiciones y opciones asociados con los procedimientos divulgados en el presente documento a través de la unidad de interfaz 112 y la pantalla 110.

También se pueden calcular una o más métricas a partir de las mediciones del volumen celular medio y/o la hemoglobina celular media, y visualizar en la etapa 210. En algunos modos de realización, por ejemplo, la amplitud de distribución de los eritrocitos se puede calcular y visualizar para un operario humano. A su vez, la amplitud de distribución de los eritrocitos se puede usar para calcular y visualizar la posibilidad de anisocitosis y/o anemia. Además, las mediciones de hemoglobina celular media se pueden usar con un valor de hematocrito de la muestra para calcular la concentración de hemoglobina celular media.

Las mediciones del volumen celular y la concentración de constituyentes y/o las métricas calculadas a partir de las mismas se pueden almacenar junto con imágenes de la muestra en una unidad de almacenamiento electrónica asociada con el sistema de control 108. Por ejemplo, esta información se puede almacenar en un registro electrónico asociado con el paciente al que corresponde la muestra 104. De forma alternativa, o además, la información se puede transmitir a uno o más médicos u otro personal de tratamiento. La información se puede transmitir por medio de una red (por ejemplo, una red informática) a un dispositivo informático. Además, la información se puede transmitir a un dispositivo de mano, tal como un teléfono móvil, y la transmisión puede incluir una alerta o advertencia si las métricas caen fuera de un intervalo predeterminado de valores.

### Otros analitos

Como se explica anteriormente, la presente divulgación se centra, para propósitos ilustrativos, en la determinación del volumen celular y las cantidades de constituyentes celulares en los eritrocitos. Sin embargo, los sistemas y procedimientos divulgados en el presente documento también pueden determinar volúmenes y cantidades de constituyentes celulares para otros tipos de células. En particular, la ecuación (8) se puede usar para determinar valores de métricas celulares para una variedad de diferentes tipos de células.

Como ejemplo, los sistemas y procedimientos divulgados en el presente documento pueden usar una combinación lineal de mediciones de densidad óptica y volumen específicas del color, con coeficientes de ponderación determinados adecuadamente, para calcular un volumen plaquetario para plaquetas dentro de una muestra de sangre dada. Las mediciones del volumen plaquetario dentro de una muestra se pueden promediar para proporcionar una medición del volumen plaquetario medio. Al igual que con el ejemplo descrito previamente para calcular el volumen celular y las cantidades de constituyentes en los eritrocitos, las imágenes de la muestra de sangre se adquieren usando múltiples longitudes de onda de luz. Las imágenes de la muestra se analizan a continuación de acuerdo con las etapas del diagrama de flujo 300 para proporcionar mediciones de los volúmenes plaquetarios.

La primera etapa en el diagrama de flujo 300 es la selección de un conjunto de plaquetas representativas en la etapa 302. Un ejemplo de una muestra de sangre preparada que contiene plaquetas se ilustra en las FIGS. 9A y 9B. La FIG. 9A muestra una imagen 1100 de una muestra de sangre que incluye una gran agrupación o acumulación de plaquetas 1120. Ya que las plaquetas se pueden acumular y formar una agrupación concentrada, se puede requerir un procesamiento de imagen adicional para identificar las plaquetas individuales dentro de una acumulación o agrupación para su posible inclusión en el conjunto de plaquetas representativas. Un ejemplo de dicho procesamiento se ilustra en la FIG. 9B. Los objetos en la imagen se segmentan para identificar plaquetas individuales dentro de la agrupación.

60

Como se muestra en la agrupación segmentada 1220 de la FIG. 9B, las plaquetas individuales se identifican por bordes.

65

El proceso de segmentación puede proceder en tres fases. En una primera fase, se identifican las regiones centrales de las plaquetas individuales en cada imagen. Las regiones centrales de plaquetas se muestran como regiones casi circulares en la FIG. 9B. Las regiones centrales de plaquetas aparecen como las regiones más

oscuras de las plaquetas.

En la segunda fase, se identifican los píxeles en la imagen que pueden ser parte de una plaqueta. Se puede determinar que los píxeles son parte de una plaqueta en base a una o más condiciones de umbral en el valor de un píxel dado. En algunos modos de realización, si el valor de intensidad de un píxel es superior a 120 en una imagen adquirida a una longitud de onda de iluminación azul (por ejemplo, 415 nm), y el valor de intensidad también es al menos 30 niveles mayor que un valor de intensidad del mismo píxel en una imagen adquirida a una longitud de onda de iluminación verde (por ejemplo, 525 nm), el píxel se identifica como parte de una plaqueta.

10 En la tercera fase, cada uno de los píxeles identificados en la segunda fase como parte de una plaqueta se asigna a una plaqueta correspondiente al centro de plaqueta que está más cercano al píxel. Si la distancia entre un píxel particular y su centro de plaquetas más cercano supera un valor de umbral, el píxel no se asigna a ninguna plaqueta. Esta fase da como resultado la asignación de un conjunto de píxeles correspondientes a cada una de las plaquetas identificadas. Los conjuntos de píxeles correspondientes a plaquetas individuales se representan en la FIG. 9B como rodeando irregularmente regiones centrales de plaquetas.

15 En algunos modos de realización, los límites entre plaquetas pueden estar sujetos a operaciones morfológicas tales como dilatación. La dilatación se puede detener, por ejemplo, cuando los límites de las plaquetas no se superponen. Sin embargo, la erosión de la máscara de píxeles (por ejemplo, el subconjunto de píxeles) correspondiente a cada plaqueta no se realiza típicamente como se describe anteriormente en relación con los eritrocitos. Los límites de las plaquetas son típicamente más delgados y menos refractivos que los de los eritrocitos. Como resultado, los límites de las plaquetas no aparecen oscuros en las imágenes, en contraste con la apariencia de los eritrocitos, y típicamente no se realiza la erosión de las máscaras de píxeles correspondientes a plaquetas individuales. Con los límites de las plaquetas identificados y los píxeles asignados a una plaqueta dada, se puede calcular el área de cada plaqueta dentro del conjunto representativo.

20 En general, se puede usar una variedad de algoritmos de segmentación para segmentar una agrupación de plaquetas en plaquetas individuales. Se describen ejemplos de dichos algoritmos en las patentes de EE. UU. 7.689.038 y 7.881.532.

25 30 Como se describe anteriormente en relación con los eritrocitos, también se pueden realizar etapas adicionales para determinar si se deben incluir plaquetas individuales en el conjunto de plaquetas representativas usado en los cálculos posteriores. Las plaquetas que tocan cualquiera de los bordes de las imágenes o que están de otro modo oscurecidas en las imágenes se retiran del conjunto de plaquetas representativas y no se usan en cálculos adicionales.

35 40 La aplicación de umbrales de densidad óptica integrada puede refinar además el conjunto de plaquetas representativas. Por ejemplo, las plaquetas con un valor de densidad óptica integrada superior a 600 cuando se iluminan con luz a una longitud de onda de iluminación amarilla se pueden excluir del conjunto de plaquetas representativas, dichos objetos son típicamente más grandes que una plaqueta y, a menudo, son glóbulos rojos. Además, las plaquetas con un valor de densidad óptica integrada superior a 200 cuando se iluminan con luz a una longitud de onda de iluminación azul se pueden excluir del conjunto de plaquetas representativas; dichos objetos son típicamente demasiado oscuros para ser una plaqueta y, a menudo, indican polvo u otros restos en la muestra.

45 50 55 60 65 En algunos modos de realización, se aplica un clasificador tal como un clasificador discriminante lineal para identificar las plaquetas que se han asentado encima de los eritrocitos dentro de la muestra. El clasificador utiliza una combinación de múltiples rasgos característicos de candidatos de plaquetas (por ejemplo, cinco o más, diez o más, quince o más, etc.) relacionados con la conformación, textura y color de los candidatos de plaquetas para identificar y excluir plaquetas superpuestas del conjunto de plaquetas representativas.

Seguidamente, en la etapa 304, se determinan los valores de densidad óptica y volumen específicos del color para el conjunto de plaquetas representativas de acuerdo con las ecuaciones (3) y (6) o (7). A continuación, en la etapa 306, se calculan métricas de plaquetas tales como el volumen plaquetario usando los rasgos característicos determinados en la etapa 304 de acuerdo con la ecuación (8). Como se describe anteriormente, las ponderaciones asociadas con los rasgos característicos se pueden determinar en base a los datos de entrenamiento, por ejemplo, determinando los coeficientes de regresión lineal que correlacionan los rasgos característicos con los datos de entrenamiento que comprenden valores de volumen plaquetario conocidos para múltiples muestras de sangre (por ejemplo, como se informa por un sistema de citometría de flujo calibrado).

