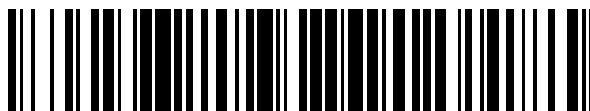


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 697 531**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

B01L 3/02 (2006.01)

G01N 1/14 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2001 E 10004138 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2219021**

54 Título: **Analizador de partículas o células y método**

30 Prioridad:

06.09.2000 US 230380 P

26.04.2001 US 844080

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

24.01.2019

73 Titular/es:

EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)

400 Summit Drive

Burlington, MA 01803, US

72 Inventor/es:

GOIX, PHILIPPE J.;

LINGANE, PAUL J. y

PHI-WILSON, JANETTE T.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 697 531 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

Analizador de partículas o células y método

5 **Breve descripción de la invención**

La presente invención se refiere generalmente a un analizador de partículas o células y más concretamente a un analizador de partículas o células en el que la solución de muestra que contiene las partículas o células se arrastra a través de un capilar para la presentación a un haz de luz conformado.

10 **Antecedentes de la invención**

La detección y el análisis de partículas o células individuales es importante en la investigación médica y biológica. Es particularmente importante ser capaces de medir características de partículas tales como concentración, número, viabilidad, identificación y tamaño. Las partículas o células individuales como se definen en el presente documento incluyen, por ejemplo, bacterias, virus, fragmentos de ADN, células, moléculas y constituyentes de sangre completa.

Normalmente, dichas características de partículas se miden utilizando citómetros de flujo. En los citómetros de flujo, las partículas que son tanto intrínsecamente fluorescentes como que están marcadas con un marcador fluorescente o marca, se focalizan hidrodinámicamente en un fluido laminar y hacen que el flujo pase un haz de energía radiante que excita las partículas o marcas para producir la generación de luz fluorescente. Uno o más fotodetectores detectan la luz fluorescente emitida por las partículas o marcas a las longitudes de onda seleccionadas a medida que fluyen a través del haz de luz y genera señales de salida representativas de las partículas. En la mayoría de citómetros, se usa también un fotodetector para medir la dispersión hacia delante de la luz para generar señales indicativas de la presencia y tamaño de todas las partículas.

La patente de Estados Unidos n.º 5.547.849 describe un citómetro con formación de imágenes de barrido en el que una muestra de fluido biológico sin procesar se hace reaccionar con un agente de unión marcado fluorescentemente. La muestra a la que se ha hecho reaccionar experimenta un mínimo procesamiento antes de que se encierre en un tubo capilar de tamaño predeterminado. El tubo capilar con la muestra encerrada es barrido ópticamente y se registra la excitación fluorescente de una pluralidad de regiones columnares a lo largo del tubo capilar. Cada región columnar se define generalmente por el tamaño del punto del haz de excitación y la dimensión de profundidad del tubo capilar. Se selecciona un filtro espacial de un diámetro de orificio suficiente para permitir la detección volumétrica simultánea de todas las dianas fluorescentes en cada región columnar. Los componentes celulares o partículas se identifican por su concentración.

La técnica anterior adicional incluye el documento US 5,488,469 que se refiere a un aparato analizador de células del tipo que emplea citometría de flujo; y el documento US 5.308.990 que se refiere a un método para medir micropartículas y un instrumento para medir micropartículas.

40 **Objetos y sumario de la invención**

Es un objeto de la presente invención para proporcionar un analizador de partículas que tiene una alta selectividad de partículas.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un analizador de partículas compacto de alta sensibilidad.

Es otro objeto más de la presente invención proporcionar un analizador de partículas portátil para usar en inmunología, microbiología, biología celular, hematología y análisis de células.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un aparato analizador de partículas sencillo de usar, menos caro, para el recuento de partículas en volúmenes pequeños de fluidos de muestras y determinar sus características.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un analizador de partículas para analizar volúmenes bajos de fluidos de muestras de baja densidad.

El anterior y otros objetos de la invención se consiguen mediante un aparato analizador de partículas de acuerdo con la reivindicación 1.

60 **Breve descripción de los dibujos**

El anterior y otros objetos de la invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada cuando se leen junto con los dibujos acompañantes en los que:

La Figura 1 muestra de forma esquemática un analizador de partículas de acuerdo con la presente invención.

La Figura 2 es una vista en planta superior que muestra los componentes ópticos que se muestran en la Figura 1

montados sobre un bastidor de soporte.

