



* B R P I 0 6 0 9 6 1 0 A 2 *

(51) Int.Cl.:
G01N 15/14 (2010.01)

(57) **Resumo:** DISPOSITIVO ÓPTICO PARA ANÁLISE DO SANGUE, APARELHO DE ANÁLISE EQUIPADO COM O MESMO. A invenção trata de um dispositivo óptico (200) adaptado em particular para a contagem e diferenciação de leucócitos em uma automação de análise de sangue e compreendendo uma fonte de luz tipo LED (201) para iluminar uma amostra de sangue (311) quando flui em um vaso óptico.

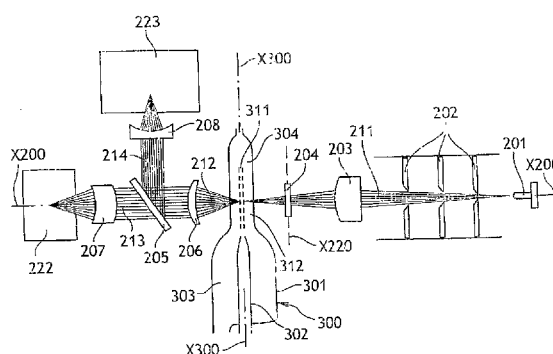
(73) Titular(es): C2 Diagnostics

(72) Inventor(es): LAURENT DAMONNEVILLE, OLIVIER
MAGNIN, SERGE CHAMPSEIX

(74) Procurador(es): Tavares Propriedade Intelectual
Ltda

(86) Pedido Internacional: PCT FR2006000620 de 22/03/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/103332 de 05/10/2006



Relatório Descritivo da Patente de Invenção
“DISPOSITIVO ÓPTICO PARA ANÁLISE DO SANGUE,
APARELHO DE ANÁLISE EQUIPADO COM O MESMO”.

A presente invenção refere-se a um dispositivo
5 óptico para a contagem e diferenciação de leucócitos em um
aparelho automático de análise do sangue e um aparelho de
análise equipado com tal dispositivo.

A análise de uma amostra sangüínea busca
determinar, em geral:

- 10 - o número total de leucócitos;
- mais especificamente, o número de leucócitos
por sub-populações (basófilos, eosinófilos, neutrófilos, monócitos
e linfócitos);
- o número de eritrócitos e de plaquetas; e
- 15 - o nível de hemoglobina.

São conhecidas diversas técnicas de análise, em
particular:

- realiza-se o exame da hemoglobina após a lise
dos eritrócitos, isto é, a destruição da membrana das células de
20 eritrócitos, e por meio da medição, por espectrofotometria, da
hemoglobina liberada no meio; o exame da hemoglobina também
requer a estabilização da hemoglobina em uma forma complexada
(oxiemoglobina ou cianometemoglobina) de modo a medir a
absorvência de um único composto no comprimento de onda
25 apropriado.

- a contagem total de leucócitos é realizada na amostra de sangue por resistividade com lise específica dos eritrócitos e proteção dos leucócitos.

- diferenciação dos leucócitos e de sua
5 contagem por sub-população é realizada.

- por medição volumétrica por resistividade após lise específica dos eritrócitos, proteção dos leucócitos e ajuste do pH; isso no entanto não permite a diferenciação de todas as sub-populações em uma única análise;

10 - ou por meio óptico, em particular, por citometria de fluxo; após lise específica dos eritrócitos e proteção dos leucócitos, por meio da medição de diferentes parâmetros (em particular, difração, fluorescência, absorvência), em um fluxo de leucócitos no eixo geométrico dos ângulos estreito, médio e largo
15 e, opcionalmente, após a adição de um agente de identificação (por exemplo, clorazol negro ou um corante de identificação de DNA ou RNA ou um corante fluorescente) e por meio da medição em diferentes comprimentos de onda; esta técnica permite a diferenciação das sub-populações de leucócitos.

20 - a contagem de eritrócitos e de plaquetas é realizada em uma amostra diluída sem a adição de reagente específico por meio de medição de resistividade.

Existem inúmeros analisadores automáticos de células sangüíneas que utilizam estas técnicas de modo a obter
25 uma análise da amostra de sangue que seja tão completa quanto possível.

Nestes aparelhos automáticos, tradicionalmente coexistem dois circuitos de análise diferentes:

- um primeiro circuito destinado a medir a hemoglobina e/ou a contagem total de leucócitos; e

5 - um segundo circuito destinado a realizar, na amostra de sangue, a diferenciação e/ou a contagem de leucócitos por citometria de fluxo.

Cada circuito é caracterizado por uma taxa de diluição da amostra de sangue adequada para o meio de medição usado, a adição de um ou mais reagentes e meios apropriados para a implementação e medição.

Deste modo, para a medição de hemoglobina e contagem dos leucócitos, o circuito compreende tipicamente um assim chamado tanque de contagem em que a amostra de sangue é diluída, um reagente em particular compreendendo o composto de lise dos eritrócitos, o composto de estabilização do complexo formado a partir da hemoglobina e o composto leuco-protetor é adicionado a ele e a seguir, são medidos diretamente nesta célula: hemoglobina por espectrofotometria e o número de leucócitos por resistividade. A taxa de diluição é escolhida de tal modo que a solução de análise é perfeitamente homogênea e de tal modo que o aparelho de detecção não é saturado. Esta taxa de diluição compreende entre $1/100^\circ$ e $1/500^\circ$, geralmente entre $1/160^\circ$ e $1/180^\circ$.

25 Para diferenciação leucocítica por citometria de fluxo, o circuito utiliza um tanque para diluição da amostra de

sangue ao qual um ou mais reagentes, contendo um agente de lise de eritrócito, opcionalmente um agente de diferenciação (por exemplo, um corante fluorescente de leucócito de DNA ou RNA), são adicionados, então uma fração desta solução é tomada de modo a injetá-la em um tanque óptico de fluxo atravessante de um citômetro de fluxo. A taxa de diluição usada é menor do que 1/100°, permitindo que um tempo de análise ótimo seja obtido com os citômetros atualmente disponíveis no mercado (do tipo hidrofoco).

Assim, convencionalmente, pelo menos dois reagentes diferentes comumente têm que ser usados para os dois circuitos de análise e duas diluições diferentes da amostra de sangue são realizadas nestes dois circuitos de análise.

Os objetivos principais de fabricantes são simplificar os aparelhos automáticos existentes por meio da redução do número de componentes e de reagentes, permitindo a redução dos custos de produção e de manutenção e do tamanho dos aparelhos automáticos, no entanto sem reduzir o tempo de uma análise de amostra de sangue completa.

A presente invenção, em particular, visa a atingir estes objetivos.

O documento WO 2004/003517, para esta finalidade, propõe um método e equipamento em que os dois circuitos de análise têm meios em comum. O princípio é realizar uma primeira diluição da amostra de sangue em um único tanque de diluição e transferir, sucessivamente, frações de volumes

selecionados desta diluição para uma unidade de medição ou de contagem, de modo a, cada vez, medir ou contar elementos diferentes contidos na amostra de sangue. De modo a realizar uma análise completa, a saber, a contagem dos eritrócitos e das plaquetas, a contagem dos leucócitos, a medição da hemoglobina e diferenciação leucocítica, o documento descreve a seguinte solução: usar uma primeira transferência para contar os eritrócitos e plaquetas, adicionar um agente de lise ao tanque de diluição, realizar então uma segunda transferência para contar os leucócitos, realizar uma terceira transferência da solução de diluição que sofreu lise para medir o nível de hemoglobina, adicionar um reagente de diferenciação leucocítica e realizar uma quarta transferência para efetuar a diferenciação leucocítica na unidade de medição.

Este princípio pode permitir o uso de um único assim chamado, tanque de diluição, mas não permite uma economia de tempo de análise porque as medições ou contagem são realizadas sucessivamente após cada transferência de uma fração da diluição. Além do mais, isso requer o controle perfeito dos volumes sucessivos de reagentes e diluentes transferidos para a unidade de medição. Além do mais, isso também requer o uso de diversas seringas e reagentes de lise.

O objetivo da presente invenção também é superar tais inconvenientes.

De acordo com um primeiro objetivo, a presente invenção refere-se a um método para a análise automática de uma

amostra de sangue assim como um mono-reagente e um aparelho para a implementação deste método.

O método, de acordo com a invenção, é caracterizado por:

- 5 - uma solução de análise contendo a dita amostra de sangue, um diluente, e:
 - pelo menos um composto para realizar a lise dos eritrócitos;
 - pelo menos um composto para proteger os
 - 10 leucócitos; e
 - pelo menos um composto para estabilizar a hemoglobina na forma de um complexo cromogênico; é formado em um único tanque de análise e diluição,
 - o nível de hemoglobina é medido nesta
 - 15 solução de análise por meio de espectrofotometria no dito tanque após a lise dos eritrócitos; e
 - uma quantidade apropriada desta solução de análise é tirada do dito tanque, em que uma diferenciação leucocítica é realizada por um meio óptico.

20 A contagem dos leucócitos pode ser realizada juntamente no tanque de análise e/ou com o meio óptico.

 A contagem dos eritrócitos e, opcionalmente, das plaquetas, pode ser realizada, por exemplo, em um estágio anterior do método em uma amostra realizada no tanque de

25 análise e diluição.

Assim, a presente invenção é baseada no conceito de uma única solução de análise usada como está para os dois tipos de análises que, usualmente, eram realizadas em dois circuitos separados, a saber, por um lado, a medição da hemoglobina e, opcionalmente, a contagem dos leucócitos e, por outro lado, a diferenciação leucocítica por meio óptico, sendo que a dita solução de análise combina os compostos “reagentes” capazes de efetuar pelo menos estas análises em virtude de sua natureza e de sua quantidade. Os compostos reagentes introduzidos são escolhidos para serem quimicamente compatíveis entre si e em quantidades adequadas para a análise alvo. Eles podem ser escolhidos a partir dos compostos tipicamente usados na técnica anterior. Também é possível usar uma formulação comercial que seja usada convencionalmente para efetuar uma diferenciação leucocítica, isto é, contendo o composto para realizar a lise dos eritrócitos e o composto leucoprotetor, e adicionar a ele o terceiro composto reagente destinado a estabilizar a hemoglobina na forma de um complexo cromogênico.

Devido a esta solução de análise simples, a presente invenção tem, em particular, as seguintes vantagens:

- o aparelho automático pode compreender um único tanque para a preparação da solução de análise,
- a medição da hemoglobina pode ser realizada diretamente neste tanque e também a contagem global dos leucócitos por medição da resistividade da solução de análise;

- é possível usar um mono-reagente combinando todos os compostos “reagentes” necessários para a medição da hemoglobina e para a diferenciação leucocítica por meio óptico; isso, em particular, permite a simplificação dos circuitos
5 hidráulicos, conforme será visto abaixo;

- uma mono-diluição da amostra de sangue pode ser realizada diretamente no tanque de análise e diluição simples, com uma taxa de diluição determinada como uma função dos meios de medição e detecção usados. O mono-reagente pode
10 servir como um diluente para realizar esta mono-diluição. De preferência, uma taxa de diluição será escolhida entre $1/100^\circ$ e $1/500^\circ$, correspondendo à taxa de diluição requerida para uma medição do nível de hemoglobina, de preferência, também uma taxa de aproximadamente $1/175^\circ$ ($1/173^\circ$ na modalidade dada
15 abaixo).

Com a possibilidade de usar uma mono-diluição e um mono-reagente, é possível, conseqüentemente, graças a este primeiro aspecto da invenção, simplificar bastante o equipamento de análise enquanto ainda se proporciona uma análise completa da
20 amostra de sangue.

Meios para medição óptica que permitem uma análise dos leucócitos (contagem e diferenciação por subpopulações) a uma taxa de diluição maior do que $1/100^\circ$ também são propostos, de acordo com a invenção, e são definidos e
25 descritos abaixo.

A presente invenção também propõe um mono-reagente de lise para a implementação do método de acordo com a invenção, caracterizado pelo fato de compreender:

- 5 - pelo menos um composto para realizar a lise dos eritrócitos;
- pelo menos um composto para proteger os leucócitos; e
- pelo menos um composto para estabilizar a hemoglobina na forma de um complexo cromogênico.

10 Tal mono-reagente permite a medição, por espectrofotometria, da concentração de hemoglobina de uma amostra de sangue e uma diferenciação de leucócito por meios ópticos. Ele também permite a contagem resistiva e/ou óptica dos leucócitos. De preferência, ele é escolhido de modo a permitir a
15 diferenciação de pelo menos 5 sub-populações. De preferência, ele é escolhido de tal modo que não contenha cianetos.

 De acordo com a invenção, o composto para realizar a lise dos eritrócitos é constituído, de preferência, por pelo menos um tenso-ativo catiônico. Em uma maneira
20 preferencial, que é conhecida por si, ele é escolhido de modo a formar um complexo de oxiemoglobina (já que ele é não tóxico em comparação com um complexo de cianometemoglobina, que envolve íons de cianeto). O tenso-ativo catiônico, conseqüentemente, também é escolhido de tal modo que ele oxide
25 a hemoglobina liberada para formar apenas um complexo de oxiemoglobina. A quantidade de tenso-ativo catiônico é

escolhida, conseqüentemente, de modo a realizar eficientemente a hemólise dos eritrócitos e oxidar a hemoglobina liberada. Ele é escolhido, de preferência, a partir de:

- sais de amônia quaternária, de preferência, sais de alquiltrimetilamônia e, ainda mais particularmente, brometos e cloretos de cetil-, dodecil-, tetradecil- e hexadeciltrimetilamônia;
- sais de piridínio;
- aminas etoxilatadas de cadeia longa; e
- alquil sulfatos (SDS).