Como ejemplo, después de determinar un conjunto de coeficientes de ponderación a partir de un conjunto de datos de entrenamiento para la determinación del volumen celular, la ecuación (9) se puede reescribir de modo que el volumen plaquetario ( $VP$ ) se pueda determinar como sigue:

$$VP = (-0,047) \cdot DOI(y) + 0,050 \cdot DOI(g) + 0,082 DOI(b) \quad (14)$$

$$+ 0,28 \cdot Vol(y) + (-0,15) \cdot Vol(g) + (-0,031) \cdot Vol(b)$$

$$+ (-0,058) A + 4,0$$

Como se analiza anteriormente, los sistemas y procedimientos divulgados en el presente documento se pueden usar para analizar tanto muestras de sangre completa (por ejemplo, muestras tomadas de pacientes) como composiciones de control de calidad. Los coeficientes de ponderación mostrados en la ecuación (9) y (14) se

- 5 pueden usarse para analizar tanto muestras de sangre completa como composiciones de control de calidad. Las  
10 composiciones de control de calidad se pueden analizar para valorar el estado de funcionamiento de un dispositivo  
15 de análisis de sangre, tal como un sistema de hematología automatizado que incorpora y ejecuta los  
20 procedimientos divulgados en el presente documento. Por ejemplo, para realizar una valoración de un dispositivo,  
25 el dispositivo se puede usar para analizar una o más composiciones de control múltiples veces. Los resultados de  
30 análisis (por ejemplo, la determinación de cantidades tales como el volumen plaquetario y el volumen plaquetario  
35 medio) de análisis repetidos de las mismas composiciones de control se pueden comparar para valorar la linealidad  
40 y/o exactitud de los resultados producidos por el dispositivo, y se pueden usar para determinar si se justifica la  
45 nueva calibración del dispositivo.

- 50 Los volúmenes plaquetarios se pueden determinar para todas las plaquetas dentro de uno o más conjuntos de  
55 plaquetas representativas para calcular un valor de volumen plaquetario medio (VPM) para la muestra. Si bien  
60 otras longitudes de onda de iluminación en el espectro electromagnético son útiles para calcular volúmenes  
65 plaquetarios, los autores de la invención han descubierto que incluir rasgos característicos específicos del color  
70 para las plaquetas con imágenes con una longitud de onda de iluminación roja en la ecuación (8) no incrementó  
75 significativamente la exactitud del cálculo de los volúmenes plaquetarios o los valores de VPM de la muestra.

- 80 Los sistemas y procedimientos divulgados en el presente documento también se pueden usar para determinar  
85 otras métricas celulares para las plaquetas. En particular, los sistemas y procedimientos se pueden usar para  
90 determinar cantidades de constituyentes en plaquetas usando la ecuación (8) con coeficientes de ponderación  
95 determinados a partir de muestras de referencia, como se describe anteriormente.

#### **Sistemas de preparación de muestras automatizados**

- 100 Los sistemas y procedimientos divulgados en el presente documento se pueden usar con una variedad de  
105 diferentes sistemas de preparación de muestras automatizados. La FIG. 10 muestra un diagrama esquemático de  
110 un modo de realización de un sistema de preparación de muestras automatizado 1000. El sistema 1000 incluye  
115 múltiples subsistemas para almacenar sustratos, depositar muestras sobre sustratos, inspeccionar muestras  
120 preparadas sobre sustratos y almacenar muestras preparadas.

- 125 El subsistema de almacenamiento de sustratos 1010 se configura para almacenar sustratos antes del depósito de  
130 muestras sobre los mismos. Los sustratos pueden incluir, por ejemplo, portaobjetos de microscopio, cubreobjetos y  
135 sustratos planos ópticamente transparentes similares. Los sustratos se pueden formar a partir de una variedad de  
140 diferentes materiales amorfos o cristalinos que incluyen diversos tipos de vidrios. El subsistema 1010 puede incluir  
145 un manipulador que selecciona sustratos individuales de un recipiente de almacenamiento y transfiere los  
150 sustratos seleccionados al subsistema de depósito de muestras 1020.

- 155 El subsistema de depósito de muestras 1020 deposita una cantidad seleccionada de una muestra de interés, tal  
160 como una muestra de sangre, sobre un sustrato. El subsistema 1020 incluye, en general, una variedad de  
165 componentes de transferencia de fluido (por ejemplo, bombas, tubos de fluido, válvulas) configurados para  
170 depositar la muestra. Los componentes de transferencia de fluido también se pueden configurar para exponer el  
175 sustrato a soluciones de diversos tipos, incluyendo soluciones de lavado, uno o más tintes que se unen a la  
180 muestra, soluciones de fijador y soluciones tampón. El subsistema 1020 también puede contar con componentes  
185 de retirada de fluido (por ejemplo, un subsistema de vacío) y un aparato de secado para garantizar que la muestra  
190 se fije al sustrato. Un manipulador de sustrato puede transferir el sustrato que soporta la muestra al subsistema de  
195 formación de imágenes 1030.

- 200 El subsistema de inspección 1030 incluye diversos componentes para obtener imágenes de muestras sobre  
205 sustratos y para analizar las imágenes para determinar información sobre las muestras. Por ejemplo, el subsistema  
210 de inspección 1030 puede incluir una o más fuentes de luz (por ejemplo, diodos emisores de luz, diodos láser y/o  
215 láseres) para dirigir la luz incidente a una muestra. El subsistema de formación de imágenes 1030 también puede  
220 incluir un aparato óptico (por ejemplo, un objetivo de microscopio) para captar la luz transmitida y/o reflejada por  
225 una muestra. Se puede configurar un detector (por ejemplo, un detector CCD) acoplado al aparato óptico para  
230 captar imágenes de la muestra. La información derivada del análisis de las imágenes de la muestra se puede  
235 almacenar en una variedad de medios de almacenamiento ópticos y/o electrónicos para su posterior recuperación  
240 y/o análisis adicional.

- 245 Tras la inspección, un manipulador de sustratos puede transferir el sustrato al subsistema de almacenamiento  
250 1040. El subsistema de almacenamiento 1040 puede etiquetar sustratos individuales, por ejemplo, con información  
255 relacionada con la fuente de la muestra aplicada al sustrato, el tiempo del análisis y/o cualquier irregularidad  
260 identificada durante el análisis. El subsistema de almacenamiento también puede almacenar sustratos procesados  
265 en bastidores de múltiples sustratos, que se pueden retirar del sistema 1000 a medida que se llenan con sustratos.

- Como se muestra en la FIG. 10, cada uno de los diversos subsistemas del sistema 1000 se puede conectar a un procesador electrónico común 1050. El procesador 1050 se puede configurar para controlar el funcionamiento de cada uno de los subsistemas del sistema 1000 de forma automatizada, con una intervención relativamente pequeña (o nula) de un operario del sistema. Los resultados del análisis de muestras se pueden visualizar en la pantalla del sistema 1060 para un operario supervisor. La interfaz 1070 permite al operario emitir comandos al sistema 1000 y revisar manualmente los resultados del análisis automatizado.
- Se describen aspectos y rasgos característicos adicionales de los sistemas de procesamiento de muestras automatizados, por ejemplo, en la solicitud de patente de EE. UU. n.º de serie 12/943.687.

#### **Implementación de equipo informático y programa informático**

- Las etapas de procedimiento y los procedimientos descritos en el presente documento se pueden implementar en equipo informático o en programa informático, o en una combinación de ambos. En particular, el procesador electrónico 114 puede incluir instrucciones de programa informático y/o equipo informático para realizar cualquiera de los procedimientos analizados anteriormente. Los procedimientos se pueden implementar en programas informáticos usando técnicas de programación estándar siguiendo las etapas de procedimiento y las figuras divulgadas en el presente documento. Se aplica código de programa a los datos de entrada para realizar las funciones descritas en el presente documento. La información de salida se aplica a uno o más dispositivos de salida tales como una impresora, o a un dispositivo de visualización, o una página web en un monitor de ordenador con acceso a un sitio web, por ejemplo, para una supervisión remota.
- Cada programa se implementa preferentemente en un lenguaje de programación orientado a objetos o procedural de alto nivel para comunicarse con un procesador. Sin embargo, se pueden implementar los programas en lenguaje ensamblador o de máquina, si se desea. En cualquier caso, el lenguaje puede ser un lenguaje compilado o interpretado. Cada programa informático se puede almacenar en un medio o dispositivo de almacenamiento (por ejemplo, una memoria electrónica) legible por el procesador, para configurar y hacer funcionar el procesador para realizar los procedimientos descritos en el presente documento.
- La FIG. 11 es un diagrama esquemático de un sistema informático 1300 que se puede usar para controlar las operaciones descritas en asociación con cualquiera de los procedimientos implementados por ordenador descritos en el presente documento, de acuerdo con un modo de realización. El sistema 1300 incluye un procesador 1310, una memoria 1320, un dispositivo de almacenamiento 1330 y un dispositivo de entrada/salida 1340. Cada uno de los componentes 1310, 1320, 1330 y 1340 se interconectan usando un bus de sistema 1350. El procesador 1310 puede procesar instrucciones para su ejecución dentro del sistema 1300. En un modo de realización, el procesador 1310 es un procesador de un solo subprocesso. En otro modo de realización, el procesador 1310 es un procesador de múltiples subprocessos. El procesador 1310 puede procesar instrucciones almacenadas en la memoria 1320 o en el dispositivo de almacenamiento 1330 para visualizar información gráfica para una interfaz de usuario en el dispositivo de entrada/salida 1340. El procesador 1310 puede ser sustancialmente similar al procesador 1050 descrito anteriormente con referencia a la FIG. 10.
- La memoria 1320 almacena información dentro del sistema 1300. En algunos modos de realización, la memoria 1320 es un medio legible por ordenador. La memoria 1320 puede incluir memoria volátil y/o memoria no volátil.
- El dispositivo de almacenamiento 1330 puede proporcionar almacenamiento masivo para el sistema 1300. En general, el dispositivo de almacenamiento 1330 puede incluir cualquier medio tangible no transitorio configurado para almacenar instrucciones legibles por ordenador. En un modo de realización, el dispositivo de almacenamiento 1330 es un medio legible por ordenador. En diversos modos de realización diferentes, el dispositivo de almacenamiento 1330 puede ser un dispositivo de disquete, un dispositivo de disco duro, un dispositivo de disco óptico o un dispositivo de cinta.
- El dispositivo de entrada/salida 1340 proporciona operaciones de entrada/salida para el sistema 1300. En algunos modos de realización, el dispositivo de entrada/salida 1340 incluye un teclado y/o un dispositivo de puntero. En algunos modos de realización, el dispositivo de entrada/salida 1340 incluye una unidad de visualización para visualizar interfaces gráficas de usuario. En algunos modos de realización, el dispositivo de entrada/salida 1340 incluye una o más de la pantalla 1060 y la interfaz 1070 descritas anteriormente con referencia a la FIG. 10.
- Los rasgos característicos descritos se pueden implementar en circuitos electrónicos digitales, o en equipo informático, soporte lógico inalterable (*firmware*) o en combinaciones de estos. Los rasgos característicos se pueden implementar en un producto de programa informático incorporado de forma tangible en un soporte de información, por ejemplo, en un dispositivo de almacenamiento legible por máquina, para su ejecución por un procesador programable; y se pueden realizar los rasgos característicos por un procesador programable que ejecute un programa de instrucciones para realizar funciones de los modos de realización descritos operando con datos de entrada y generando una salida. Los rasgos característicos descritos se pueden implementar en uno o más programas informáticos que son ejecutables en un sistema programable que incluye al menos un procesador