La Figura 3 es una vista en elevación frontal parcialmente en sección de la Figura 2.

La Figura 4 es una vista en elevación lateral del sistema óptico que forma el haz.

La Figura 5 es una vista en planta superior del sistema óptico que forma el haz de la Figura 4.

5 La Figura 6 muestra el flujo del fluido de muestra y el sistema de bombeo.

La Figura 7 es una vista en perspectiva de una porción de un capilar utilizado junto con una realización de la presente invención.

La Figura 8 es una vista en perspectiva de una porción de un tubo capilar utilizado junto con otra realización de la presente invención.

10 La Figura 9 muestra de forma esquemática un control y un sistema de adquisición de datos asociado con el analizador de partículas.

La Figura 10 es un diagrama de temporización y de adquisición de datos que ilustra el funcionamiento del analizador de partículas.

La Figura 11 es una vista esquemática de un analizador de partículas de cuatro colores.

15 La Figura 12 ilustra esquemáticamente un analizador que tiene múltiples estaciones de análisis a lo largo del tubo capilar.

La Figura 13 muestra un detector de impedancia para detectar partículas a medida que el flujo pasa más allá de una región de detección.

20 La Figura 14 muestra esquemáticamente un circuito adecuado para correlacionar señales procedentes de un sensor de celda de impedancia con las señales de salida de un fotomultiplicador.

La Figura 15 muestra un analizador de partículas de acuerdo con otra realización de la invención.

Descripción de las realizaciones preferida(s)

25 En referencia a la Figura 1, se ilustra esquemáticamente un analizador de partículas de acuerdo con una realización de la presente invención. Como se usa en el presente documento, "partículas" significa partículas o células, por ejemplo, bacterias, virus, fragmentos de ADN, células de la sangre, moléculas y constituyentes de sangre completa. Un tubo 11 capilar tiene un extremo 12 suspendido adaptado para sumergirse en una solución 13 de muestra retenida en una cubeta o vial 14. Será evidente que, aunque se ilustra un capilar cuadrado, el capilar puede ser cilíndrico o de otra forma, tal como un microcanal. El fluido de muestra se arrastra al extremo del capilar como se muestra por la flecha 16. Como se describirá actualmente, la muestra de fluido o líquido se arrastra a través del capilar mediante una bomba calibrada conectada al otro extremo del capilar. El tamaño o el diámetro del tubo 11 capilar se selecciona de tal manera que las partículas 18 se singularizan a medida que pasan un volumen 19 de visualización a o análisis. Una fuente de luz, preferentemente un láser, 21 emite luz 22 de una longitud de onda seleccionada. La luz es recibida por un sistema 23 de focalización óptica que enfoca dicha luz y forma y dirige un haz 24 al capilar donde este pasa a través del volumen 19 de análisis. El sistema de focalización óptica está configurado para formar un haz rectangular fino uniforme que incide sobre el tubo 11 capilar. El grosor del haz uniforme y las paredes del capilar define el volumen de análisis. A fin de contar todas las partículas que atraviesan el volumen de detección, es decir, las partículas que se etiquetan para emitir fluorescencia y las partículas no etiquetadas, se detecta la luz dispersa. En una realización, un bloqueante 26 del haz se sitúa para interceptar el haz después que este pasa a través del tubo 11 capilar. La luz dispersa por una partícula que fluye a través del haz se dirige sobre un detector 27 por la luz 28. El detector proporciona una señal de salida tal como una ilustrada por el pico 29, cuando una partícula pasa a través del haz y dispersa la luz. el tamaño del pico es dependiente del tamaño de la partícula, y la incidencia del pico indica que una partícula en el volumen 19 (fluorescente o no fluorescente) ha atravesado el haz fino de luz. Otra estrategia es emplear un detector fuera de eje, tal como se ilustra en la Figura 15, para medir la luz dispersa. En dicho caso, no se requiere un bloqueante del haz. Se describe también a continuación un método de impedancia para detectar partículas.