O composto leuco-protetor, de acordo com a invenção, é um composto que retarda ou impede a destruição dos leucócitos. De preferência, é um tenso-ativo não iônico ou anfótero escolhido, de preferência, a partir de:

- álcoois etoxilados, em particular, 2-fenoxietanol, polioxietilenalquilfenileteres, tais como os produtos comerciais IPEGAL 990®, TERGITOL NP9®, TRITON® X100 ou X114, plurafac® A 38 ou Brij35®;

- betaínas e sulfobetaínas de amônias quaternárias, em particular, lauramidopropil betaína (LAB) e dodecildimetil-3-amônio-1-propanosulfonato (DDAPS) ou tetradecildimetil-3-amônio-1-propanosulfonato (TDAPS);

- óxidos de amina terciária, tais como sulfonato de N,N-dimetilaurilamina-N-óxido (LDAO) ou 3-[(colamidopropil)-dimetilamina-]1-propano (CHAPS ou CHAPSO);

- compostos do tipo glicosídico e, mais particularmente, um triterpeno saponina;

- compostos do tipo glucídico (manitol, D-glucose, trealose, sulfato de dextrano).

5 O composto que estabiliza a hemoglobina na forma de um complexo cromogênico é escolhido, de preferência, a partir de:

- quelatos mono ou polidentatos que apresentem formas ligantes (pares não aglutinantes: O, N, S e grupos carbóxi
10 COO-) em particular:

• ácido etileno diamina tetra-acético (EDTA) ou ácido etileno glicol-bis-(3-aminoetiléter)N-N'-tetra-acético (EGTA) e, em particular, seus sais de sódio ou di-potássio;

• oxalato de potássio $K_2O_xO_x = C_2O_4^{2-}$;
15 • sais de hidroxilamina (de preferência, hidrocloreto); e

• ácidos orgânicos (em particular, fórmico ou acético).

- os compostos aromáticos (quelatos mono ou
20 polidentatos) compreendendo átomos ligantes (tendo pares não aglutinantes: O, N, S, etc.), em particular:

• Tiron®

• 8-hidroxiquinolina e seus derivados;

• piridina ou bi-piridina e seus derivados;

25 • 1,10-fenantrolina e seus derivados;

• os compostos fenólicos (mono ou bis e seus derivados);

• pirazol e/ou as pirazolonas e seus derivados;

• imidazol e seus derivados

5 • ácido sulfosalicílico; e

- saponinas, óxidos de amina terciária, betaínas e sulfobetaínas de amônias quaternárias (tais como DDAPS, TDAPS, LAB).

Em adição aos três compostos definidos de acordo com a invenção, é possível adicionar ao(s) mono-reagente(s):

- pelo menos um corante (ou mistura) que identifique especificamente certos leucócitos e, mais particularmente, eosinófilos (ou basófilos), de modo a permitir a distinção de pelos menos 5 sub-populações principais de leucócitos, escolhidos a partir de:

• cianinas;

• Oxazine 750;

• reagentes de Wright e Romanowsky;

20 • DAPI;

• Clorazol negro E;

• azul de toluidino;

• Astra Azul;

• tiazol laranja G ou azul;

25 • outros reagentes fluorescentes.

- pelo menos um agente de fixação que permita o endurecimento da membrana dos leucócitos, que, de preferência, é um aldeído e, mais particularmente, glutaraldeído ou formaldeído;

5 - pelo menos um agente de molhamento de modo a otimizar os fluídicos e impedir a formação de bolhas que também agem como solubilizantes dos fragmentos, escolhido a partir de:

- álcoois (metanol etanol ou propan-2-ol);
- 10 • glicóis (etileno ou propileno glicol);
- glicóis etoxilados (particularmente Triton X100® ou Brij35®;
- compostos glicosídicos TWEEN80® ou TWEEN20®;

15 a concentração do agente de fixação e do solubilizante sendo estritamente limitada, já que um excesso pode impedir a lise dos eritrócitos e modificar as propriedades ópticas dos leucócitos; e

- um sistema tampão para ajustar o pH entre 5,0 e 10,0 e, de preferência, entre 6,0 e 8,0 e se aproximar otimamente da neutralidade ($7,0 \pm 0,4$). A escolha de tal pH visa a respeitar as condições nativas das células. Além do mais, este pH permite uma melhor dissolução dos constituintes usados de acordo com a invenção. O dito tampão é constituído por um par

de sais (inorgânicos ou orgânicos) ajustados ao pH mencionado acima por ácido clorídrico ou soda (4-6N), escolhido a partir de:

- fosfato di-hidrogenado/fosfato hidrogenado de sódio ou potássio $\text{H}_2\text{PO}_4/\text{HPO}_4^{2-}$;

5 • carbonato hidrogenado de sódio/carbonato $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$

- um tampão de ácido cítrico/citrato de sódio (III)

- TRIS-HCl

10 • trietanolamina (TEA)

- imidazol

- um ácido escolhido a partir de:

- ácidos orgânicos: ftálico, sulfosalicílico ou fórmico, que também contribuem para a formação e estabilização

15 do complexo cromogênico da hemoglobina; e

- ácidos minerais: HCl , H_3PO_4 etc.

- um sal fundamental que assegure uma condutividade da ordem de 10 a 50 ms/cm requerida para a medição de resistividade e uma osmolaridade da ordem de 120 a

20 500 mOsm e, de preferência, perto da isotonicidade ($290 \pm$), escolhido a partir de:

- cloreto de sódio NaCl ;

- cloreto de potássio KCl ;

- cloreto de magnésio MgCl_2 ;

25

- cloreto de cálcio CaCl_2 ;

- sulfato de sódio anidro Na_2SO_4 ;

sendo que este sal fundamental é capaz de estar compreendido no sistema tampão;

- pelo menos um conservante, tendo
- 5 propriedades anti-oxidantes e/ou antibióticas, escolhido a partir de:

- 2-fenoxietanol;
- parabenos;
- BHT;
- 10 • isotiazolonas (Proclin® 150 ou 300);
- imidazol ou derivados de uréia;
- antibióticos;

- um composto de penetração celular antibiótico natural (ionóforo) que também facilite a penetração do corante ou
- 15 corantes, escolhido a partir de:

- ionóforo I para NH_4^+ (nonatina);
- ionóforo III para Ca^{2+} (calcimicina);
- ionóforo para Cl^- ;
- ionóforo I para K^+ (valinomicina).

20 Os constituintes, de acordo com a invenção, são resumidos na tabela abaixo, assim como faixas de concentrações apropriadas

Constituinte	Quantidade
Tensoativo	0,1 – 50
catiônico (agente de lise)	g/L

Tenso-ativo leuco-protetor	0,1 – 20 g/L
Quelato do complexo hemoglobina	0,0001 – 10 g/L
Corante	0,01 – 1 g/L
Agente de fixação	0,01 – 2% w/v
Agente de molhamento	0 – 50% v/v
Tampão	0 – 6 g/L
Sal fundamental	1 – 50 g/L
Ácido	Quantidade apropriada para ajustar o pH
conservante	Quantidade apropriada 0,1 – 3 g/L
Ionófero	Quantidade efetiva 0 – 200 mg/L
Água destilada qsf	Qsf 1 L

A presente invenção também propõe um aparelho para a implementação do método de acordo com a invenção, que é caracterizado por:

- um tanque de análise que é capaz de receber a dita solução de análise;

- um meio para medir o nível de hemoglobina presente na dita solução de análise por espectrofotometria no dito
5 tanque;

- um meio para fazer amostra da dita solução de análise;

- um meio para medição óptica na dita amostra de modo a produzir uma análise de leucócito.

10 De acordo com um segundo objetivo, a presente invenção refere-se a um dispositivo óptico para um aparelho automático para a análise automática de uma amostra de sangue, particularmente vantajosamente também para a implementação do método de acordo com o primeiro objetivo da invenção.

15 Conforme foi mencionado acima, certas sub-populações de leucócitos só podem ser diferenciadas por medições ópticas, por exemplo, uma medição da difração pela célula em um ou mais ângulos ou uma medição da absorvência da célula. Os sistemas ópticos para caracterização de uma célula
20 sangüínea têm uma base comum em que uma fonte de luz está localizada emitindo um feixe de luz, um tanque óptico em que as células sangüíneas cruzam o feixe de luz, um sistema para ajuste do feixe de luz ao fluxo de células e meios para a medição da luz originária do tanque óptico após a interceptação pelas células. Em
25 particular, no caso de caracterização de leucócitos, os leucócitos se movem em um fluxo no tanque. Eles são iluminados ali por um

feixe de luz focado sobre o fluxo, que é chamado fluxo de amostra.

Tais dispositivos são dispendiosos: em particular, os lasers usados como fontes de luz, que também são volumosos e geralmente requerem um sistema de dissipação térmica; os diodos de luz, como os lasers, requerem sistemas de alinhamento caros. Os feixes de luz emitidos por estas fontes têm uma distribuição transversal de luz que tem formato aproximadamente Gaussiano. Deste modo, a intensidade é apenas aproximadamente constante e máxima em uma parte estreita e central do raio. Os sistemas de alinhamento permitem que esta parte central esteja alinhada com o fluxo de amostra. Além do mais, a largura do fluxo de amostra não pode exceder aquela desta parte central, e quanto mais próximas estas duas larguras forem, maior tem que ser a precisão do sistema de alinhamento. Como resultado, é necessário reduzir a largura do fluxo de amostra tanto quanto possível.

O fluxo de amostra que contém as células sangüíneas a serem contadas e/ou a serem diferenciadas, tem que ser mais estreito quanto mais focada for a luz. Deste modo, é usado um fluxo em que a largura da seção é menor do que 50 μm , que tem que cruzar o feixe de luz que, em si, está focado em um feixe estreito com uma seção maior do que aquela do fluxo de amostra. Isso requer um sistema particularmente preciso e, conseqüentemente, caro, para a injeção do fluxo dentro do tanque óptico. Na técnica anterior, tal resultado é obtido usando um

sistema tipo hidrofoco (abreviação da expressão em inglês “foco hidro-dinâmico”). O fluxo de amostra é circundado por um fluxo envolvente. Um injetor para o fluxo de amostra é imerso no centro do fluxo envolvente. O fluxo de amostra assim criado é
5 alargado ou focado conforme ele se desloca a partir do injetor até a zona iluminada pelo feixe de luz, de tal modo que ele tem, neste ponto, uma largura desejada de aproximadamente 5 a 50 μm de diâmetro. Às vezes, é necessário um envoltório simples ou duplo de modo a atingir este objetivo.

10 Além do mais, conforme mencionado anteriormente, dado o nível de precisão requerido, um sistema de ajuste é essencial de modo que o fluxo de células seja coincidente com o feixe de luz. São possíveis duas abordagens: o fluxo de células ou o feixe de luz pode ser movido. Caso se escolha mover
15 o fluxo de células sangüíneas, toda a unidade de tanque óptico tem que ser movida. Quando esta opção é adotada, o tanque é montado sobre uma mesa de translação que assegura um movimento preciso e uniforme ao longo de dois eixos devido a seus mancais esféricos. Tal conjunto mecânico de precisão é
20 bastante caro. Também é possível mover o feixe de luz de modo a torná-lo coincidente com o fluxo de células sangüíneas. Isso geralmente é conseguido usando diversos prismas ajustáveis. Esta solução, que combina elementos ópticos com mecânica de precisão, também envolve altos custos.

25 Além do mais, quando ela cruza o feixe de luz, a célula de sangue deflete a trajetória dos raios de luz. A

intensidade e o ângulo dos raios defletidos permitem que sejam obtidas informações sobre o tipo de célula. Duas faixas de ângulos são geralmente usadas: ângulos estreitos menores do que dez graus com relação ao eixo geométrico óptico e ângulos largos aproximadamente perpendiculares ao eixo geométrico óptico. Na faixa dos ângulos estreitos, dois itens de informações são úteis: as perdas no eixo e a difração. Perpendicular ao eixo geométrico óptico, geralmente são medidas a difusão e a fluorescência. Para as duas faixas de ângulos, a luz, conseqüentemente, tem que ser distribuída em dois canais diferentes. Geralmente, isso é conseguido com espelhos dicróicos ou com filtros de interferência. Os componentes ópticos são ambos produzidos por meio da deposição de películas finas sobre um substrato de vidro. Eles têm boa eficiência, mas existe uma grande disparidade entre um filtro e um outro e seu tempo de vida é limitado. Logo, eles têm que ser regularmente substituídos.

Todos estes dispositivos geralmente volumosos também são frágeis e requerem manutenção, o que também é muito caro. Tais dispositivo, por conseguinte, são muito restritos a laboratórios analíticos que são grandes o suficiente para serem capazes de investir em tais aparelhos automáticos.

A finalidade da invenção é propor um dispositivo para diferenciação leucocítica e/ou contagem de leucócitos que seja mais simples e mais econômico tanto para produzir quanto para manter, permitindo o uso de aparelhos automáticos equipados com o dispositivo, por laboratórios

menores, ao mesmo tempo em que mantêm qualidade de medição adequada.

De acordo com o segundo objetivo da invenção, um dispositivo óptico para a contagem e/ou diferenciação de leucócitos em um analisador sanguíneo automático é proposto, 5 caracterizado pelo fato de compreender uma fonte de luz do tipo diodo eletroluminescente, de modo a iluminar uma amostra de sangue que circule no tanque óptico, de acordo com um eixo de injeção, usando um feixe de luz fonte. Tal diodo permite que seja 10 obtido um feixe de luz que é mais homogêneo na largura de sua seção e, conseqüentemente, com uma zona de leitura maior e mais homogênea.

De preferência, o diodo emite luz cujo comprimento de onda é menor do que 600 nanômetros, e ainda 15 mais preferivelmente, menor do que 500 nanômetros. Tal comprimento de onda permite uma eficiência de difração melhor, conseqüentemente, melhor precisão para medições que usem difração.