- programable acoplado para recibir datos e instrucciones desde, y para transmitir datos e instrucciones a, un sistema de almacenamiento de datos, al menos un dispositivo de entrada y al menos un dispositivo de salida. Un programa informático incluye un conjunto de instrucciones que se pueden usar, directa o indirectamente, en un ordenador para realizar una determinada actividad o producir un determinado resultado. Un programa informático se puede escribir en cualquier forma de lenguaje de programación, incluyendo lenguajes compilados o interpretados, y se puede implantar de cualquier forma, incluyendo como un programa independiente o como un módulo, componente, subrutina u otra unidad adecuada para su uso en un entorno informático.
- 5 Se pueden usar diversas arquitecturas de programa informático para implementar los procedimientos y sistemas descritos en la presente solicitud. Por ejemplo, se puede usar un patrón de mensajería de publicación/suscripción para implementar los procedimientos y sistemas descritos en el presente documento. En el caso de la mensajería de publicación/suscripción, el sistema incluye varios módulos de equipo informático y programa informático que se comunican solo por medio de un módulo de mensajería. Cada módulo se puede configurar para realizar una función específica. Por ejemplo, el sistema puede incluir uno o más de un módulo de equipo informático, un módulo de cámara y un módulo de enfoque. El módulo de equipo informático puede enviar comandos al equipo informático de formación de imágenes que implementa las funciones de enfoque automático, que a su vez activa una cámara para adquirir imágenes. En algunos modos de realización, el módulo de equipo informático puede incluir el sistema de control 108 descrito anteriormente con referencia a la FIG. 2.
- 10 Un módulo de cámara puede recibir imágenes de la cámara y determinar parámetros de cámara, tales como el tiempo de obturación o el enfoque. Las imágenes también se pueden almacenar temporalmente en la memoria del ordenador antes de procesarse por el módulo de cámara. Cuando se realiza la búsqueda inicial de la inclinación del portaobjetos, el módulo de cámara también puede enviar un mensaje que interrumpe el módulo de equipo informático cuando ha visto suficientes imágenes para determinar el tiempo de obturación o el enfoque apropiados.
- 15 En algunos modos de realización, el módulo de cámara incluye el detector 106 descrito anteriormente con referencia a la FIG. 2.
- 20 El sistema también puede incluir un módulo de enfoque que se puede implementar como programa informático, equipo informático o una combinación de programa informático y equipo informático. En algunos modos de realización, el módulo de enfoque examina todos los marcos en una pila y estima lo lejos que está la pila de la distancia ideal o distancia focal ideal. El módulo de enfoque también puede ser responsable de asignar una puntuación de enfoque a cada marco en una pila de imágenes.
- 25 Los procesadores adecuados para la ejecución de un programa de instrucciones incluyen, a modo de ejemplo, microprocesadores de propósito tanto general como especial, y el procesador único o uno de múltiples procesadores de cualquier tipo de ordenador. En general, un procesador recibirá instrucciones y datos de una memoria de solo lectura o una memoria de acceso aleatorio o ambas. Los ordenadores incluyen un procesador para ejecutar instrucciones y una o más memorias para almacenar instrucciones y datos. En general, un ordenador también incluirá, o se acoplará de forma funcional para comunicarse con, uno o más dispositivos de almacenamiento masivo para almacenar archivos de datos; dichos dispositivos incluyen discos magnéticos, tales como discos duros internos y discos extraíbles; discos magneto-ópticos; y discos ópticos. Los dispositivos de almacenamiento adecuados para incorporar de forma tangible instrucciones y datos de programa informático incluyen todas las formas de memoria no volátil, incluyendo, a modo de ejemplo, dispositivos de memoria semiconductores, tales como EPROM, EEPROM y dispositivos de memoria *flash*; discos magnéticos tales como discos duros internos y discos extraíbles; discos magneto-ópticos; y discos CD-ROM y DVD-ROM. El procesador y la memoria se pueden complementar con, o incorporar en, ASIC (circuitos integrados específicos de la aplicación).
- 30 Para proporcionar la interacción con un usuario, los rasgos característicos se pueden implementar en un ordenador que tenga un dispositivo de visualización tal como un monitor CRT (tubo de rayos catódicos) o LCD (pantalla de cristal líquido) para visualizar información al usuario y un teclado y un dispositivo de puntero, tal como un ratón o una bola de seguimiento, por los que el usuario puede proporcionar datos de entrada al ordenador. De forma alternativa, el ordenador puede no tener un teclado, ratón o monitor unido y se puede controlar de forma remota por otro ordenador.
- 35 Los rasgos característicos se pueden implementar en un sistema informático que incluye un componente de sección de procesamiento (*back-end*), tal como un servidor de datos, o que incluye un componente de *middleware*, tal como un servidor de aplicaciones o un servidor de Internet, o que incluye un componente de sección de entrada (*front-end*), tal como un ordenador cliente que tiene una interfaz gráfica de usuario o un navegador de Internet, o cualquier combinación de estos. Los componentes del sistema se pueden conectar por cualquier forma o medio de comunicación de datos digitales, tal como una red de comunicación. Los ejemplos de redes de comunicación incluyen, por ejemplo, una LAN, una WAN y los ordenadores y redes que forman Internet.
- 40 El sistema informático puede incluir clientes y servidores. En general, un cliente y un servidor están remotos entre sí y típicamente interactúan a través de una red, tal como la que se describe. La relación del cliente y el servidor surge en virtud de programas informáticos que se ejecutan en los ordenadores respectivos y que tienen una relación cliente-servidor entre sí.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

El procesador 1310 lleva a cabo instrucciones relacionadas con un programa informático. El procesador 1310 puede incluir equipo informático tal como puertas lógicas, sumadores, multiplicadores y contadores. El procesador 1310 puede incluir además una unidad lógica aritmética (ALU) separada que realiza operaciones lógicas y aritméticas.

5

#### Otros modos de realización

Se ha de entender que la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la divulgación, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones. Por ejemplo, aunque la descripción anterior y el diagrama esquemático en la FIG. 2 analizan la medición de la luz transmitida desde una muestra, los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento también se pueden usar cuando las imágenes de la muestra corresponden a la luz reflejada desde la muestra. Determinadas muestras pueden ser reflectantes de forma natural, o se pueden marcar con marcadores reflectantes, de modo que la luz reflejada proporciona un procedimiento práctico para determinar cantidades de constituyentes celulares y/o volumen. En algunos modos de realización, la muestra 104 se puede situar encima de un sustrato tal como un portaobjetos de microscopio con un revestimiento reflectante. El revestimiento reflectante puede funcionar para dirigir la luz transmitida una vez de vuelta a través de la muestra una segunda vez, de modo que la luz "reflejada" medida corresponda realmente a luz incidente que se ha transmitido dos veces a través de la muestra.

10

15

20

En general, los procedimientos y sistemas divulgados en el presente documento se pueden usar para determinar volúmenes por célula, contenido de constituyentes y/o volumen celular medio de muestra o contenido de constituyentes celulares medio para una variedad de diferentes tipos de muestras. Por ejemplo, los volúmenes celulares y el contenido de constituyentes tales como hemoglobina u otras proteínas se pueden determinar para muestras que incluyen células de líquidos corporales y tejidos, incluyendo sangre, médula ósea, orina, tejido epitelial, tumores, semen, saliva y otros tejidos o líquidos biológicos circulantes o no circulantes.