30

35

40

45

Si las partículas son intrínsecamente fluorescentes, o si las partículas se han etiquetado con un colorante fluorescente, emitirán luz 31, a una característica longitud de onda a medida que pasan a través del volumen definido por el haz (24) fino de luz que excita la fluorescencia. La luz fluorescente se detecta en un ángulo con respecto al eje del haz de tal manera que no se detecta la luz del haz directa. En la realización de las Figuras 1-3, una lente 32 colectora recibe la luz fluorescente procedente de las partículas y enfoca esta a los detectores 36 y 37. Los inventores encontraron que inicialmente incluyeron ranuras 33 o 34 orientadas en la dirección del haz fino para bloquear cualquier luz lateral. Sin embargo, los inventores encontraron que si el haz está adecuadamente enfocado en un haz uniforme fino, la luz lateral no es un problema. Esto simplifica mucho el montaje del analizador, debido a que no es necesario alinear cuidadosamente las ranuras. La luz incide sobre un divisor 38 de haz dicróico que pasa luz de las longitudes de onda seleccionadas a través del filtro 39 al detector 36 y deflece la luz de otras longitudes de onda seleccionadas a través del filtro 41 al fotodetector 37. Por ejemplo, el divisor de haz dicróico refleja la luz que tiene longitudes de onda menores de 620 nm, y transmite luz que tiene una longitud de onda mayor. Los filtros 39 y 41 se seleccionan para pasar las longitudes de onda que corresponden a la longitud de onda de fluorescencia esperada procedente de las partículas fluorescentes. En un ejemplo, los filtros 39 y 41 se seleccionaron para pasar luz a 580 nm y 675 nm, respectivamente. Esto permitió la identificación y el recuento de partículas que se habían etiquetado con material fluorescente que emite a estas longitudes de onda en respuesta al haz óptico. Las salidas de los fotodetectores son pulsos tales como los que se ilustran esquemáticamente en 42 y 43, Figura 1.

50

55

60

65

Las Figuras 2 y 3 muestran los componentes de un analizador de partículas de acuerdo con la realización anteriormente descrita montada sobre una placa 51 soporte. La placa 51 soporte transporta un bloque 52 óptico adaptado para recibir y soportar el tubo 11 capilar suspendido. El tubo 11 capilar incluye un conector 53, Figuras 3 y 6, que se recibe en un pocillo 54 para retener y colocar el capilar en el bloque óptico. El capilar 11 se coloca en el

bloque 52 óptico pasándolo por una ranura estrecha (no se muestra) y manteniéndolo en su posición mediante tornillos de fijación con punta de nylon insertados en los agujeros roscados 56 y 57. A medida que se inserta a través del bloque, el tubo capilar se puede ver a través del puerto 58 de visualización. El extremo del tubo capilar se suspende y extiende hacia abajo para su inserción en un vial o cubeta 14 que contiene el fluido o espécimen de muestra. Es evidente que el capilar puede colocarse y suspenderse mediante otras disposiciones de soporte.

En una realización, un miembro de soporte de vial rotatorio que tiene dos brazos 59 se recibe de forma rotable y deslizable por un poste 60 de guiado asegurado a la base. Un soporte 61 de vial se dispone al extremo de cada brazo. En funcionamiento, el soporte se mueve hacia abajo a lo largo del poste 59, se hace rotar para llevar un vial bajo el capilar, y se mueve hacia arriba por lo cual el extremo del capilar se sumerge en el fluido de muestra. A medida que la muestra se analiza, Otro vial con otra muestra puede colocarse en el otro soporte por lo cual se puede poner en relación de cooperación con la punta del capilar tan pronto como el análisis de la muestra anterior se ha completado.

La carcasa 23 para el láser y el sistema de focalización óptica que forma el haz 24 se lleva a cabo en un bloque 62 de montaje. En las Figuras 4 y 5 se muestra el sistema óptico. Este recibe la luz 22 colimada del láser 21 y genera el haz 24 de luz, que incide tras el tubo 11 capilar. El sistema óptico puede incluir, por ejemplo, una primera lente 63 planoconvexa, una segunda lente 64 planoconvexa y una lente cilíndrica 66. La acción de montaje de las lentes es formar un haz rectangular fino de tipo hoja que en un ejemplo tenía 20 μm de grosor a lo largo de la dirección longitudinal del capilar, y 400 μm de ancho en la dirección perpendicular, por lo cual se iluminó un volumen rectangular de muestra. Las flechas 67 y 68, Figuras 4 y 5, muestran la configuración fina y ancha del haz, respectivamente.