Além do mais, a largura do feixe emitido pelo 20 dispositivo óptico, isto é, o feixe fonte que ilumina o fluxo de amostra, está compreendida, vantajosamente, entre 50 e 200 microns (μm), próximo ao eixo de injeção, o que permite a iluminação de um fluxo de amostra mais largo, ao mesmo tempo em que permite precisão adequada nas medições realizadas. 25 Ainda mais vantajosamente, esta largura está compreendida entre

90 e 120 microns. Tal largura de fluxo é permitida, em particular, pelo uso de diodos eletroluminescentes.

De preferência, o feixe de luz fonte é emitido aproximadamente na direção do tanque, aproximadamente transversalmente à direção de fluxo da amostra. Uma lâmina transparente, projetada de tal modo que o feixe fonte passe através dela, entre duas superfícies opostas, que é montada de maneira rotativa e disposta entre o diodo e o tanque, pode permitir que o feixe de luz seja movido em uma direção transversal, graças à sua dupla refração quando passa através da lâmina. A rotação da lâmina permite a modificação do ângulo de incidência do feixe sobre a lâmina e, assim, o ajuste do valor do desvio transversal. De preferência, a lâmina transparente é montada de maneira rotativa em torno de um eixo que é aproximadamente paralelo ao movimento da amostra de sangue no tanque.

Além do tanque óptico, é vantajosamente usado um meio para separação, por perdas de Fresnel, para um feixe de luz resultante incidente que tem origem no feixe de luz fonte, separando assim o dito feixe em um feixe axialmente resultante e pelo menos um feixe resultante da perda constituída por perdas de Fresnel, ao mesmo tempo em que passa através do meio de separação. O meio de separação compreende pelo menos uma superfície de separação que é uma superfície em um material de separação transparente, o feixe axial tendo passado através do material transparente e o feixe tendo origem nas perdas de Fresnel refletidas pela superfície de separação, sendo que a dita superfície

é inclinada com relação ao feixe de luz além do tanque. Uma única lâmina de vidro barata pode servir como um meio de separação. Além do mais, ela tem tempo de vida virtualmente ilimitado e livre de manutenção, ao contrário de espelhos dicróicos ou filtros de interferência.

O dispositivo também pode compreender um aparelho para a medição da luz do feixe axialmente resultante e pelo menos um outro aparelho para medir a luz de pelo menos um feixe tendo origem nas perdas de Fresnel. Estes aparelhos de medição podem compreender, em particular, meios para a medição da fluorescência, das perdas de luz perto do eixo ou da difração perto do eixo. Podem compreender também meios para medir a difração do feixe de luz em ângulos largos pela amostra no tanque. À guisa de exemplo, estes ângulos largos podem ser ângulos compreendidos entre 60° e 150° .

O dispositivo também pode compreender, na trajetória do feixe à frente do tanque, pelo menos um diafragma que bloqueie luz espúria.

A invenção também se refere a um aparelho de hematologia, em particular, um analisador de sangue automático equipado com tal dispositivo.

De acordo com um terceiro objetivo, a presente invenção também se refere a um tanque óptico de passagem de fluxo para um dispositivo óptico adequado para a contagem e diferenciação de leucócitos, por exemplo, um citômetro de fluxo, assim como a um aparelho de análise equipado com tal tanque. O

objetivo da invenção é propor um tanque que seja mais simples e mais econômico tanto para produzir quanto para manter, permitindo o uso de aparelhos automáticos equipados com este tanque por laboratórios menores, ao mesmo tempo em que
5 mantém qualidade de medição adequada.

De acordo com a invenção, um tanque de passagem de fluxo para um dispositivo óptico para a contagem e diferenciação de leucócitos em um analisador sangüíneo automático, é caracterizado pelo fato de que, em uma zona de
10 análise do tanque, a seção do tanque tem pelo menos uma dimensão transversal compreendida entre 1 e 5 milímetros. Esta seção pode ser aproximadamente retangular e a direção transversal pode ser medida em um e/ou no outro lado do retângulo.

15 Tal tanque pode ser produzido assim, pelo menos parcialmente, a partir de um material plástico injetado. Tal tanque é produzido de uma maneira particularmente vantajosa em comparação com os tanques da técnica anterior, geralmente formados de paredes de quartzo montadas por colagem.

20 O tanque também pode compreender pelo menos uma lente moldada em uma peça com o tanque. Esta pelo menos uma lente pode compreender uma lente destinada a ser disposta lateralmente com relação a um eixo óptico. Também pode compreender uma lente semi-esférica.

25 O tanque pode compreender, ao longo de um eixo geométrico óptico, uma janela para a introdução de um feixe

de luz e uma janela para o feixe sair. Pelo menos uma janela pode ser moldada em uma peça com o tanque e/ou ser uma inserção em um material transparente, por exemplo, quartzo ou vidro.

Vantajosamente, o tanque pode compreender
5 um injetor para um fluxo de amostra e um meio para formar um fluxo envolvente em torno do fluxo de injeção. O injetor pode compreender um orifício de saída cujo diâmetro está compreendido entre 20 microns e 150 microns, permitindo que
10 seja obtida um fluxo de amostra que é notadamente maior do que os fluxos da técnica anterior. Em contraste aos dispositivos da técnica anterior, não é o fluxo envolvente que dita a largura do
fluxo de amostra por estiramento, mas o formato e a direção da saída do injetor. Conseqüentemente, o fluxo envolvente não desempenha um papel ativo, mas meramente um papel passivo,
15 em particular, por exemplo, para centralizar o fluxo de amostra em um tanque largo.

De acordo com uma primeira modalidade, este injetor pode ser formado em uma peça em um material mais ou menos rígido. Este material pode ser, por exemplo, um aço
20 inoxidável, uma cerâmica, rubi sintético ou um material plástico ou diversos destes materiais.

De acordo com uma segunda modalidade, este injetor pode compreender um tubo estrutural rígido, por exemplo, feito de metal, por exemplo, feito de aço inoxidável e, dentro do
25 tubo estrutural, um tubo plástico de revestimento terminando em um bocal formado em uma peça com o tubo de revestimento. O

material plástico do injetor pode ser um politetrafluoroetileno, que permite que a amostra circule mais facilmente no tubo e reduza o risco de estragar.

A invenção também se refere a um injetor para
5 um tanque, de acordo com a invenção, injetor este que é produzido de acordo com uma destas modalidades.

A invenção também se refere a um aparelho de hematologia, em particular um analisador sangüíneo automático, equipado com um tanque de acordo com a invenção.

10 De acordo com um quarto objetivo, a presente invenção também se refere a um dispositivo hidráulico para um aparelho de análise hematológica que seja mais simples e mais econômico tanto de produzir quanto de manter e que permita o uso de aparelhos automáticos, equipados com tal dispositivo, por
15 laboratórios menores, ao mesmo tempo em que mantém uma qualidade de medição adequada. A presente invenção também se refere a um método de análise adequado para tal dispositivo.

A presente invenção, deste modo, propõe um dispositivo hidráulico para um aparelho de análise sangüínea, em
20 particular um aparelho automático, compreendendo um meio para injetar, sob pressão, um fluxo de amostra em um tanque óptico de passagem de fluxo e para criar um fluxo envolvente de líquido em torno do fluxo de amostra, com um líquido envolvente, caracterizado pelo fato de compreender um meio para ajustar uma
25 taxa de fluxo do fluxo de amostra com relação à taxa de fluxo do

líquido envolvente. Tal ajuste pode tornar possível manter fluxos homogêneos e aproximadamente não turbulentos no tanque.

O meio de injeção pode compreender seringas, um circuito hidráulico e válvulas solenóides. Estes meios podem
5 compreender meios para a injeção da amostra sob pressão com relação ao fluxo envolvente.

Este dispositivo pode, vantajosamente, compreender um meio para formar um pistão para a amostra injetada com um líquido de deslocamento. Tal líquido de
10 deslocamento torna possível usar apenas uma pequena amostra suficiente para a análise, o resto do líquido requerido para a injeção sendo um líquido disponível no aparelho de análise e não tão precioso quanto a amostra.

O envoltório é particularmente útil quando se
15 usa um tanque com uma seção larga ao mesmo tempo em que se mantém uma pequena seção para o fluxo de amostra. Como um dos meios para ajustar o fluxo de amostra em relação ao fluxo envolvente, o dispositivo pode compreender, vantajosamente, um meio para ajustar uma taxa de fluxo do líquido de deslocamento
20 com relação à taxa de fluxo do líquido envolvente. O meio de ajuste pode compreender um meio para uma queda de pressão em um circuito derivado para o líquido de deslocamento e/ou uma queda de pressão em um circuito derivado para o líquido envolvente. Por exemplo, o meio de queda de pressão pode ser
25 escolhido a partir de um comprimento conhecido de um tubo

calibrado, uma resistência hidráulica fixa e uma resistência variável.

O dispositivo hidráulico pode compreender apenas uma motorização, por exemplo, um motor elétrico
5 simples, para gerar o fluxo de amostra e o fluxo envolvente simultaneamente. Além do mais, pode compreender pelo menos duas seringas para gerar o fluxo de amostra e o fluxo envolvente, os pistões da seringa sendo formados firmemente presos um no outro. Assim, eles têm um movimento comum e os fluxos de
10 amostra e envolvente são, certamente, simultâneos.

Em particular, um tanque hidrofoco da técnica anterior pode ser usado com um circuito, tal conforme descrito anteriormente, de acordo com a invenção, sendo que a injeção da amostra neste tanque pode acontecer sem pressão com relação ao
15 fluxo envolvente.

De acordo com a invenção, um método para a análise de uma amostra de sangue em um citômetro de passagem de fluxo também é proposto, caracterizado pelo fato de que uma amostra de sangue é injetada, opcionalmente sob pressão, em um
20 tanque de passagem de fluxo do citômetro, a amostra formando um fluxo de amostra lá e um fluxo envolvente líquido é criado em torno do fluxo de amostra, com um líquido envolvente, caracterizado pelo fato de que a taxa de fluxo do fluxo de amostra é ajustada com relação à taxa de fluxo do líquido envolvente.

25 Em particular, é possível introduzir a amostra em um ramal de injeção de um circuito hidráulico e introduzir a

montante da amostra no ramal de injeção, um líquido de deslocamento, sendo que o líquido de deslocamento serve para empurrar a amostra durante sua injeção no tanque. Este líquido de deslocamento pode ser escolhido a partir de um reagente e de um
5 diluente, de preferência um reagente. Conseqüentemente, não existe razão em proporcionar outro líquido que não aquele que seja estritamente necessário para a preparação da amostra com vistas a sua análise ou análises.

Também é possível criar em torno do fluxo de
10 amostra no tanque, um fluxo envolvente com um líquido envolvente. Este líquido envolvente também pode ser escolhido a partir de um reagente e um diluente, de preferência, um diluente. Neste caso, não existe razão em proporcionar um outro líquido que não aquele que seja estritamente necessário para a preparação
15 da amostra com vistas a sua análise ou análises.

No caso em que é usado um método hidrofoco ou um tanque, de acordo com o terceiro objetivo da invenção, é vantajoso ajustar a taxa de fluxo do líquido de deslocamento com relação à taxa de fluxo do líquido envolvente, por exemplo, por
20 meio da introdução de uma queda de pressão em um circuito derivado para um líquido de deslocamento e/ou meio de queda de pressão em um circuito derivado para um líquido envolvente.

Em um método de acordo com a invenção, em particular para um tanque de acordo com o terceiro objetivo da
25 invenção, pode-se facilmente proporcionar que a amostra de sangue tenha uma taxa de diluição de pelo menos 1/100°. Na

verdade, em tal método, a amostra pode ser introduzida sob pressão com relação ao líquido envolvente, no tanque, a uma velocidade maior do que aquela dos métodos da técnica anterior e com larguras de seção maiores para o fluxo de amostra no tanque.

5 Assim, sem aumentar o tempo de análise, para uma diferenciação e uma contagem dos leucócitos, pode ser usada uma taxa de diluição que seja idêntica àquela usada convencionalmente para a medição de hemoglobina, em particular taxas de diluição compreendidas entre $1/100^\circ$ e $1/500^\circ$, particularmente entre $1/160^\circ$ e $1/180^\circ$.

10 A invenção também se refere a um aparelho de hematologia, em particular um aparelho automático de análise de sangue, caracterizado pelo fato de compreender um dispositivo hidráulico de acordo com a invenção.

A presente invenção será melhor compreendida
15 e outras vantagens se tornarão aparentes à luz da descrição a seguir das modalidades, descrição esta que é feita com referência aos desenhos anexos em que:

- a Figura 1 ilustra, de maneira diagramática, um exemplo de equipamento de acordo com o primeiro objetivo
20 da invenção;

- as Figuras 2a-2e são gráficos de testes de linearidade da medição de hemoglobina por espectrofotometria de acordo com o método da invenção;

- as Figuras 2f-2i são cito-gráficos
25 correspondentes;

- a Figura 3 é uma vista diagramática de um aparelho automático para a análise de uma amostra de sangue usando um dispositivo hidráulico de acordo com o quarto objetivo da presente invenção;

5 - a Figura 4 é uma vista longitudinal diagramática de uma unidade de dispositivo óptico de acordo com o segundo objetivo da invenção;

 - a Figura 5 é uma vista longitudinal diagramática mais detalhada do dispositivo óptico da Figura 4, em
10 um plano perpendicular àquele da Figura 4;

- a Figura 6 é uma vista em perspectiva de um tanque óptico de acordo com o terceiro objetivo da invenção;

 - a Figura 7 é uma vista em seção longitudinal de uma primeira modalidade de um injetor para um tanque óptico
15 de acordo com a invenção;

- a Figura 8 é uma vista em seção longitudinal de uma segunda modalidade de um injetor para um tanque óptico de acordo com a invenção;

 - a Figura 9 é uma vista em seção longitudinal
20 de uma extremidade do injetor da Figura 8;

- a Figura 10 é uma vista em seção longitudinal de um tanque ilustrando um método da técnica anterior para injetar a amostra de sangue no tanque; e

 - as Figuras 11a-11c são gráficos que ilustram
25 resultados obtidos com um aparelho automático usando o método

da invenção e usando um cito-gráfico com o dispositivo óptico e tanque, de acordo com a invenção.