25

30

#### Ejemplos

35

##### Ejemplo 1

Para evaluar la eficacia de los sistemas y procedimientos divulgados en el presente documento para determinar un volumen celular medio para una muestra de sangre, se depositó una muestra de sangre de 1 µl en un portaobjetos de microscopio para formar una monocapa de eritrocitos en el portaobjetos. La muestra de sangre se depositó usando el sistema divulgado en la solicitud de patente de EE. UU. en tramitación junto con la presente n.º de serie 12/430.885. A continuación, se preparó la muestra usando fijador, tinte rojo (por ejemplo, que comprende eosina Y), tinte azul (por ejemplo, que comprende azur B y azul de metileno) y formulaciones de enjuague divulgadas en la solicitud de patente de EE. UU. en tramitación junto con la presente n.º de serie 61/505.011 en un sistema automatizado del tipo divulgado en la solicitud de patente de EE. UU. en tramitación junto con la presente n.º de serie 13/293.050.

40

45

Después de que la muestra de sangre se fijó, tiñó, enjuagó y secó, un mecanismo de transporte automatizado cargó el portaobjetos en una platina automatizada en una estación de formación de imágenes de bajo aumento (por ejemplo, con una lente de objetivo de 10x).

45

50

El mecanismo de transporte automatizado situó la muestra entre una fuente de luz (por ejemplo, la fuente 106) y un detector (por ejemplo, el detector 102). Se adquirieron imágenes de gran aumento de la muestra en localizaciones correspondientes a objetos de interés. El detector se emparejó con una lente de objetivo de 50x e incluyó un sensor

CCD de 640 x 480 píxeles. El tamaño de píxel de las imágenes adquiridas por medio del detector fue de 7,4 µm; las dimensiones del campo de visión fueron:

$$\text{ancho} = \left( 640 \text{ píxeles} \cdot 7,4 \frac{\mu\text{m}}{\text{píxel}} \right) / 50 = 95\mu\text{m}$$

$$\text{altura} = \left( 480 \text{ píxeles} \cdot 7,4 \frac{\mu\text{m}}{\text{píxel}} \right) / 50 = 71\mu\text{m}$$

55

El sistema de formación de imágenes adquirió varios cientos de imágenes de la muestra usando la lente de objetivo de 50x. Para cada localización en la muestra, se adquirieron imágenes en cuatro colores diferentes de luz de iluminación (635, 598, 525 y 415 nm). Cada imagen incluyó típicamente 100 o más eritrocitos y, por lo tanto, las imágenes de gran aumento de la muestra proporcionaron imágenes de 60.000 o más eritrocitos. La FIG. 7 muestra una imagen esquemática 700 de una muestra, adquirida con luz de iluminación azul (por ejemplo, a una longitud de onda de 415 nm), aunque, más en general, se pueden usar otras longitudes de onda de iluminación (por ejemplo, 635, 598, 525 nm) o combinaciones de las mismas para adquirir imágenes, identificar eritrocitos y determinar volúmenes celulares y contenido de constituyentes. La imagen 700 incluye múltiples objetos identificados 702A-J.

Los eritrocitos se localizaron dentro de la imagen 700 aplicando una condición de umbral a la imagen 700. Específicamente, solo se procesaron más los píxeles que tenían un nivel de gris de intensidad de 160 o menos (para una imagen con una resolución de 8 bits), para excluir los leucocitos del análisis de volumen de eritrocitos. La FIG. 8 es una imagen esquemática 800 de la misma muestra que se muestra en la FIG. 7 después de que se ha aplicado la condición de umbral a la imagen. Los objetos 802A-J están presentes en la imagen 800.

A continuación, se realizó un proceso de etiquetado de componentes conectados para correlacionar los píxeles individuales en la imagen 800 con los objetos 802A-J. Después de que se completó este proceso, se aplicó una máscara de erosión de píxeles a cada uno de los conjuntos de píxeles correspondientes a los objetos 802A-J para retirar los píxeles que representaban los 0,5 micrómetros más externos del perímetro de cada objeto. Como se divulga anteriormente, la erosión de píxeles reduce los artefactos de imagen que se deben a la refracción de la luz desde los límites de las células; estos artefactos, si no se compensan, pueden dar lugar a errores en la determinación del volumen celular.

Se midieron varios rasgos característicos de cada uno de los objetos 802A-J, y las mediciones se resumen en la tabla 1. El área conocida por píxel (0,022 micrómetros cuadrados por píxel) se usó para calcular un área para cada uno de los objetos 802A-J. El cálculo del área incluyó toda el área de la célula, incluyendo la porción del área que se retiró por la máscara de erosión de píxeles.

La redondez de los objetos 802A-J también se valoró determinando la desviación de la conformación de sección transversal de cada objeto del perfil de un círculo perfecto. Como se divulga anteriormente, la proporción del cuadrado del perímetro con respecto al área de un círculo perfecto es  $4\pi$ . La columna de redondez en la tabla 1 refleja la proporción del perímetro cuadrado con respecto al área para cada objeto en la imagen 800 dividido entre  $4\pi$ . Un objeto perfectamente circular tendrá un valor de redondez de 1, y el valor de redondez se desvía de 1 a medida que la conformación del objeto se vuelve cada vez menos circular.

También se midieron los valores de densidad óptica para los objetos 802A-J. El valor del nivel de gris para cada píxel en cada objeto se convirtió en un valor de densidad óptica usando la ecuación (2). Los valores de densidad óptica se determinaron solo para los píxeles de imagen que estaban dentro de la máscara erosionada. A su vez, estos valores de densidad óptica se usaron para calcular una densidad óptica media y un valor de densidad óptica máxima para cada uno de los objetos. Además, los valores de densidad óptica integrada se calcularon a partir de los valores de área celular y de densidad óptica media.

Los objetos 802A-J en la FIG. 8 se identificaron cada uno como posibles eritrocitos. Sin embargo, antes de calcular los volúmenes celulares, se seleccionó un conjunto representativo de eritrocitos del grupo de objetos 802A-J. Para seleccionar eritrocitos representativos, los objetos se evaluaron con respecto a sus propiedades de densidad geométrica y óptica para garantizar que tuvieran conformaciones y rasgos característicos adecuados correspondientes a los eritrocitos.

En una primera etapa, se escaneó la imagen 800 para determinar si alguno de los objetos estaba cortado o, de otro modo, oscurecido por el borde de la imagen (por ejemplo, objetos contenidos solo parcialmente dentro de la imagen). Los objetos 802H y 802J estaban cortados cada uno en el borde de la imagen 800. En consecuencia, los objetos 802H y 802J se excluyeron de un análisis adicional; los resultados de este proceso se muestran en la tabla 1 en la columna "Célula parcial".

La siguiente etapa en la identificación del conjunto de eritrocitos representativos fue determinar si los objetos restantes (objetos 802A-G y 802I) se deberían incluir en el conjunto. Para eliminar artefactos y/o grupos de células superpuestas del conjunto representativo, se excluyeron de un análisis adicional objetos con un área mayor de 65 micrómetros cuadrados o un área más pequeña que 35 micrómetros cuadrados. En la imagen 800, los objetos 802A, 802B y 802I tenían cada uno un área mayor de 65 micrómetros cuadrados (97, 76 y 103 micrómetros cuadrados, respectivamente, como se muestra en la tabla 1). En consecuencia, estos objetos se eliminaron del conjunto de eritrocitos representativos. La conformación del objeto 802A en la FIG. 8 sugiere que este objeto corresponde a una única célula altamente irregular o bien a múltiples células. Los objetos 802B y 802I parecen corresponder cada uno a varias células agrupadas o superpuestas.

A continuación, se analizaron los valores de densidad óptica de los objetos 802C-G restantes para determinar si estos objetos deberían incluirse en el conjunto de eritrocitos representativos. En particular, se aplicó un valor de umbral de densidad óptica mínima media de 0,33 a cada objeto para excluir los objetos que correspondían a leucocitos. Como se muestra en la tabla 1, el objeto 800C tenía un valor de densidad óptica media de 0,29, lo que sugería que el objeto 802C no era un eritrocito, sino quizás un núcleo de leucocito. Una comparación del objeto 802C en la imagen 800 y el correspondiente objeto 702C en la imagen 700 sugirió que el objeto 802C correspondía a un núcleo de leucocito y, por lo tanto, se excluyó apropiadamente del conjunto representativo por la aplicación del umbral de densidad óptica. En relación con la imagen 700, el umbral de intensidad de píxel retiró las contribuciones del citoplasma que eran evidentes en el objeto 702C, dejando solo el núcleo del leucocito visible en el objeto 802C.

Además, se aplicó un umbral de densidad óptica máxima media de 0,66 a cada uno de los objetos 802C-G para

garantizar que los objetos no correspondieran a múltiples células superpuestas donde el grado de superposición era lo suficientemente alto de modo que los objetos no se podían rechazar en base a la irregularidad de la conformación. El valor de densidad óptica para el objeto 802F superó el umbral y, por lo tanto, el objeto 802F se excluyó del conjunto de eritrocitos representativos. Una comparación del objeto 802F en la FIG. 8 y el correspondiente objeto 702F en la FIG. 7 sugirió que el objeto 802F correspondía a dos células superpuestas y, por lo tanto, se excluyó apropiadamente.