El fotodetector 27 se monta sobre el bloque 52 y se soporta axialmente con respecto al eje del haz 24. La barra 26 de bloqueo del haz está montada en el bloque 52 e intercepta y bloquea el haz directo después que pasa a través del capilar 11. La luz dispersa que pasa alrededor de la barra 26 de bloqueo del haz se enfoca sobre el detector 27 por una lente 28. De este modo, la luz dispersa proporcionará una señal de salida para cualquier partícula etiquetada o no etiquetada que fluye más allá del volumen de observación 19, proporcionando por tanto un recuento total de partículas. La salida del detector es entonces representativa del paso de una partícula o agrupación de partículas y del tamaño de la partícula o agrupación de partículas. Como se explicará a continuación, esta, tomada junto con la señal fluorescente, permite el análisis de la muestra. Si el detector 27 se localiza fuera del eje, recibirá solo luz dispersa y no existe necesidad de una barra de bloqueo del haz. Además, este sería menos sensible a la luz lateral en la dirección hacia delante que lleva el ruido de banda ancha del láser que puede enmascarar señales de partículas de bajo nivel.

Como se ha descrito anteriormente, la luz emitida por la fluorescencia de partículas intrínsecamente fluorescentes, o de partículas que se han etiquetado con un colorante o material fluorescente, se detecta en un ángulo con respecto al eje del haz. En referencia a la Figura 2, la lente 32 del condensador es transportada por el bloque 52. La lente 32 recibe la luz fluorescente y enfoca esta a los detectores 36 y 37, que pueden ser fotomultiplicadores, diodos acoplados a carga (CCD), u otros fotodetectores. Más particularmente, la luz fluorescente de la lente 32 incide en un divisor 38 de haz dicróico que divide el haz en dos longitudes de onda, una que pasa a través del divisor de haz y una que se defleja por el divisor 38 de haz dicróico. Los filtros 39 y 41 filtran la luz transmitida y la luz reflejada para pasar solo luz a la longitud de onda de la fluorescencia de las partículas para rechazar la luz en otras longitudes de onda. Si están presentes las ranuras 33 y 34, rechazan cualquier luz lateral de las regiones exteriores del volumen 19 definido por el haz 24 rectangular fino. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, pueden no requerirse ranuras debido a que el efecto de la luz lateral está minimizado. Los fotomultiplicadores u otros fotodetectores proporcionan cada uno una señal de salida que representa la intensidad de la luz en la longitud de onda filtrada. Como se ha descrito anteriormente, el divisor de haz dicróico refleja la luz que tiene longitudes de onda menores de 620 nm, y transmite luz que tiene longitudes de onda mayores. El filtro 39 pasa luz a 580 nm, mientras que el filtro 41 pasa luz a 675 nm. Esto permite el análisis de partículas que se han etiquetado con sustancias fluorescentes que emiten luz a 580 nm y 675 nm para ser contadas individualmente. La salida de los fotomultiplicadores son los pulsos 42 y 43, uno por cada partícula que emite luz a la longitud de onda concreta, tal como aquella ilustrada esquemáticamente en la Figura 1. Es evidente que las longitudes de onda seleccionadas para los filtros dependen de la longitud de onda fluorescente del marcador o la marca colocada a las partículas.

A fin de identificar y contar las partículas en el fluido de una manera volumétrica, el volumen del fluido debe estar correlacionado con el número de partículas detectadas en un volumen dado. En la presente invención, la muestra de fluido se arrastra a través del tubo capilar a una velocidad constante mediante una bomba o jeringuilla 71 calibrada operada eléctricamente, Figura 6. La bomba puede ser cualquier otro tipo de bomba que pueda arrastrar un volumen conocido de muestras a través del capilar. La bomba se conecta al tubo capilar mediante un conducto o tubo 72. Esto permite cambiar los capilares 11 para sustituir un capilar limpio o un capilar que tiene un diámetro diferente que puede ser necesario para diversos tipos y tamaños de partículas o células. Como se ilustra, la bomba comprende

una bomba de jeringuilla en la que la muestra de fluido se arrastra en el capilar moviendo el émbolo 73. La bomba 71 está también conectada a un conducto 74 de residuos o drenaje que incluye una válvula 76. Cuando la válvula se cierra, la bomba arrastra la muestra desde el vial o la cubeta a través del tubo 11 capilar más allá del volumen 19 de detección. Después que se ha completado un análisis, la válvula 76 se abre, por lo cual se invierte la dirección del émbolo 73 que hace que el fluido fluya a través del conducto 74 en el contenedor 77 de residuos. De acuerdo con una característica de la presente invención, el diámetro del tubo 74 de residuos se selecciona para ser muchas veces, 10 o más, el del capilar, por lo cual prácticamente todo el fluido de la jeringuilla se descarga en los residuos. Por ejemplo, si existe un factor de diez proporciones en el diámetro, solo 1/10.000 del fluido viajará posteriormente a través del capilar, una cantidad despreciable.