A Figura 1 ilustra, de maneira diagramática, um tanque simples de diluição e análise 1 ao qual pode se
5 fornecer uma amostra de sangue 2 a ser analisada, um diluente 3 e um reagente 4 que formam, juntos, uma solução de análise. Este tanque 1 é equipado com meios para medir, por fotometria 5, o nível de hemoglobina na dita solução de análise e um meio para medir 6, a resistividade da dita solução de análise de modo a
10 contar o número total de leucócitos. Geralmente, os meios são proporcionados para tomar uma fração da solução de análise a partir do tanque de análise 1 e para injetá-la em um tanque óptico 7 equipado com o meio de medição óptico 8 (por exemplo, um citômetro de fluxo) para uma análise dos leucócitos. De acordo
15 com o exemplo escolhido, também são proporcionados meios para tomar uma fração de uma pré-solução constituída pela amostra de sangue e diluente e introduzi-la em um tanque de contagem e diluição 9 equipado com meios para medir a resistividade 10 da dita fração para poder contar os eritrócitos e
20 plaquetas. O equipamento é convencionalmente equipado com meio de aquecimento para obter uma temperatura controlada termostaticamente de aproximadamente 35°C. Esta temperatura permite tempo e qualidade ótimos de reação de lise dos eritrócitos.

- uma alíquota de sangue (15,6 μ l) é injetada no tanque de análise 1 e é diluída com 2 ml de diluente de modo a formar uma pré-solução de análise; a taxa de diluição é 1/130°;

- uma fração muito pequena (aproximadamente 20 μ l) é tirada desta pré-solução de análise e depositada no tanque 9 para contagem dos eritrócitos e plaquetas;

- adiciona-se então 0,7 ml de reagente à pré-solução remanescente no tanque de análise 1: a lise dura aproximadamente 10 segundos (de modo a destruir os eritrócitos, formar e estabilizar o complexo de oxiemoglobina), a solução de análise assim formada tem uma taxa de diluição final de aproximadamente 1/173°; uma fração da dita solução de análise é tirada e injetada no tanque óptico 7 onde a análise dos leucócitos pode acontecer (contagem e/ou diferenciação dos leucócitos por sub-populações); simultaneamente, no tanque de análise 1, os leucócitos são contados por uma medição de resistividade e a hemoglobina, por uma medição por absorvência no comprimento de onda do complexo de oxiemoglobina formado.

Um dispositivo óptico, de acordo com a invenção, particularmente adequado para uma análise de leucócitos de uma solução de análise tendo uma taxa de diluição menor do que 1/100°, é descrito abaixo, mais particularmente, adequado para uma diluição compreendida entre 1/160° e 1/180°. Convencionalmente, uma taxa de diluição de 1/160° é considerada como sendo mais baixa do que uma taxa de 1/100°.

É óbvio que modalidades variantes do método e do equipamento descritos acima são possíveis:

- para o equipamento: podem ser proporcionados meios para introduzir separadamente o composto de lise, o composto leuco-protetor e o composto que estabiliza o complexo formado com a hemoglobina no tanque de análise 1 e, conseqüentemente, um tanto mais na forma de um mono-reagente; o meio 6 para medir a resistividade da solução de análise é opcional; sendo que o número total de leucócitos a ser obtido por análise óptica da solução de análise; similarmente, o tanque de contagem 9 e o meio para medição 10 da resistividade neste tanque, podem ser proporcionados apenas se uma análise completa da amostra de sangue for desejada.

- do mesmo modo para o método: a introdução dos compostos de reação pode ser considerada independentemente ou coletivamente no lugar de um mono-reagente, sendo que a introdução pode ser realizada simultaneamente ou sucessivamente; o estágio anterior de contagem dos eritrócitos e de plaquetas e o estágio de contagem global dos leucócitos pode ser omitido; além do mais, duas diluições sucessivas da amostra de sangue podem ser realizadas: uma primeira diluição que é particularmente adequada para uma diferenciação de leucócitos (aproximadamente até $1/80^\circ$), conforme acontece no citômetro do tipo hidrofoco padrão conhecido, a partir do qual a fração requerida para esta diferenciação de leucócitos é tirada, então, em um segundo

momento no tempo, uma segunda diluição adequada para medição da hemoglobina (compreendida entre 1/100° e 1/500°), conforme é possível com os espectrômetros conhecidos.

De acordo ainda com outra variante, o tanque 1
5 pode servir em um segundo momento para realizar a contagem dos eritrócitos e das plaquetas após a limpeza, preenchendo-se o tanque com uma amostra que esteja aguardando em uma agulha de seringa.

Os resultados obtidos serão descritos agora com
10 um exemplo específico de (mono)-reagente, de acordo com a invenção.

Um mono-reagente é preparado usando a
formulação Eosinofix® da companhia ABX, comercializada para determinação de leucócitos em citometria de fluxo e contendo,
15 para esta finalidade, um composto para efetuar a lise dos eritrócitos e um composto leuco-protetor (cf. patente EP0430750, da ABX). De acordo com a invenção, um composto que estabilize o complexo de hemoglobina foi adicionado.

Medições da Hemoglobina por 20 Espectrofotometria

Testes de linearidade foram realizados usando um espectrofotômetro em 542 nm. Os gráficos são mostrados nas Figuras 2a-2e. Eles representam as concentrações de hemoglobina medidas em relação às concentrações esperadas. Mais
25 especificamente:

- A Figura 2a corresponde a uma lise de referência para medição da hemoglobina por espectrofotometria (LMG®, vendido por ORPHEE);

- as Figuras 2b, 2c e 2d correspondem ao mono-reagente, de acordo com a modalidade no. 4 com, como agente de estabilização do complexo de hemoglobina, respectivamente, Tiron, DDAPS e imidazol; e

- a Figura 2e corresponde ao método da invenção implementado usando um mono-reagente Eosinofix® sozinho, isto é, não contendo agente de estabilização do complexo de hemoglobina, de acordo com a presente invenção.

Para os três testes realizados de acordo com a invenção, um teste de linearidade positivo é obtido para cada com um coeficiente de concentração R^2 de 1 ± 10^{-4} (mostrado na figura). Este resultado está de acordo com aquele obtido com a lise de referência da Figura 2a. Isso significa que o método da invenção realmente permite a medição de um nível de hemoglobina real em uma amostra de sangue.

Por contraste, conforme é visto na Figura 2e, com o reagente (Eosinofix) sem um estabilizante de hemoglobina, uma relação linear não é obtida. Isso significa que este reagente sozinho não pode ser usado para medir um nível de hemoglobina.

Diferenciação de Leucócitos por Citometria de Fluxo

As Figuras 2f a 2i são cito-gráficos obtidos usando um citômetro de fluxo BD FACScan®, correspondendo

respectivamente ao Eosinofix sozinho e Eosinofix ao qual DDAPS, Tiron e imidazol são adicionados. Nestas figuras, vê-se que a diferenciação das sub-populações é conseguida e de uma maneira que é comparável a um reagente padrão para
5 diferenciação de leucócitos (matriz obtida com Eosinofix na Figura 2f).

Também se pode fazer referência ao cito-gráfico da Figura 11b (descrita abaixo) em particular, obtido com um citômetro de acordo com a invenção.

10 O dispositivo hidráulico de acordo com o quarto objetivo da invenção, será descrito agora.

A Figura 3 representa parcialmente o diagrama de um sistema hidráulico 100 e parte do equipamento de um analisador de sangue automático 20, na medida em que ela
15 permite uma compreensão do dispositivo hidráulico de acordo com a invenção.

O aparelho automático ilustrado na Figura 3 compreende, em particular, uma agulha 101 para amostragem de sangue a ser analisado em um tubo que foi usado para seu
20 armazenamento e seu transporte até o aparelho automático. O sangue tirado é derramado pela agulha na forma de uma amostra em um tanque 102. O tanque 102 é designado, em particular, para a diluição e/ou lise dos eritrócitos da amostra de sangue. Toda a amostra ou parte da amostra, antes ou depois da diluição, pode ser
25 tirada com vistas a análise em uma outra parte do aparelho automático, por exemplo, em um dispositivo 120, descrito abaixo.

Um dispositivo para análise da hemoglobina 110 (um espectrofotômetro, por exemplo) é disposto perto do tanque 102. Um local de armazenamento 103 para um produto de diluição e um local de armazenamento 104 para um reagente, em particular um reagente de lise, são conectados ao tanque 102 via circuito hidráulico 100.

Um outro dispositivo de análise 120 é dedicado mais especificamente à contagem e diferenciação dos leucócitos, por exemplo, em toda ou em parte da amostra tirada do tanque 102. A partir daqui, amostra também se referirá a este todo ou esta parte. O dispositivo para análise dos leucócitos 120 compreende, em particular, um dispositivo óptico 200 e um tanque óptico 300. O tanque óptico é conectado ao tanque 102 via circuito hidráulico.

Um conjunto de seringas permite o movimento dos líquidos no circuito hidráulico. Destas seringas, uma seringa 105 dedicada ao diluente, e uma seringa 106 dedicada ao reagente, são representadas de tal modo que a invenção é bem compreendida. Outras seringas que não estão representadas porque elas não são necessárias para a compreensão da invenção, podem completar o dispositivo.

Além dos tubos para a circulação dos líquidos, o circuito hidráulico compreende válvulas solenóides para a mudança de diferentes circuitos no circuito hidráulico 100, de acordo com seu uso em um dado momento da análise. Oito válvulas solenóides 111-119 das válvulas solenóides do circuito

hidráulico 100 estão ilustradas na Figura 3. Cada válvula solenóide compreende duas posições, cada uma identificada, respectivamente, com a letra A ou B.

O desenho do circuito hidráulico, conforme será descrito abaixo, permite o uso de apenas uma motorização M para as seringas ilustradas. A mesma motorização também pode ser usada para outras seringas. Assim, os pistões das seringas 105, 106 são firmemente fixados um no outro. Seu movimento, conseqüentemente, é simultâneo, ou empurrando P, quando eles são acionados para dentro do respectivo cilindro de cada seringa, ou puxando, T, quando eles são retirados.

Será descrito agora o arranjo e então, a operação hidráulica do aparelho automático.

O tanque 300 compreende um corpo externo 301 e um injetor 302, dentro do corpo 301, um volume de envolvimento 303 é formado entre o corpo e o injetor.

O circuito hidráulico 100 compreende:

- um ramal de injeção 131 que se estende a montante do injetor, entre o injetor e a válvula 111;
- um ramal de amostra 132 que é conectado a um ponto de ramificação de amostra 142 até o ramal de injeção e se estende até o tanque 102;
- um ramal de sucção 133 que é conectado em um ponto de ramificação de sucção 143 até o ramal de injeção, a montante do ponto de ramificação de amostra 142, via válvula

113 e se estende até uma fonte de vácuo 107, por exemplo, uma seringa ou uma bomba peristáltica;

- um ramal de descarga 134 que é conectado em um ponto de ramificação de descarga 144 até o ramal de injeção, a montante do ponto de ramificação de sucção 143 e se estende até o local de armazenamento de produto reagente 104;

- um ramal de revestimento 135 que se estende a montante do corpo 301 e conecta o volume de envolvimento e a válvula 115;

- um ramal de diluição 136 que se estende entre a válvula 116 e um uso 108 para o diluente via válvula 115;

- um ramal diluente 137 que se estende entre o local de armazenamento de diluente 103 e a válvula 116;

- um ramal de reagente 140 que se estende entre o local de armazenamento de reagente 104 e a válvula 117;

- um ramal de reação 141 que se estende entre a válvula 117 e um uso 109 para o reagente via válvula 111;

- um ramal de drenagem 138 para o tanque 102 que se estende entre o tanque 102 e a fonte de vácuo 107 via válvula 118, sendo que o ramal de amostragem 132 é conectado ao ramal de drenagem entre o tanque 102 e a válvula 118 e sendo que o ramal de sucção é conectado ao ramal de saída 132 além da válvula 118 em relação ao tanque; e

- um ramal de saída 139 que conecta a jusante do tanque 300, via válvula 119, a um tanque de refugo, por

exemplo, a pressão atmosférica ou via uma fonte de sucção, uma seringa ou uma bomba peristáltica.

Em uma primeira posição 116A da válvula 116, a seringa de diluição 105 está em comunicação com o local de
5 armazenamento de diluente, tal que um movimento de puxar T permite que a seringa 105 seja preenchida co diluente.

Em um primeiro caso, a seringa de diluição que contém diluente, com a válvula 116 estando em sua segunda posição 116B, que conecta a seringa 105 ao ramal de diluição 136
10 e a válvula 115 estando em sua primeira posição 115A, que conecta o ramal de diluição ao uso 108 para o diluente, um movimento de empurrar P permite que o diluente seja movido para este uso 108, por exemplo, no tanque 102, por exemplo, para uma diluição de toda a amostra.

15 Em um segundo caso, com a válvula 116 estando em sua segunda posição 116B e a válvula 115 estando em sua segunda posição 115B, que conecta o ramal de diluição ao ramal de revestimento 135, um movimento de empurrar P permite que o diluente seja movido para dentro do tanque óptico 300, de
20 modo a formar um fluxo envolvente ali. A utilidade deste fluxo envolvente no contexto da invenção será analisada em uma descrição do tanque 300 abaixo.

A válvula 117 estando em uma primeira posição 117A que conecta a seringa do reagente ao local de
25 armazenamento de reagente 104, e a válvula 114 estando em uma primeira posição 114A, que fecha o ramal de descarga 134, um

movimento de puxar T permite que a seringa de reagente 106 seja preenchida com reagente.