Como resultado, el conjunto representativo de eritrocitos se redujo a los objetos 802D, 802E y 802G. Estos eritrocitos representativos se usaron a continuación para calcular el volumen celular medio para la muestra de sangre. Los valores de área,  $DO_{\text{media}}$  y  $DO_{\text{máx}}$  de la tabla 1 para cada uno de estos objetos se usaron en la ecuación (5) para calcular el volumen para cada objeto. Los resultados de estos cálculos de volumen se muestran en la columna "Volumen" de la tabla 1. Aplicar un factor de corrección de 0,5 a estos valores de volumen expresó los volúmenes celulares en femtolitros como se muestra en la columna "Volumen (fl)" en la tabla 1. Los volúmenes individuales de cada una de estas células se usaron a continuación para calcular un volumen celular medio para la muestra, que fue de 11,36 fl. El proceso anterior se puede repetir para una pluralidad de localizaciones de imágenes en la muestra (por ejemplo, varios cientos o más), proporcionando un cálculo de volumen celular medio basado en cientos o miles de eritrocitos representativos en la muestra. Además, el proceso descrito anteriormente se puede repetir para calcular valores de densidad óptica integrada específica del color,  $DOI(c)$ , y volumen celular específico del color,  $Vol(c)$ , a partir de imágenes adquiridas en una pluralidad de longitudes de onda de iluminación. Por ejemplo, usando un total de cuatro colores de iluminación (635, 598, 525 y 415 nm), los valores de densidad óptica integrada y volumen celular específicos del color se pueden usar con la ecuación 8 para calcular un volumen celular medio para la muestra.

**Tabla 1**

Objeto	Célula parcial	Área	$DO_{\text{media}}$	$DOI$	Redondez	$DO_{\text{máx}}$	Volumen	Volumen (fl)
802A	No	97	0,73	70,81	1,31	1,34	N/A	N/A
802B	No	76	0,42	31,92	1,05	0,52	N/A	N/A
802C	No	41	0,29	11,89	1,01	0,34	N/A	N/A
802D	No	45	0,43	19,43	1,01	0,53	23,31	11,66
802E	No	51	0,39	19,89	1,02	0,56	23,13	11,56
802F	No	47	0,53	24,91	1,03	0,84	N/A	N/A
802G	No	42	0,44	18,48	1,01	0,55	21,74	10,87
802H	Sí	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
802I	No	103	0,41	42,23	1,04	0,51	N/A	N/A

### Ejemplo 2

La tabla 2 ilustra una implementación de ejemplo de la ecuación (11) para calcular los valores de hemoglobina celular media para muestras de sangre en base, en parte, a un conjunto de valores de MCH conocidos para dichas muestras. Se procesaron seis muestras de sangre usando un sistema de referencia conocido, un sistema de hematología automatizado calibrado que usa procedimientos de citometría de flujo fluorescente para calcular los diversos parámetros de un hemograma completo que incluye MCH. La columna "MCH de referencia" en la tabla 2 informa del valor de hemoglobina celular media en picogramos para cada muestra procesada usando este sistema de referencia.

A continuación, se procesaron y formaron imágenes de las seis muestras, incluyendo la identificación de conjuntos de eritrocitos representativos para cada muestra, del mismo modo como se describe anteriormente. Para cada muestra, el sistema calculó un valor de densidad óptica integrada para cada color de iluminación usado para adquirir imágenes de la muestra (es decir, amarillo, 635 nm; verde, 598 nm; y azul, 415 nm). Los valores de densidad óptica integrada para cada muestra en base a imágenes obtenidas usando la luz amarilla, verde y azul se informan en las columnas de la tabla 2 marcadas  $DOI(y)$ ,  $DOI(g)$  y  $DOI(b)$ , respectivamente.

Para cada muestra, se usaron tres valores de densidad óptica correspondientes a los colores de iluminación de la muestra para calcular un valor de hemoglobina celular preliminar. Los coeficientes de ponderación previamente determinados a partir de muestras de referencia para cada longitud de onda de iluminación se usaron en la siguiente versión de la ecuación (8):

$$H = -0,16 \cdot DOI(y) + 0,04 \cdot DOI(g) + 2,1 \cdot DOI(b)$$

Los valores de hemoglobina celular preliminares para cada muestra se informan en la columna "H" de la tabla 2. Los valores de hemoglobina celular preliminares para cada muestra se escalaron a continuación a los correspondientes valores de hemoglobina celular media determinados usando el sistema de referencia. Este proceso de escalado incluyó realizar un análisis de regresión para correlacionar los valores de hemoglobina celular

preliminares con los valores de hemoglobina celular media de referencia informados para cada muestra. La correlación óptima correspondió a escalar el factor de ponderación amarillo y añadir un valor de intersección a la ecuación anterior que se usó para calcular las mediciones de hemoglobina celular preliminares, como sigue:

5                    $H = -0,17 \cdot DOI(y) + 0,04 \cdot DOI(g) + 2,1 \cdot DOI(b) + 0,5$

Utilizando la ecuación anterior, se calcularon los valores de hemoglobina celular media para cada muestra y se informan en la columna "MCH experimental" en la tabla 2. Esta ecuación se podría aplicar a continuación a nuevas muestras procesadas en el sistema experimental para calcular los valores de MCH, sin procesar dichas muestras en el sistema de referencia.

10 **Tabla 2**

	DOI(y)	DOI(g)	DOI(b)	MCH de referencia	H	MCH experimental
Muestra 1	7,73882	17,5825	13,1197	27,5	27,01646	27,43907
Muestra 2	7,78053	18,2845	15,3606	32,2	31,74376	32,16595
Muestra 3	7,2244	16,9506	14,8361	31,1	30,67793	31,10569
Muestra 4	6,88931	15,4531	14,4238	30,2	29,80581	30,23692
Muestra 5	8,624	17,846	15,7571	32,8	32,42391	32,83767
Muestra 6	6,93862	15,4893	13,0128	27,2	26,83627	27,26689

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de determinación de un volumen de una plaqueta, comprendiendo el procedimiento:
  - 5 (a) iluminar la plaqueta con luz incidente a una pluralidad de longitudes de onda de iluminación;
  - (b) obtener al menos una imagen bidimensional de la plaqueta correspondiente a cada longitud de onda de iluminación; y caracterizado por:
  - 10 (c) para cada longitud de onda de iluminación, determinar una densidad óptica media y una densidad óptica máxima para la plaqueta;
  - (d) determinar un área de la plaqueta;
  - 15 (e) para cada longitud de onda de iluminación, determinar un volumen de la plaqueta en base al área de la plaqueta y la densidad óptica media y la densidad óptica máxima para la plaqueta correspondientes a la longitud de onda de iluminación;
  - 20 (f) para cada longitud de onda de iluminación, determinar una densidad óptica integrada para la plaqueta en base al área de la plaqueta y la densidad óptica media para la plaqueta correspondientes a la longitud de onda de iluminación; y
  - 25 (g) determinar el volumen de la plaqueta en base a una combinación ponderada del área de la plaqueta, los volúmenes de la plaqueta correspondientes a cada una de las longitudes de onda de iluminación y las densidades ópticas integradas para la plaqueta correspondientes a cada una de las longitudes de onda de iluminación.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
  - 30 repetir las etapas de (a) a (g) para una pluralidad de plaquetas de una muestra de sangre para determinar los volúmenes para cada una de la pluralidad de plaquetas; y
  - determinar un volumen plaquetario medio para la muestra a partir de los volúmenes para cada una de la pluralidad de plaquetas.
- 35 3. El procedimiento de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además identificar un conjunto de píxeles en cada imagen de la plaqueta que corresponde a la plaqueta, en el que identificar el conjunto de píxeles comprende:
  - 40 identificar un primer conjunto de píxeles que corresponde a una región central de la plaqueta;
  - identificar un segundo conjunto de píxeles que corresponde a una región no central de la plaqueta; y fusionar los primer y segundo conjuntos de píxeles para formar el conjunto de píxeles que corresponde a la plaqueta.
- 45 4. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además determinar el volumen de la plaqueta en cada longitud de onda de iluminación en base a una proporción de la densidad óptica media con respecto a la densidad óptica máxima correspondiente a la longitud de onda de iluminación.
- 50 5. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la pluralidad de longitudes de onda de iluminación comprende al menos tres longitudes de onda de iluminación, opcionalmente seleccionadas de al menos una longitud de onda entre 575 nm y 600 nm, al menos una longitud de onda entre 525 nm y 570 nm, y al menos una longitud de onda entre 400 nm y 475 nm.
- 55 6. Un procedimiento de valoración de un estado de funcionamiento de un dispositivo de análisis de sangre automatizado, comprendiendo el procedimiento:
  - hacer funcionar el dispositivo de modo que el dispositivo use el procedimiento de la reivindicación 2 para determinar un volumen plaquetario medio para una composición de control; y
  - comparar un valor de referencia del volumen plaquetario medio para la composición de control con el valor determinado del volumen plaquetario medio para valorar el estado de funcionamiento del dispositivo.
- 60 7. El procedimiento de la reivindicación 6, que comprende además:
  - determinar una diferencia entre los valores determinados y de referencia del volumen plaquetario medio para la composición de control; y
  - 65 volver a calibrar el dispositivo si la diferencia supera un valor de umbral.