Em um primeiro caso, a seringa de reagente contendo reagente, com a válvula 117 estando em sua segunda
5 posição 117B que conecta a seringa de reagente 104 ao ramal de reação 141 e a válvula 111 estando em uma primeira posição 111A, que conecta o ramal de reação ao uso 109 para o reagente, um movimento de empurrar P permite que o reagente seja movido para este uso 109, por exemplo, no tanque 102, por exemplo, para
10 uma lise de toda a amostra.

Em um segundo caso, a válvula 117 estando em sua segunda posição 117B e a válvula 111 estando em sua segunda posição 111B, que conecta o ramal de reação 141 ao ramal de injeção 131, a seringa de reagente 106 é conectada
15 diretamente ao injetor 302.

A válvula 118 estando em uma primeira posição 118A que isola o ramal de sucção 133 do ramal de amostra 132 através do ramal de drenagem, a válvula 112 estando em uma primeira posição 112A que conecta a parte a montante à parte a
20 jusante do ramal de amostra 132, a válvula 113 estando em uma primeira posição 113A que conecta a parte a jusante à parte a montante do ramal de sucção 133, conseqüentemente à fonte de vácuo 107, a amostra a ser analisada é sugada para dentro do ramal de injeção 131, entre o ponto de ramificação de amostra
25 142 e o ponto de ramificação de sucção 143.

O ramal de descarga 134 compreende uma resistência de fluido variável ou calibrada 150.

Quando a seringa de diluente 105 contém diluente, a seringa de reagente 106 contém reagente e uma amostra de sangue a ser analisada está no ramal de injeção 131; e quando as válvulas 112, 113 estão em suas segundas posições 112B, 113B, que isolam a parte a montante e a parte a jusante de seus respectivos braços; e quando as válvulas 115, 116 estão em suas segundas posições 115B, 116B, que conectam a seringa de diluente 105 ao volume envolvente 303; quando finalmente as válvulas 111, 117 estão em suas segundas posições 111B, 117B, que conectam a seringa de reagente 106 ao injetor 302 e a válvula 114 está em sua segunda posição 114B; um simples movimento de empurrar P gerado pela motorização M, permite o acionamento do diluente, do reagente e da amostra de sangue na direção de e através do tanque 300, enquanto uma parte do reagente, que é uma função da resistência do fluido 150, é retornada para o local de armazenamento de reagente 104.

A resistência 150 permite, em particular, o ajuste das taxas de fluxo dos líquidos de envolvimento e de deslocamento um com relação ao outro. Isso permite que estas taxas de fluxo sejam adaptadas para as diferentes funções destes líquidos. Em particular, isso permite que sejam obtidas velocidades de fluxo similares para o envoltório e a amostra na zona de análise 304 quando é usado um tanque hidrofoco padrão.

Em particular, o ramal de descarga 134 e os arranjos descritos anteriormente, tornam possível usar uma motorização simples e conseqüentemente, reduzir, em particular, o custo de um aparelho de análise automático, assim como seu
5 volume.

O diluente forma, em uma zona de análise 304 do tanque 300, um fluxo envolvente para a amostra (veja em particular as Figuras 4 e 5). O reagente, situado a montante da amostra no ramal de injeção 131, serve como um líquido de
10 deslocamento, isto é, permite que o movimento do pistão da seringa de reagente seja transmitido para a amostra. Assim, não existe razão em preencher a seringa de reagente com a amostra de modo a ser capaz de realizar sua análise. Assim, mesmo uma
amostra de pequeno volume pode ser analisada e toda esta
15 amostra pode ser injetada e analisada, sem que uma parte dela permaneça no ramal de injeção 131 ou na seringa 106.

É óbvio que outras seringas, válvulas e ramais, não representados na Figura 3, pode constituir o circuito hidráulico 100, para o aparelho de análise automático 20 operar
20 bem e totalmente.

O dispositivo óptico 200, de acordo com a invenção, será descrito agora, em particular no que diz respeito às Figuras 4 e 5.

O dispositivo óptico compreende uma fonte de
25 luz aproximadamente monocromática 201. Esta fonte de luz é um diodo eletroluminescente. A luz é emitida principalmente ao

longo de um eixo óptico X200. O eixo óptico X200 é disposto aproximadamente perpendicular a um eixo de injeção X300 para movimento da amostra no tanque óptico 300. Os dois eixos X200 e X300 definem, juntos, um plano óptico.

5 De modo a impedir que o feixe de luz fonte 311 produzido pela fonte 201 seja poluído por luz espúria, um conjunto de três diafragmas é disposto, cada um perpendicular, na trajetória do feixe. Os diafragmas 202 são perfurados por orifícios cujo diâmetro é aproximadamente igual ao feixe e é
10 progressivamente aumentado em cada diafragma de modo a adaptá-lo ao diâmetro do feixe de medição à medida que este diâmetro aumenta ao afastar-se da fonte 201. Então, o feixe passa através de um dispositivo de foco 203 constituído por uma ou mais lentes.

15 Além do dispositivo de foco, o feixe encontra um dispositivo de ajuste que permite que o eixo óptico seja movido em um plano perpendicular ao eixo de injeção X300, isto é, em uma direção transversal em relação ao movimento da amostra no tanque. Um desvio lateral do feixe pode levar a uma
20 iluminação parcial ou nenhuma iluminação da amostra, o que tem uma influência direta sobre o resultado da análise.

No contexto do exemplo descrito, o dispositivo de ajuste é constituído por uma lâmina transparente 220 montada de maneira rotativa em torno de um eixo X220. O) eixo 221 é
25 aproximadamente paralelo ao eixo de injeção X300. Se a lâmina for disposta perpendicular ao eixo óptico X200, o feixe passa

através dela sem ser defletido. Por outro lado, se a lâmina formar um ângulo com o eixo óptico, uma refração dupla, na entrada e na saída da lâmina, desvia o feixe em um plano perpendicular ao eixo de ajuste X220. O eixo de ajuste X220, sendo
5 aproximadamente paralelo ao eixo de injeção X300, apenas um desvio transversal é gerado pela refração na lâmina. Quanto maior a espessura e/ou o índice de refração da lâmina e quanto mais a lâmina for inclinada com relação ao eixo óptico, maior é o desvio. Assim, para uma lâmina com uma espessura escolhida e índice de
10 refração, é suficiente girar a lâmina 220 em torno de seu eixo X220 de modo a ajustar a posição do feixe com relação à amostra que se move na zona de análise 304 do tanque óptico 300. Tal dispositivo de ajuste é particularmente econômico em comparação aos dispositivos da técnica anterior, especialmente já que uma
15 rotação precisa é geralmente mais fácil de realizar do que uma translação precisa, usando mecânica de alta precisão.

Após ter penetrado no tanque e passado através da amostra, o feixe fonte 211 se torna, pelo menos parcialmente, um feixe axialmente resultante 212, que sai do tanque
20 aproximadamente ao longo do eixo óptico. O feixe axialmente resultante 212 carrega informação sobre a amostra através da qual ele passou.

De modo a permitir medições simultâneas de diversos destes itens de informação, tem que ser possível analisar
25 o feixe com diversos aparelhos de medição 222, 223. Em particular, a análise óptica se baseia na detecção da luz difratada

de acordo com duas faixas de ângulos: ângulos estreitos e ângulos largos. Em cada uma destas faixas de ângulo, dois itens diferentes de informações são usados. Logo, é necessário distribuir a luz em dois canais diferentes para cada faixa. Logo, o meio 205 para
5 separar o feixe resultante 212 em dois feixes resultantes 213, 214, é usado. O meio de separação é constituído principalmente por um divisor de feixe 205. Este divisor de feixe é uma lâmina de vidro transparente. Ela é disposta a 45 graus com relação ao eixo óptico. Um feixe axialmente resultante secundário 213, formado
10 pela luz que passou através do divisor de feixe, e um feixe resultante da perda 214, formado pelas perdas de Fresnel, isto é, pela luz refletida pelo divisor de feixe, são assim produzidos.

Tal divisor de feixe tem um custo muito baixo em comparação ao meio de separação usado na técnica anterior
15 em dispositivos de análise óptica deste tipo. Em particular, por não compreender qualquer revestimento refletor adicional, ele é virtualmente resistente ao envelhecimento e praticamente, não requer manutenção. Dadas as múltiplas reflexões dentro da lâmina e a polarização da radiação incidente do feixe axialmente
20 resultante, entre 5 e 15% da energia é refletida, sendo que o resto é transmitido na forma do feixe axialmente resultante secundário.

Entre o tanque e o divisor de feixe, o feixe axialmente resultante 212 é tornado paralelo por meios adequados 206. Além do divisor de feixe, os feixes resultantes 213, 214 são
25 novamente focados por respectivos meios adequados 207, 208,

com vista a sua análise pelos respectivos aparelhos de medição 222, 223.

No exemplo descrito, o aparelho de medição 222, que analisa o feixe secundário axialmente resultante 213 é
5 um aparelho para medição da difração perto do eixo óptico pelas células sangüíneas (chamada uma medição FSC). No exemplo descrito, o aparelho de medição 223, que analisa o feixe produzido pelas perdas de Fresnel 214 é um aparelho para a medição das perdas de luz no eixo (chamada uma medição ALL),
10 isto é, o obscurecimento da luz pelas células na amostra.

A Figura 5 representa, de maneira diagramática, uma seção do tanque em um plano perpendicular ao eixo de injeção X300 e contendo o eixo óptico X200. Conforme está particularmente ilustrado nesta figura, a luz re-emitida
15 lateralmente pela amostra em um fluxo lateralmente resultante 315, focado além do tanque em um aparelho de medição 224, também é analisada.

Um tanque óptico, de acordo com a invenção, em particular considerado para uso com um circuito hidráulico,
20 tal conforme descrito anteriormente, será descrito agora, em particular com referência à Figura 6. A operação deste tanque pode ser comparada a uma operação tipo hidrofoco da técnica anterior, que é representada de modo muito diagramático na Figura 10.

25 O tanque 350 da Figura 10 compreende um corpo 351, um injetor 302 e uma zona de análise 354. Uma

dimensão transversal interna D354 do tanque tem aproximadamente 250 microns. Esta dimensão pode ser um diâmetro, se o tanque tiver uma seção circular, ou um lado, se ele tiver uma seção quadrada ou retangular. Conforme está ilustrado
5 pelas linhas pontilhadas, um fluxo de envolvimento 362 é usado para reduzir, em particular, o diâmetro de um fluxo de amostra 361, tal que na zona de análise 354, o fluxo de amostra tem, na técnica anterior, um diâmetro D361 de menos de 50 microns.

O tanque 300, de acordo com a invenção,
10 ilustrado nas Figuras 4 a 6, compreende o corpo 301 e o injetor 302, disposto aproximadamente coaxialmente ao longo de um eixo de injeção X300. A zona de análise 304 é disposta a jusante do injetor.

O corpo é produzido a partir de um material
15 injetado, de preferência, a partir de um material plástico. Tal método de produção permite que sejam obtidos formatos complexos. Em particular, uma lente 305 é moldada no corpo. Esta lente permite que a luz, que é obscurecida, difratada ou difusa, pelas células sangüíneas, seja coletada.

20 Esta lente tem que ter dimensões, em particular, diâmetro suficiente, para que as possíveis heterogeneidades locais no material injetado possam ser desconsideradas com relação a estas dimensões. No exemplo ilustrado, a lente 305 tem um diâmetro de cerca de 3 mm. Esta lente injetada é uma lente lateral
25 305 através da qual o feixe lateralmente resultante 315 passa. Além do mais, a lente lateral tem que permitir que a luz seja

coletada em tantas direções quanto forem possíveis, isto é, com um campo direcional que seja tão largo quanto possível. Assim, quanto mais perto a lente estiver da amostra, maior o campo direcional. No exemplo ilustrado, a lente é uma lente semi-
5 esférica, chamada uma lente de 90° . Além do mais, a lente sendo uma parte da parede do tanque, existe contato direto com o líquido no tanque, isto é, não existe espaço de ar, com um baixo índice de refração, entre a amostra e a lente. Isso melhora a medição.

10 De modo a superar as deficiências de homogeneidade, é usado vidro onde a luz é particularmente focada, por exemplo, um vidro do tipo BK7. Este é o caso em particular para as janelas axiais 306, onde o feixe fonte 211 penetra no tanque e onde o feixe axialmente resultante 212 sai
15 dele.

De modo a ser capaz de produzir uma lente injetada com tais dimensões, é necessário, na zona de análise, que o tanque 300 tenha dimensões pelo menos comparáveis. Além do mais, estas grandes dimensões permitem que as janelas de vidro
20 sejam integradas nas paredes de plástico, enquanto os tanques da técnica anterior, tendo pequenas dimensões, são feitos com paredes totalmente de vidro ou quartzo. No exemplo ilustrado em particular nas Figuras 5 e 6, a seção inferior do tanque tem 4,5 mm ao longo do eixo óptico por 33 mm na direção perpendicular.
25 Esta seção retangular com grandes dimensões, associada a um pequeno volume da amostra, que transporta as células de sangue a

serem analisadas, requer o uso de um envoltório hidrodinâmico da amostra. À guisa de comparação, um tanque da técnica anterior tem uma dimensão transversal interna D354 da zona de análise perto de 250 microns.

5 A montante da zona de análise 304, o corpo 301 do tanque circunda o injetor 302 e forma, em torno do injetor, o volume envolvente 303. As paredes do injetor separam um fluxo 311 formado pela amostra dentro do injetor, de um fluxo envolvente 312 no volume envolvente. O fluxo de amostra tem
10 origem no ramal de injeção 131 do circuito hidráulico 100. Na zona de análise, os dois fluxos estão em contato, permanecem concêntricos e fluem simultaneamente no tanque.

 De modo a reduzir os custos de produção do aparelho automático, pode ser vantajoso reduzir a precisão da
15 produção das partes. Conforme mencionado acima, tal objetivo pode ser atingido criando-se um fluxo de amostra com uma seção maior.