8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que volver a calibrar el dispositivo comprende determinar, a partir de un conjunto de muestras de sangre de referencia, una pluralidad de coeficientes de ponderación que se usan para determinar el volumen de la plaqueta en base al área de la plaqueta, los volúmenes de la plaqueta correspondientes a cada una de las longitudes de onda de iluminación, y las densidades ópticas integradas para la plaqueta correspondientes a cada una de las longitudes de onda de iluminación.
9. Un sistema (100) para determinar un volumen de una plaqueta, comprendiendo el sistema:
- 10 - una fuente de iluminación (102) configurada para iluminar la plaqueta con luz incidente (116) a una pluralidad de longitudes de onda de iluminación;
- 15 - un detector (106) configurado para obtener al menos una imagen bidimensional de la plaqueta correspondiente a cada longitud de onda de iluminación, y caracterizado por:
- 15 - un procesador electrónico (114) configurado para:
- 20 (a) determinar una densidad óptica media y una densidad óptica máxima para la plaqueta en cada longitud de onda de iluminación;
- 20 (b) determinar un área de la plaqueta;
- 25 (c) para cada longitud de onda de iluminación, determinar un volumen de la plaqueta en base al área de la plaqueta y la densidad óptica media y la densidad óptica máxima para la plaqueta correspondientes a la longitud de onda de iluminación;
- 30 (d) para cada longitud de onda de iluminación, determinar una densidad óptica integrada para la plaqueta en base al área de la plaqueta y la densidad óptica media para la plaqueta correspondiente a la longitud de onda de iluminación; y
- 35 (e) determinar el volumen de la plaqueta en base a una combinación ponderada del área de la plaqueta, los volúmenes de la plaqueta correspondientes a cada una de las longitudes de onda de iluminación y las densidades ópticas integradas para la plaqueta correspondientes a cada una de las longitudes de onda de iluminación.
- 40 10. El sistema (100) de la reivindicación 9, en el que el procesador electrónico se configura además para: repetir las etapas de (a) a (e) para una pluralidad de plaquetas de una muestra de sangre para determinar los volúmenes para cada una de la pluralidad de plaquetas; y
- 45 11. El sistema (100) de las reivindicaciones 9 o 10, en el que el procesador electrónico (114) se configura además para determinar el volumen de la plaqueta a cada longitud de onda de iluminación en base a una proporción de la densidad óptica media con respecto a la densidad óptica máxima correspondiente a la longitud de onda de iluminación.
- 50 12. El sistema (100) de una de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la pluralidad de longitudes de onda de iluminación comprende al menos una longitud de onda entre 575 nm y 600 nm, al menos una longitud de onda entre 525 nm y 570 nm, y al menos una longitud de onda entre 400 nm y 475 nm.
- 55 13. El sistema (100) de una de las reivindicaciones 9 a 12, que comprende además un sistema de preparación de muestras de sangre automatizado.
- 60 14. Un programa informático que comprende instrucciones de programa que se configuran para provocar que el sistema para determinar un volumen de una plaqueta de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 a 13 realice las etapas del procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8.
15. Un medio legible por ordenador que tiene almacenado en el mismo el programa informático de la reivindicación 14.