 No entanto, se uma técnica da arte anterior for usada quando o fluxo de amostra for estirado por um fluxo
20 envolvente, um fluxo de amostra com uma seção grande será turbulento, o que afeta, em particular, de maneira adversa a precisão de medições. Além do mais, a seção do fluxo de amostra será progressivamente reduzida, que é o oposto do efeito desejado, que é ter um fluxo de amostra com uma grande seção.
25 Tal objetivo é atingido usando o circuito hidráulico 100 de acordo com a invenção, descrito anteriormente com referência à Figura 1.

Tal circuito torna possível obter velocidades escolhidas independentemente para o fluxo envolvente e para aquele do fluxo de amostra de modo que apareça pouca turbulência no fluxo de amostra e que esta turbulência não tenha efeito notável sobre o resultado da análise. Os dois fluxos podem ser, cada um, aproximadamente uniformes, opcionalmente laminares em certas faixas de velocidades apropriadas.

Além do mais, um injetor 302, conforme está ilustrado na Figura 7 ou Figura 8, também permite a limitação da turbulência no fluxo de amostra. Além do mais, ele permite uma alta velocidade de injeção da amostra no tanque óptico, enquanto mantém seu fluxo aproximadamente uniforme.

Um injetor 302, conforme está ilustrado na Figura 7, compreende um tubo estrutural 320, por exemplo, feito de aço inoxidável, o que assegura a rigidez do injetor. O tubo estrutural é revestido no lado de dentro por um tubo 321 feito de um plástico, por exemplo, um politetrafluoroetileno (PTFE). No exemplo ilustrado, os tubos estrutural e de revestimento são cilíndricos. O tubo de revestimento é estendido a jusante do tubo estrutural, por um bocal feito do mesmo material plástico. O fato de diferenciar a função estrutural do tubo estrutural e a função de injeção do bocal, associado ao uso de um material plástico, permite que formatos suficientemente precisos sejam obtidos a um baixo custo.

O bocal tem uma seção que é progressivamente estreitada a partir de um diâmetro interno D321 do tubo de

revestimento até um diâmetro interno D323 de um orifício de saída 323 em uma extremidade a jusante 324 do bocal 322. No exemplo descrito, a extremidade a jusante 324 é um cilindro com um comprimento L324. A parede do bocal é inicialmente côncava para dentro, então sofre uma inflexão de modo a se tornar convexa para dentro, sendo que a seção do bocal é progressivamente estreitada a partir de a montante até a jusante, a partir do diâmetro D321 até o diâmetro D324. A superfície côncava é tangente à superfície interna do tubo de revestimento cilíndrico. A superfície convexa é tangente à superfície interna da extremidade cilíndrica 324. No exemplo descrito, o diâmetro D323 do orifício 323 tem aproximadamente 60 microns, o diâmetro interno D321 do tubo de revestimento tem aproximadamente 1 milímetro, o comprimento L322 do bocal tem aproximadamente 2,5 milímetros, L320 do tubo estrutural tem aproximadamente 6 milímetros e a extremidade cilíndrica L324 tem aproximadamente 200 microns.

Um injetor 302 tal como aquele ilustrado nas Figuras 8 e 9, está em uma única peça e é feito de um material único substancialmente rígido. Este material pode ser, por exemplo, aço inoxidável, um cerâmico, um rubi sintético ou um material plástico. O material plástico pode ser, vantajosamente, um politetrafluoroetileno. O injetor compreende um tubo aproximadamente cilíndrico 331 que é estendido a jusante por um bocal 332.

O bocal estreita progressivamente para dentro, a partir de um diâmetro interno D331 para o tubo 331, até um diâmetro interno D333, de um orifício de saída 333 para a amostra, em uma extremidade a jusante 334 do bocal 332. No exemplo ilustrado, o estreitamento acontece de acordo com um cone truncado aberto a um ângulo, de preferência, compreendido entre 9 e 10 graus. Além do cone truncado e acima do orifício de saída 333, o diâmetro permanece constante em uma parte cilíndrica 335, com um comprimento L335 e um diâmetro D333.

No exterior do bocal, seu diâmetro externo é progressivamente maior de acordo com um cone truncado aberto em um ângulo compreendido entre aproximadamente 8 e 9 graus, então, na extremidade notadamente mais reduzida, de acordo com um cone truncado aberto, a um ângulo A334, compreendido entre aproximadamente 35 e 45 graus, até um diâmetro externo D334 em torno do orifício de saída 333, D334 é aproximadamente 3 a 4 vezes maior do que D333.

À guisa de exemplo, $D333 = 60 \mu\text{m}$ e $A334 = 40^\circ$.

Graças aos diferentes arranjos descritos anteriormente, é possível obter uma alta velocidade de injeção. Assim, no exemplo descrito, é possível injetar uma amostra de mais de 200 microlitros em menos de 10 segundos. Em particular, tal taxa de injeção torna possível usar uma alta taxa de diluição da amostra de sangue, sem aumentar a duração da análise em comparação com os aparelhos automáticos da técnica anterior.

Em particular, a mesma diluição, por exemplo, $1/160^\circ$, pode ser usada para a análise da hemoglobina pelo dispositivo 110 (veja a Figura 3) e para a análise dos leucócitos pelo dispositivo óptico 120, ao invés de $1/80^\circ$, geralmente usada para a análise dos leucócitos.

As Figuras 11a-c ilustram os resultados obtidos usando o método e o equipamento, de acordo com o primeiro objetivo da invenção, o dito equipamento usando um tanque óptico 7 de acordo com o terceiro objetivo da invenção e um dispositivo óptico 8 de acordo com o segundo objetivo da invenção. A Figura 11a mostra um teste de linearidade positivo da medição de hemoglobina e, conseqüentemente, demonstra a medição possível e confiável do nível de hemoglobina de uma amostra de sangue de acordo com a invenção. A Figura 11b mostra uma matriz óptica obtida a partir de um amostra de sangue de teste com 30% de eosinófilos, a que a formulação, de acordo com a invenção, foi adicionada. Nesta matriz, as cinco sub-populações estão presentes e diferenciadas (grupos delimitados na citografia: E para eosinófilos, N para neutrófilos, M para monócitos, B para basófilos e L para linfócitos). A Figura 11c mostra o teste de linearidade positivo da medição por resistividade do nível de leucócitos.

Estas figuras mostram que, graças à invenção, é possível realizar uma análise pelo menos do nível de hemoglobina e do nível de leucócitos e uma diferenciação de leucócitos usando

a formulação de acordo com a invenção, em particular na forma de um mono-reagente.

É óbvio que a invenção não está limitada aos exemplos que acabaram de ser descritos e inúmeras modificações podem ser aplicadas a estes exemplos sem que se exceda o escopo da invenção.

Por exemplo, produtos outros que não o diluente ou o reagente podem ser usados de modo a formar, respectivamente, o fluxo envolvente e o pistão de fluido, particularmente se eles estiverem disponíveis no aparelho automático para outros usos.

Em adição, ao invés de estar disposto apenas no circuito de injeção, uma resistência de fluido pode ser disposta no circuito envolvente ou em ambos simultaneamente. Isso pode ocorrer como uma função da dada taxa de fluxo máxima via meio para deslocamento dos líquidos destinados respectivamente a deslocamento ou envolvimento.

Diversas ou todas as lentes do tanque óptico e/ou do dispositivo óptico podem ser assim produzidas por injeção com o corpo do tanque, ao invés de uma única, conforme está ilustrado anteriormente. Em particular, as janelas de vidro podem ser injetadas. Particularmente, se as heterogeneidades no material injetado forem mais ou menos desconsideráveis no que diz respeito à precisão desejada para as medições.

Um dispositivo de ajuste e/ou o meio de separação descrito anteriormente, pode ser usado

independentemente um do outro e opcionalmente com uma fonte de luz outra que não um diodo eletroluminescente.

REIVINDICAÇÕES

1. Dispositivo óptico (200), para a contagem e diferenciação de leucócitos em um aparelho automático de análise sangüínea (20), caracterizado pelo fato de compreender
5 uma fonte de luz (201) do tipo diodo eletro-luminescente de modo a iluminar uma amostra de sangue que circula em um tanque óptico (300) ao longo de um eixo geométrico de injeção (X300).
2. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o diodo (201)
10 emite luz cujo comprimento de onda é menor do que 600 nanômetros.
3. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o diodo emite luz cujo comprimento de onda é menor do que 500 nanômetros.
- 15 4. Dispositivo, de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que ele emite um feixe de fonte de luz (211) com uma largura compreendida entre 5 e 200 microns perto do eixo geométrico de injeção.
- 20 5. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que ele emite um feixe de luz com uma largura compreendida entre 90 e 120 microns.
6. Dispositivo, de acordo com uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o feixe de luz é emitido aproximadamente na direção do tanque,
25 aproximadamente transversalmente à direção de fluxo da amostra.

7. Dispositivo, de acordo com uma das reivindicações 4 a 6, caracterizado pelo fato de compreender uma lâmina transparente montada de modo rotativo (220) disposta entre o diodo e o tanque de modo a ser transpassada pelo feixe de fonte de luz (211) entre as superfícies opostas.

8. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a lâmina transparente é montada de modo rotativo em torno de um eixo geométrico (X220), aproximadamente paralela ao movimento da amostra de sangue no tanque.

9. Dispositivo, de acordo com uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de compreender, além do tanque óptico, meios para a separação (206) por perdas de Fresnel para um feixe de luz resultante (212) que tem origem no feixe de fonte de luz, separando o dito feixe em um feixe resultante axialmente (213) e pelo menos um feixe que resulta da perda de Fresnel (214) constituído pelas perdas de Fresnel enquanto passa pelo meio de separação (205).

10. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o meio de separação compreende pelo menos uma superfície de separação que é uma superfície de um material de separação transparente, sendo que o feixe resultante axialmente passou através do material transparente e o feixe resultante da perda de Fresnel foi refletido pela superfície de separação, sendo que a dita superfície é inclinada com relação ao feixe de luz resultante, além do tanque.

11. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizado pelo fato de também compreender um aparelho (222) para a medição da luz do feixe resultante axialmente e pelo menos um outro aparelho (223) para
5 medição da luz do pelo menos um feixe resultante da perda.

12. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que os aparelhos de medição (222, 223) compreendem meios para uma medição a partir de uma medição de fluorescência.

10 13. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 11 ou 12, caracterizado pelo fato de que os aparelhos de medição (222, 223) compreendem meios para uma medição das perdas de luz no eixo.

14. Dispositivo, de acordo com uma das reivindicações 11 a 13, caracterizado pelo fato de que os aparelhos de medição (222, 223) compreendem meios para uma
15 medição da difração perto do eixo.

15. Dispositivo, de acordo com uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de também
20 compreender um meio para medição da difração do feixe de luz em ângulos largos pela amostra no tanque.

16. Dispositivo, de acordo com uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de compreender, no caminho do feixe antes do tanque, pelo menos um diafragma
25 (202) para bloquear luz não genuína.

17. Aparelho de hematologia (20), em particular um aparelho de análise de amostra de sangue automático, caracterizado pelo fato de compreender um dispositivo (200), de acordo com uma das reivindicações 1 a 16.

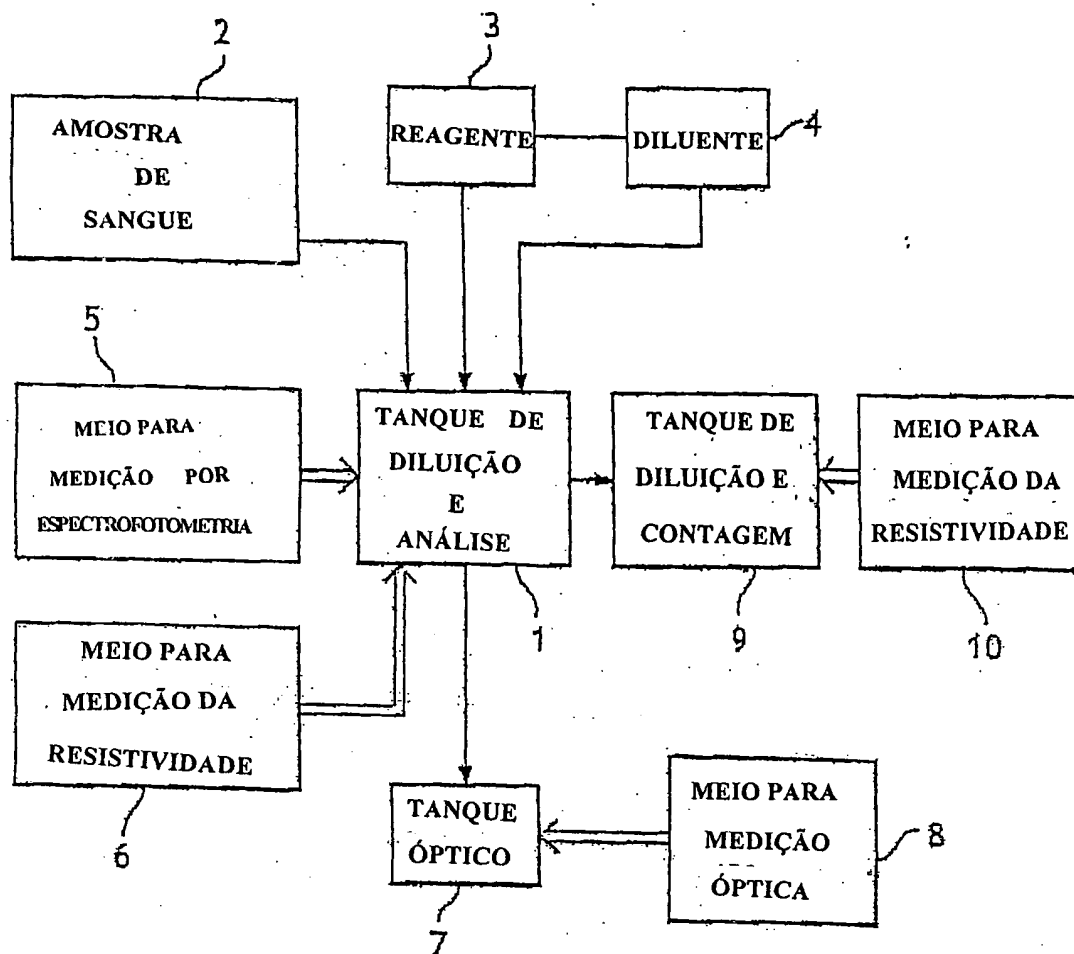


FIG.1

2/9

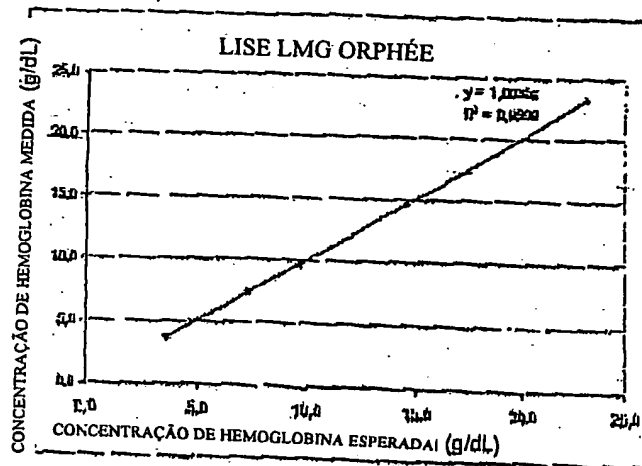


FIG 2a

BASEADA NA MODALIDADE 4

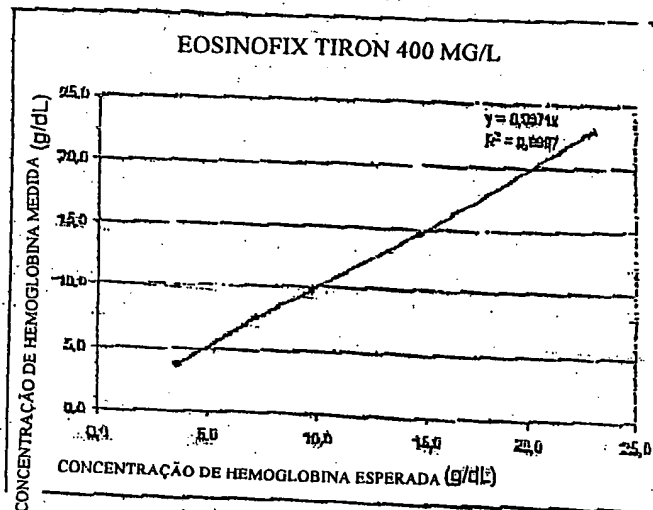


FIG 2b

BASEADA NA MODALIDADE 4

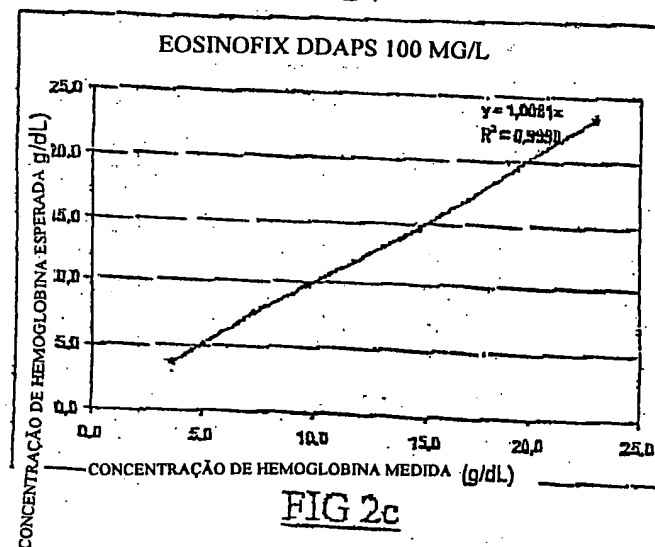


FIG 2c

BASEADA NA MODALIDADE 4

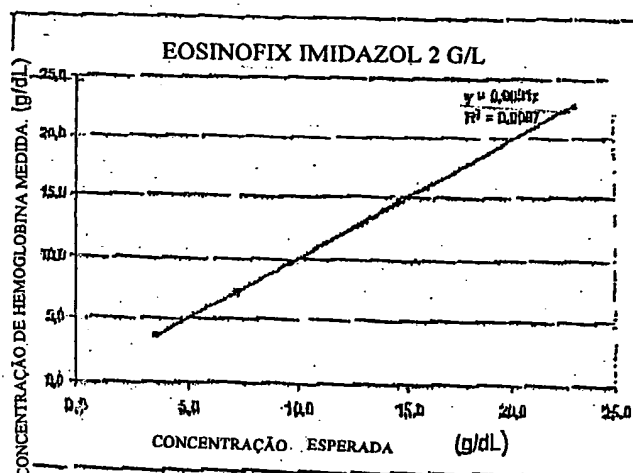


FIG 2d

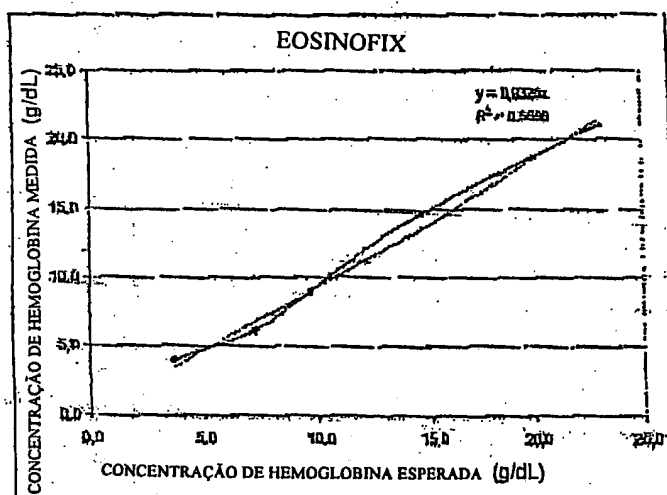


FIG 2e

MATRIZ DE REFERÊNCIA: EOSINOFIX SEM AGENTE DE ESTABILIZAÇÃO DO COMPLEXO DE HEMOGLOBINA.