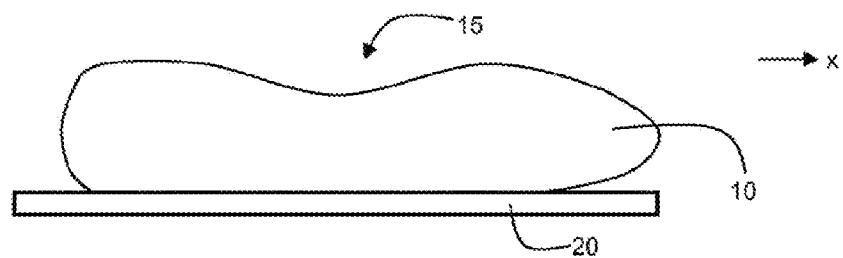


FIG. 1A

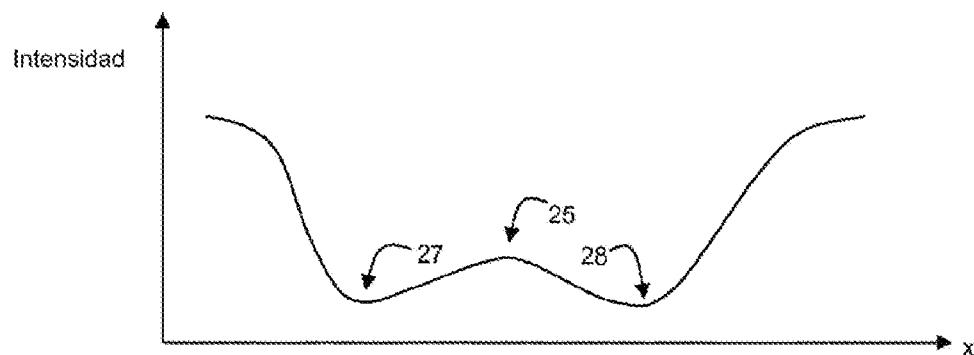


FIG. 1B

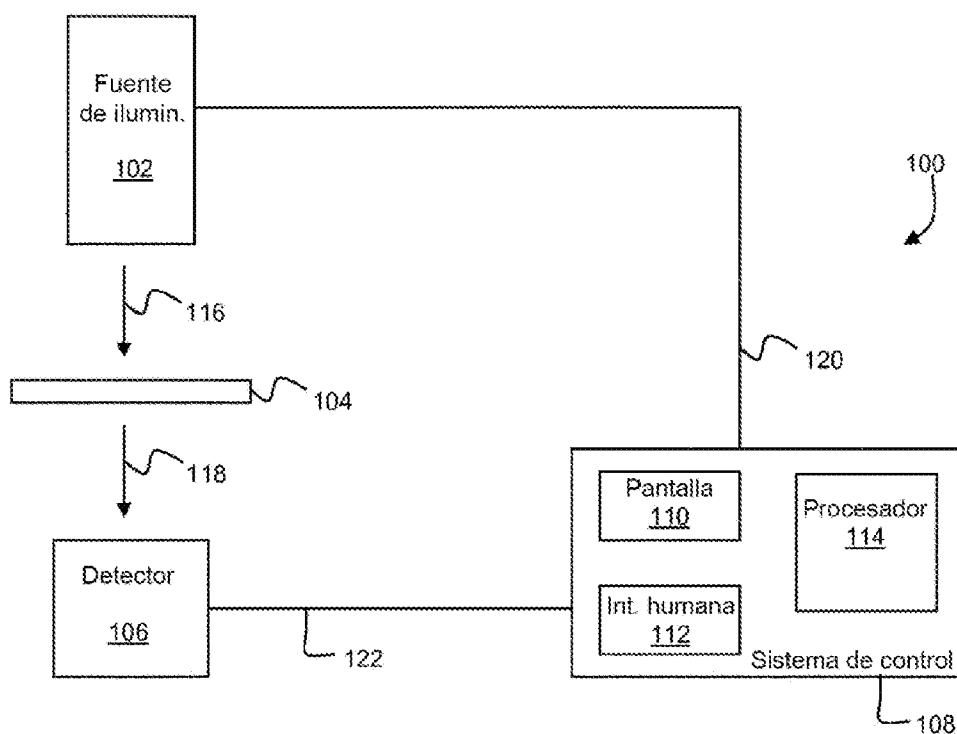


FIG. 2

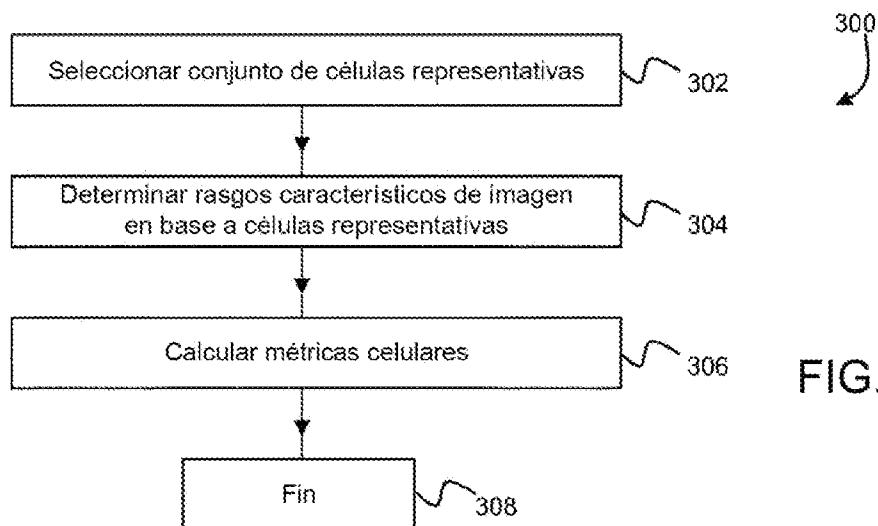


FIG. 3A

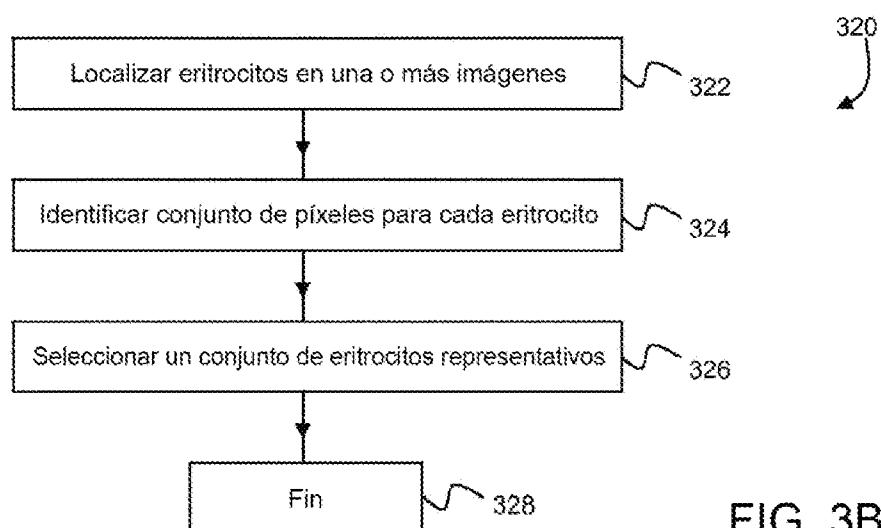


FIG. 3B

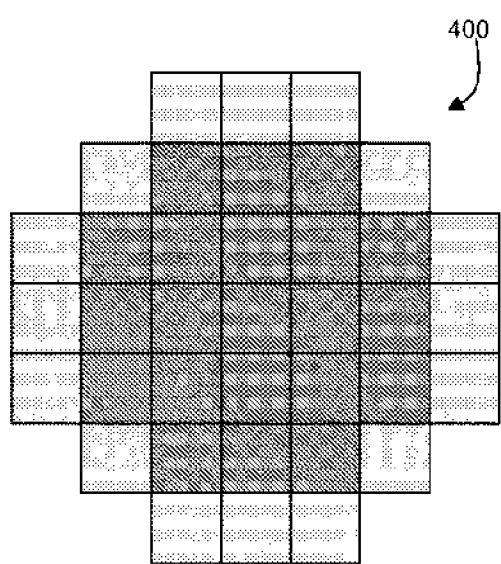


FIG. 4

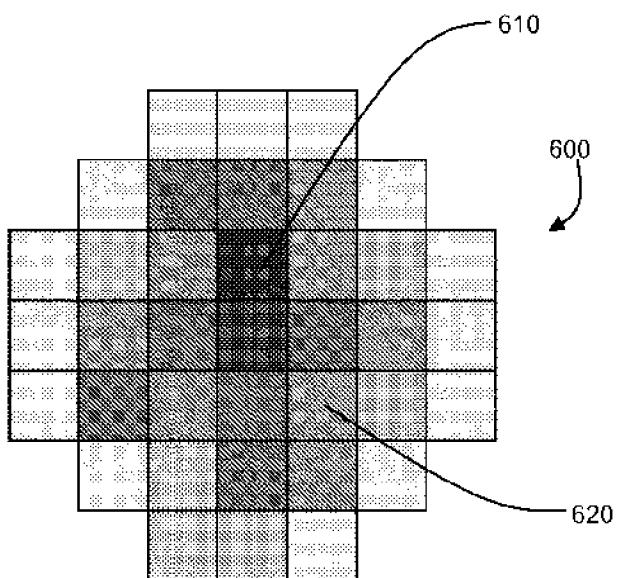


FIG. 6