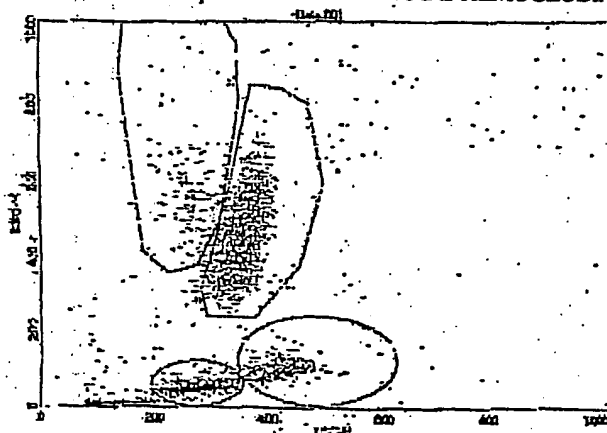


FIG 2f

4/9

EOSINOFIX COM DDAPS



FIG 2g

EOSINOFIX COM TIRON

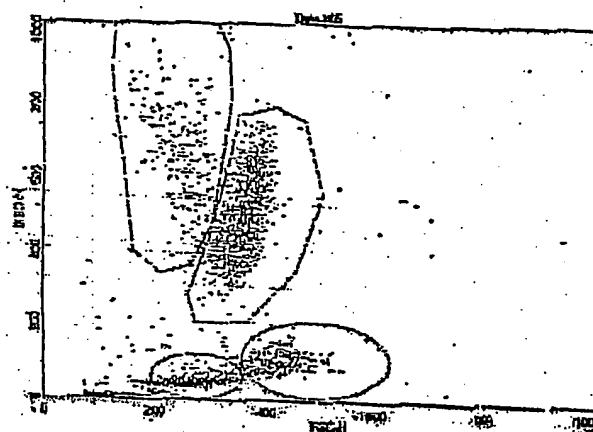


FIG 2h

EOSINOFIX COM IMIDAZOL

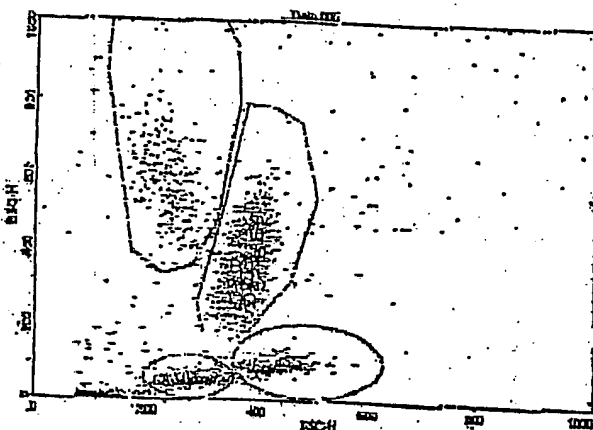


FIG 2i

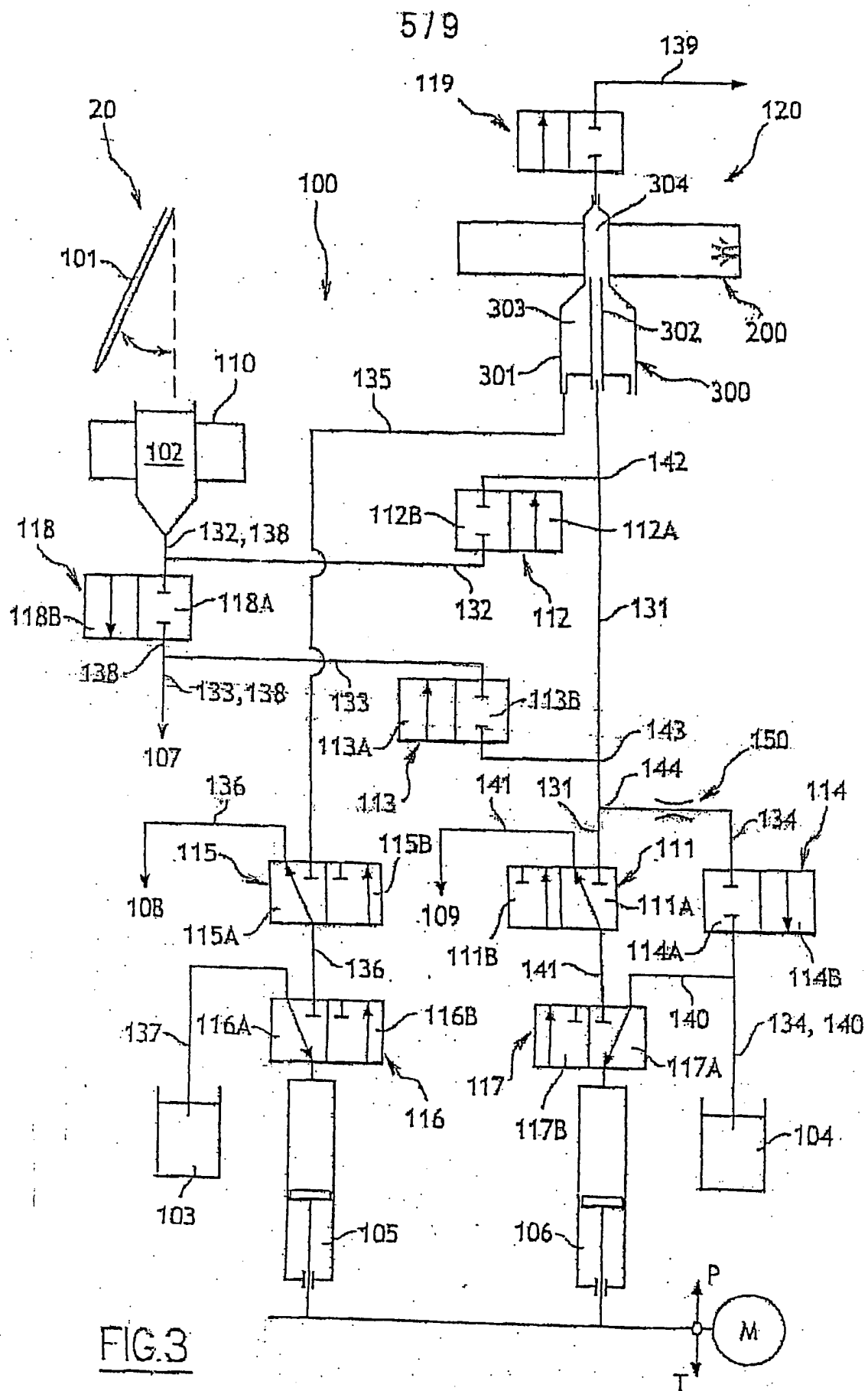
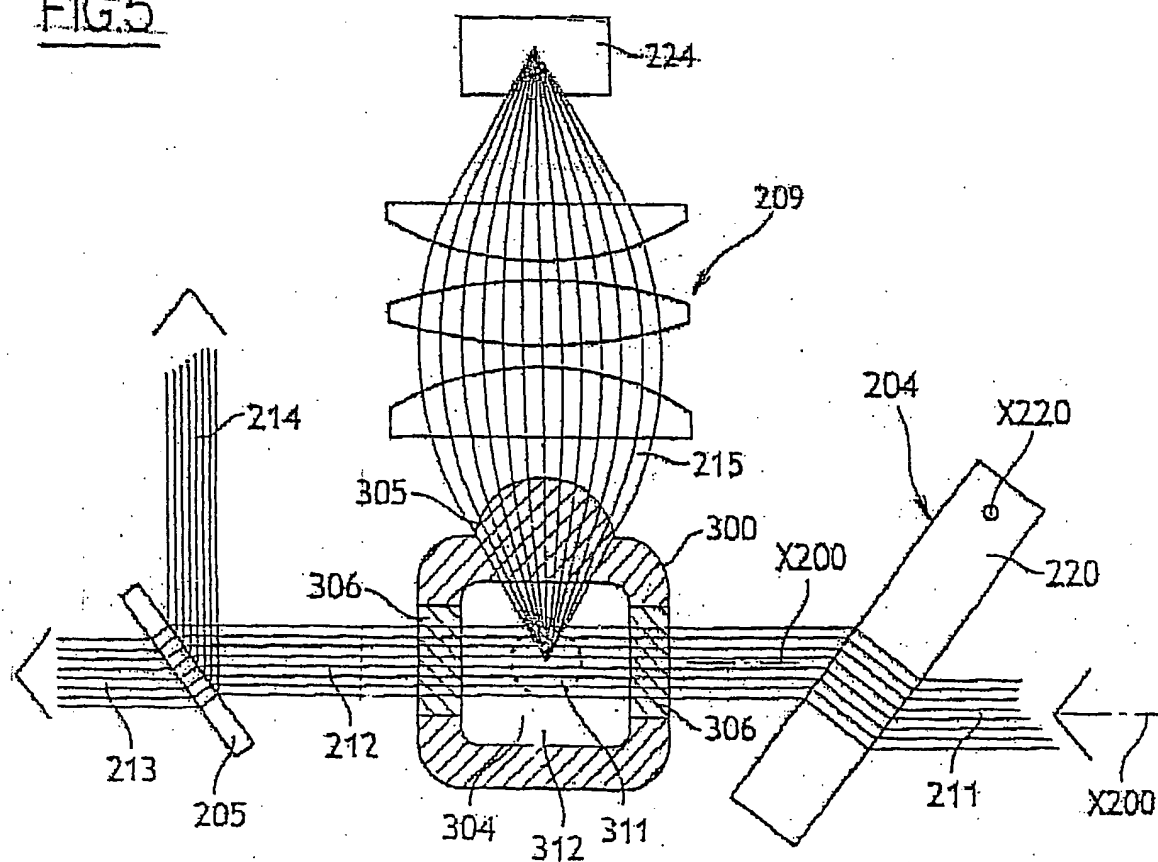
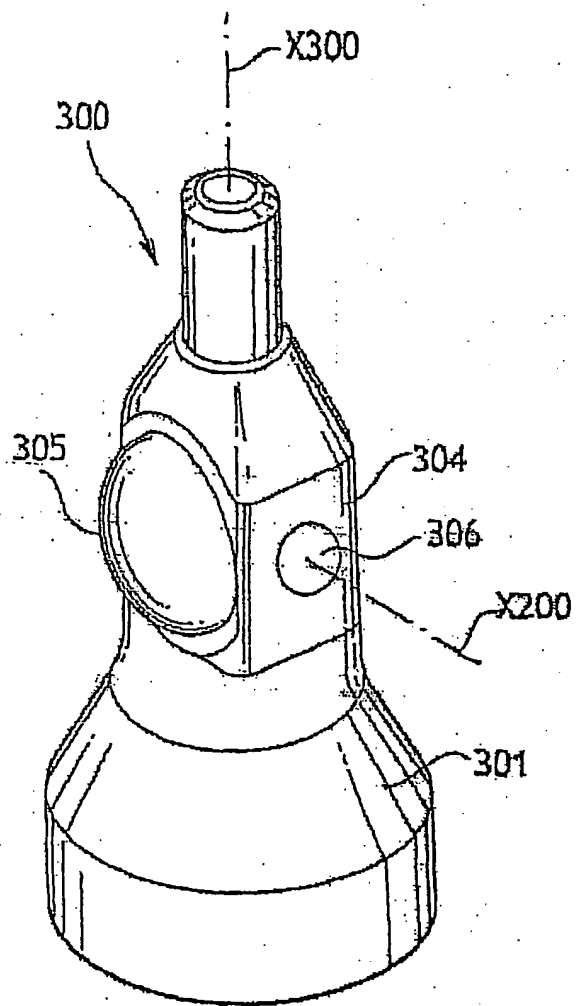
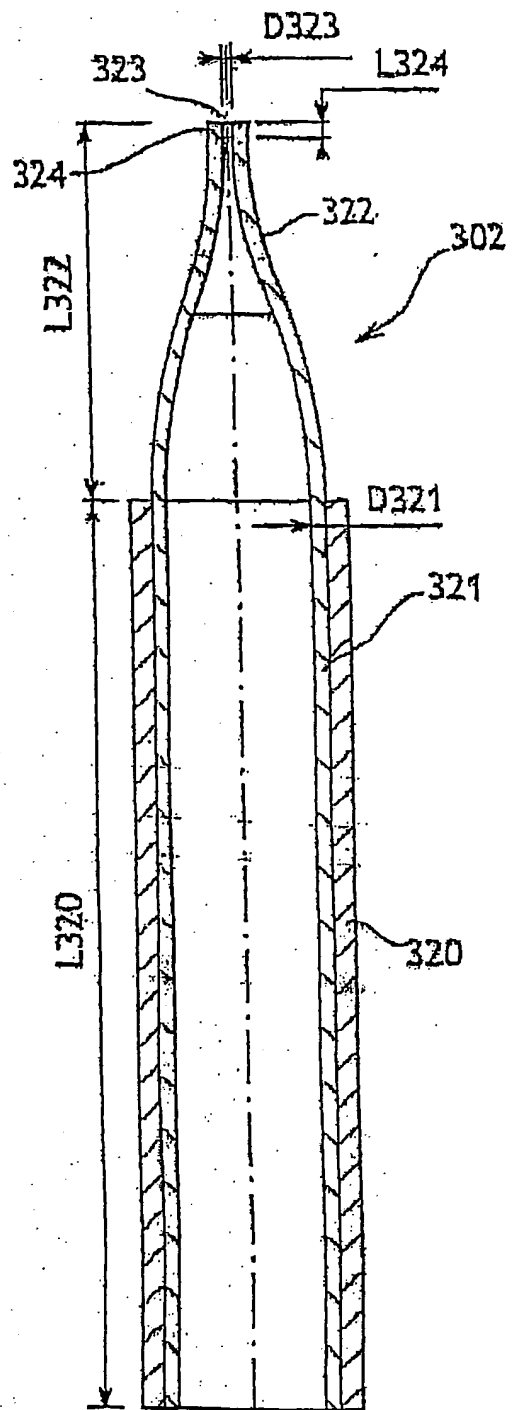


FIG. 3



FIG. 6FIG. 7

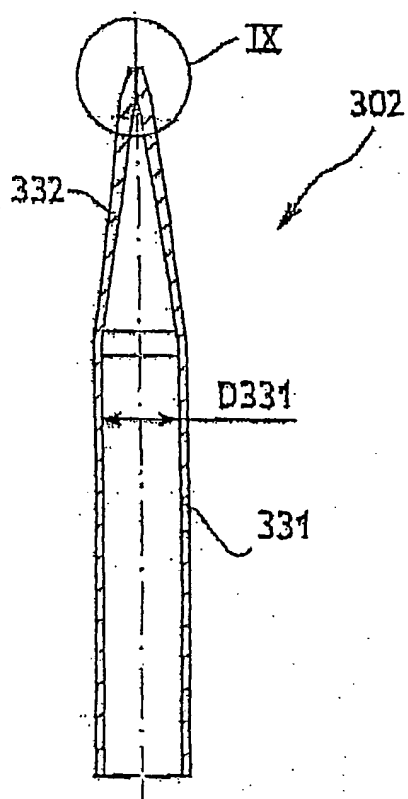


FIG. 8

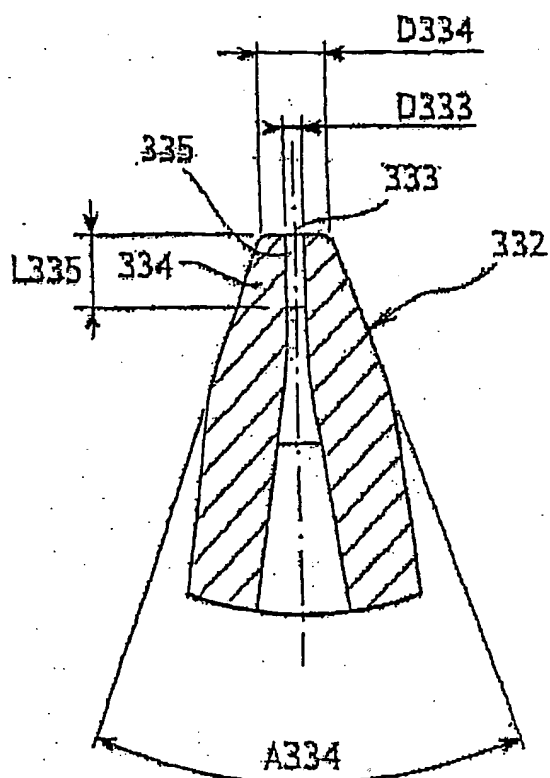
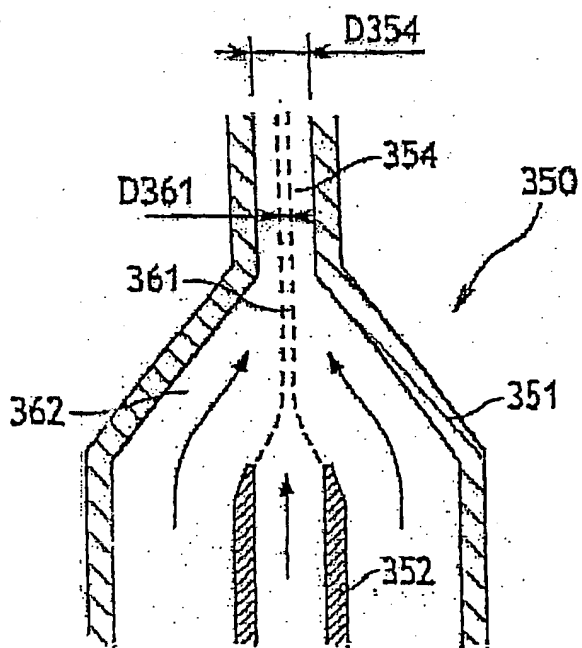


FIG. 9



ESTADO DA TÉCNICA

FIG. 10

BASEADA NA MODALIDADE 3

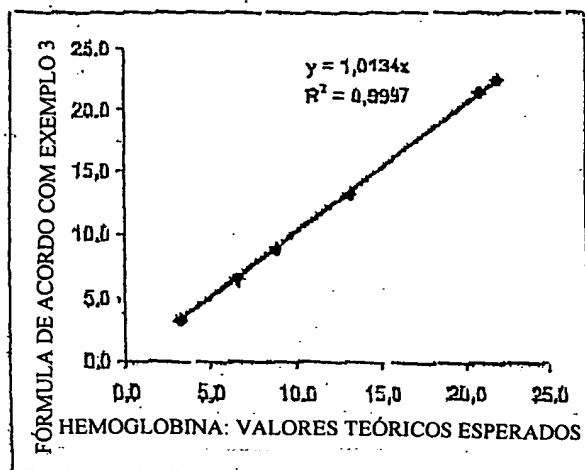


FIG 11a

AMOSTRA CONTENDO 30% DE EOSINÓFILOS

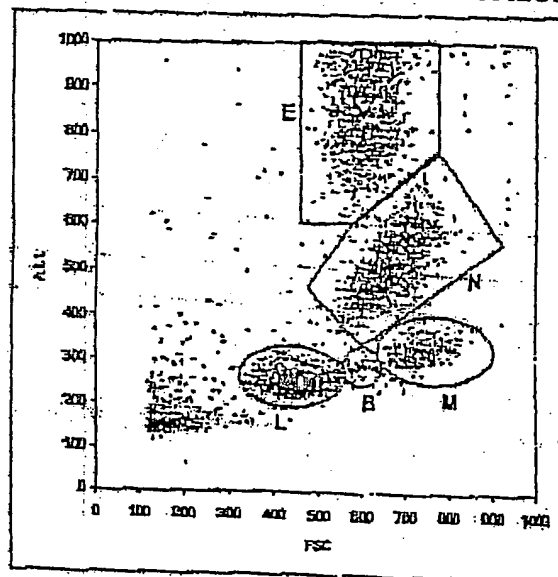


FIG 11b

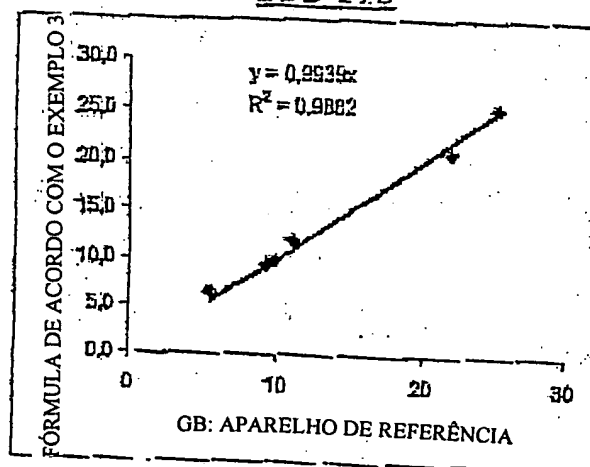


FIG 11c

RESUMO

Patente de Invenção “DISPOSITIVO ÓPTICO PARA ANÁLISE DO SANGUE, APARELHO DE ANÁLISE EQUIPADO COM O MESMO”.

5

A invenção trata de um dispositivo óptico (200) adaptado em particular para a contagem e diferenciação de leucócitos em uma automação de análise de sangue e compreendendo uma fonte de luz tipo LED (201) para iluminar uma amostra de sangue (311) quando flui em um vaso óptico.