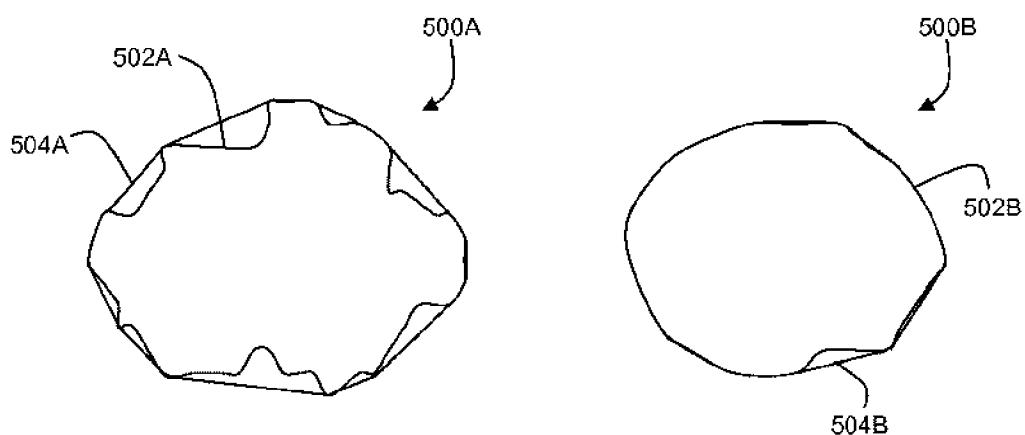


FIG. 5

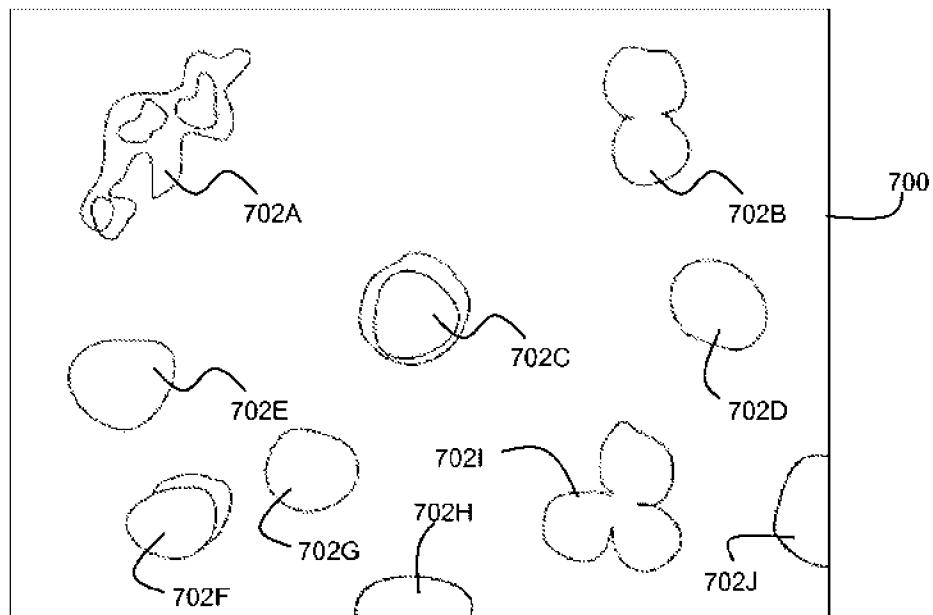


FIG. 7

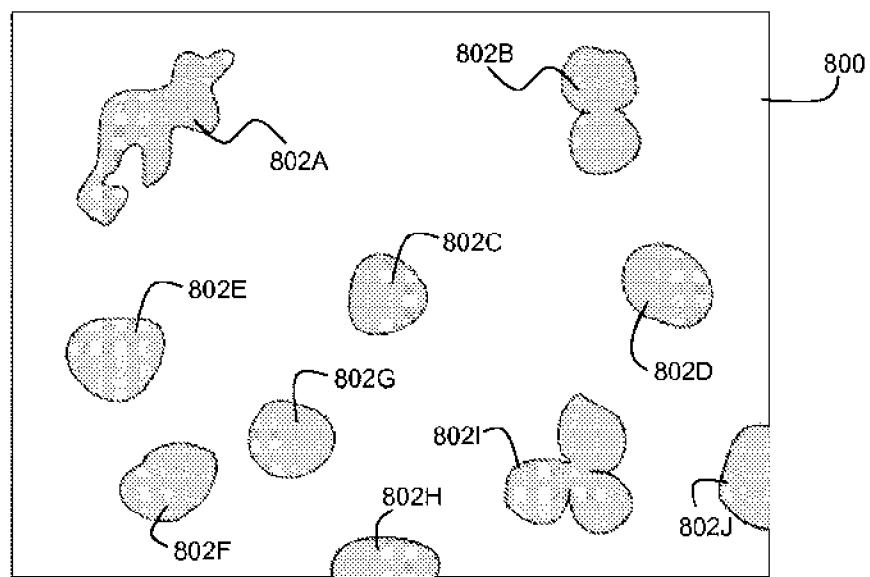


FIG. 8

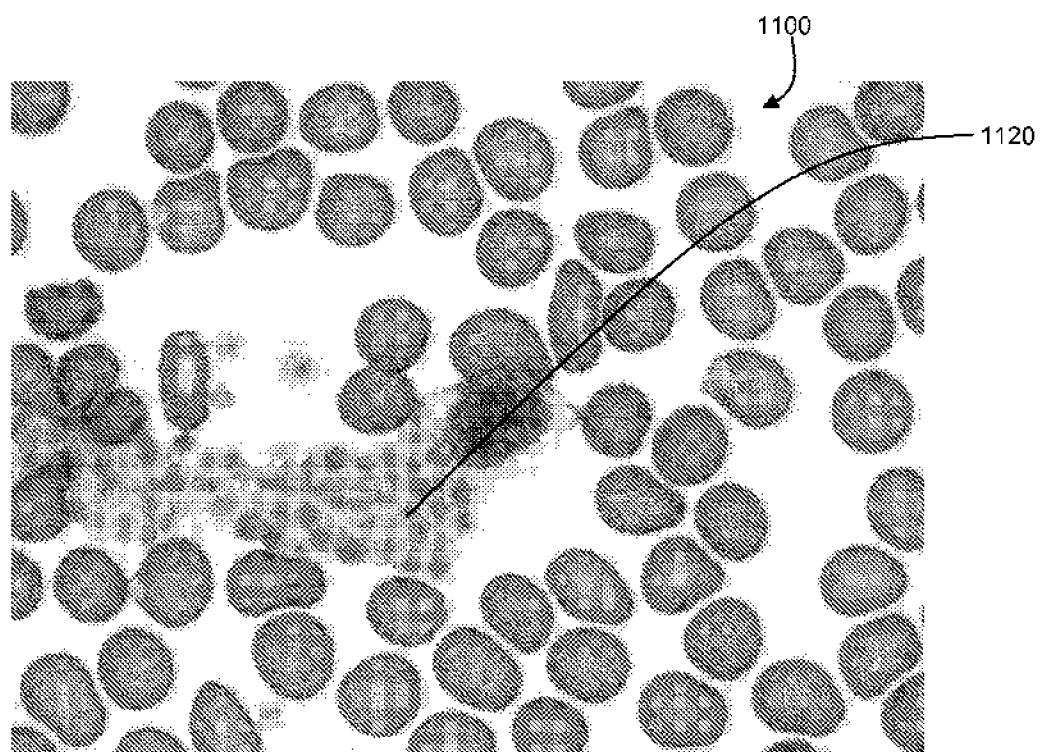


FIG. 9A

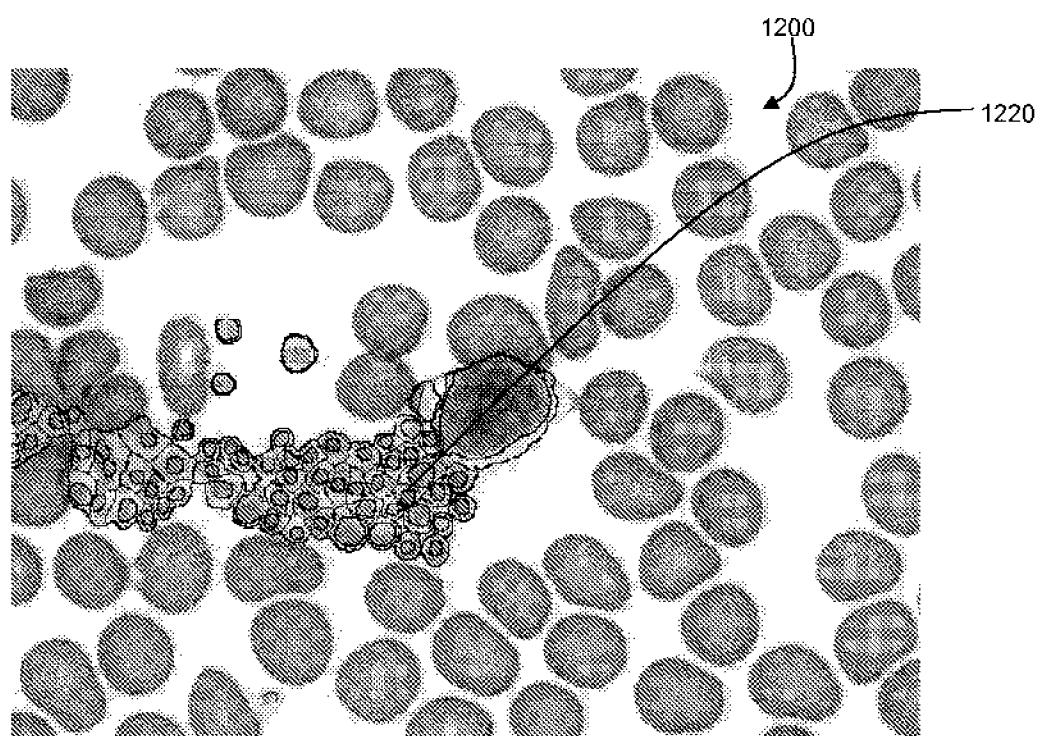


FIG. 9B

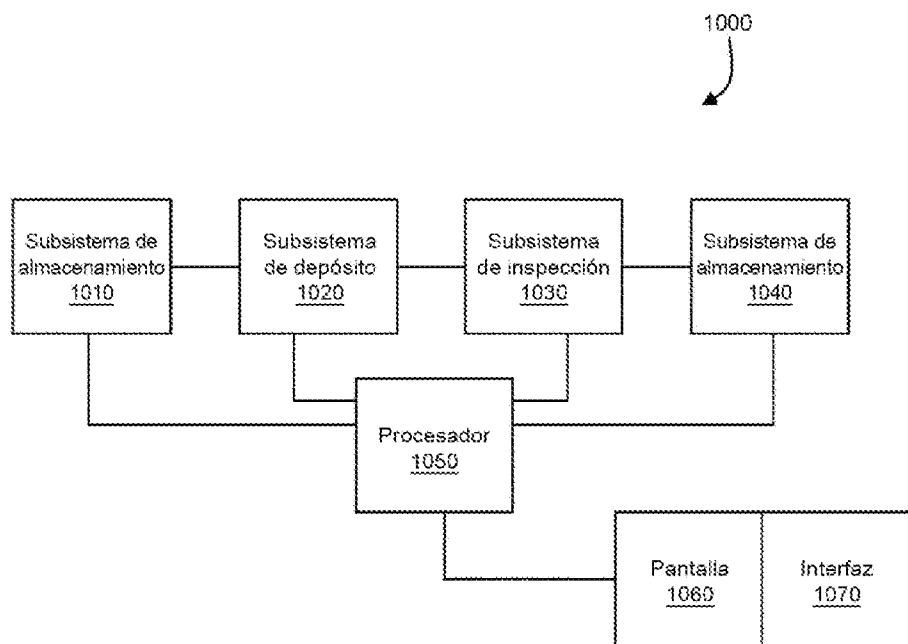


FIG. 10

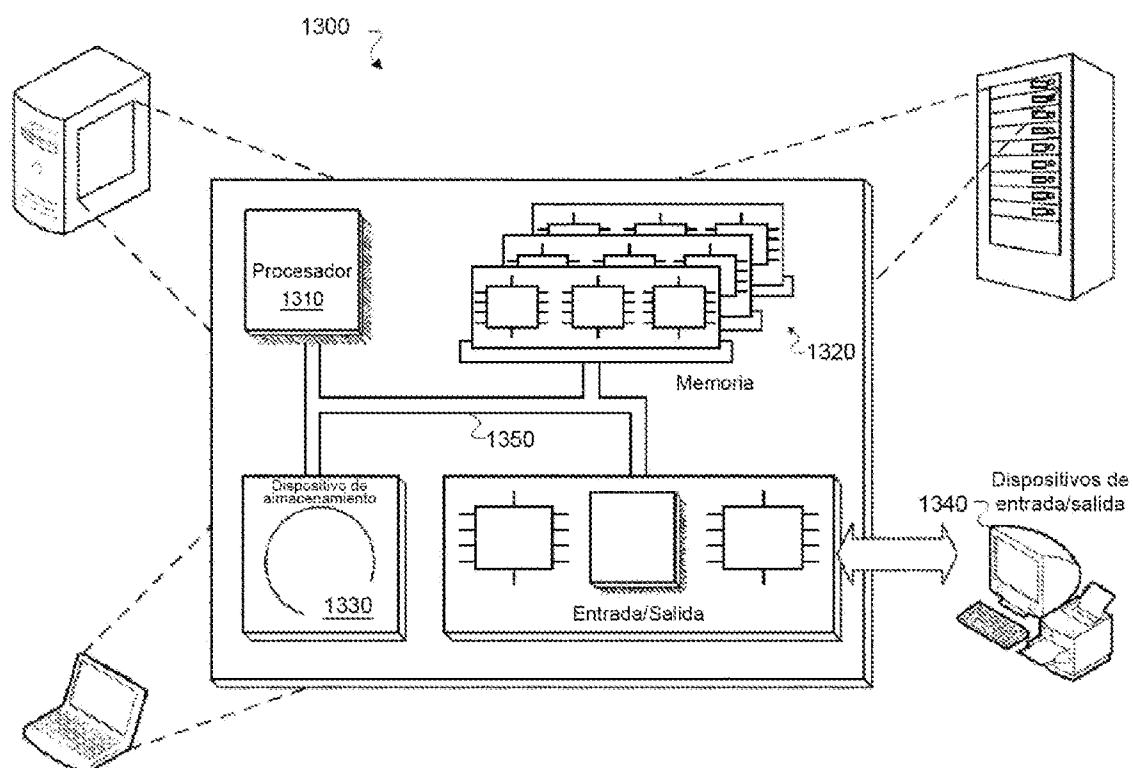


FIG. 11