La bomba se diseña de tal manera que un movimiento predeterminado del émbolo 73 arrastrará un volumen conocido de muestra a través del tubo capilar. La bomba puede calibrarse para cada capilar arrastrando un fluido en la bomba moviendo el émbolo una distancia conocida y a continuación descargando el fluido y midiendo el volumen del fluido descargado. Posteriormente, para un movimiento dado del émbolo, se conoce el volumen de muestra que fluye a través del volumen de análisis. El volumen puede determinarse tanto midiendo el movimiento del émbolo como midiendo el tiempo que el émbolo se mueve si se calibra como una función del tiempo. Aunque se describe una bomba de jeringuilla, se pueden usar otros tipos de bombas que pueden arrastrar volúmenes conocidos de fluido a través del capilar.

Preferentemente, los tubos capilares son de configuración rectangular. Las Figuras 7 y 8 muestran un tubo capilar que incluye un revestimiento 81 opaco que se retira sobre un área 82, Figura 7, u 83, Figura 8. En la realización de la Figura 7, el haz se proyecta a través de la ventana 82, que tiene una configuración rectangular para aceptar el haz 24. En la Figura 8, la ranura enmascara las paredes del tubo capilar y evita la difracción de la luz por las paredes. Una combinación de las dos máscaras confinaría la luz detectada a la de la emitida por una partícula que viaja a través del capilar para bloquear cualquier luz lateral.

Un ejemplo del funcionamiento del aparato para analizar una muestra que contiene partículas que no fluorescen, y partículas que fluorescen intrínsecamente o están marcadas o etiquetadas para fluorescer, en dos longitudes de onda diferentes, por ejemplo 580 nm y 675 nm, se proporciona ahora con referencia a las Figuras 9 y 10.

Con el émbolo 73 de la bomba de jeringuilla extendido para vaciar la bomba, el vial de muestra que contiene las partículas se coloca para sumergir el extremo del capilar 11 en la muestra. A continuación, la muestra se arrastra a través del capilar aplicando una señal de control desde el controlador 121 para iniciar la bomba 71. El controlador recibe el comando desde el procesador 122. La bomba 71 se impulsa a una velocidad constante por lo cual el volumen de muestra que pasa a través del volumen 19 de análisis puede medirse temporalizando el periodo de recuento. Después que la muestra ha sido arrastrada desde el vial durante un tiempo predeterminado para asegurar que la nueva muestra ha alcanzado el volumen 19, el procesador comienza a procesar la salida 29 del fotodetector de dispersión y las salidas 42 y 43 de los fotodetectores y esto durante un tiempo predeterminado que representará un volumen conocido de muestra que pasa a través del volumen de análisis. El tiempo de procesamiento se ilustra esquemáticamente en la Figura 10A mediante la curva 123. La Figura 10B ilustra los pulsos 28 de salida del detector de dispersión. Se observa que existen partículas individuales que proporcionan una traza 124 y una agrupación de partículas que proporciona una traza 126. La Figura 10C muestra trazas 126 de partículas que fluorescen a una primera longitud de onda, por ejemplo, 675 nm. Es de señalar el hecho de que la agrupación 126 incluye tres de dichas partículas. La Figura 10D muestra trazas 127 de partículas que fluorescen en otra longitud de onda, por ejemplo, 750 nm. Es de señalar el hecho de que existe también una de dichas partículas 128 en la agrupación 126. El procesador puede invocar numerosos ciclos de análisis. Finalmente, cuando se ha completado un análisis, el procesador instruye al controlador a abrir la válvula 76 e invierte la bomba para descargar la muestra analizada en los residuos 77. A continuación se puede instalar una cubeta con una nueva muestra y analizarse una nueva muestra. El procesador puede configurarse para promediar los recuentos de numerosos ciclos y procesar los recuentos que representa la concentración de las diversas partículas, el número de partículas, etc. Utilizando marcas o marcadores adecuados se pueden llevar a cabo ensayos de viabilidad y ensayos de cribado de anticuerpos o controlar la apoptosis.

Aunque el aparato se ha descrito para un análisis de dos colores, puede modificarse fácilmente para un análisis de cuatro colores. Esto se muestra esquemáticamente en la Figura 11. El haz de luz de entrada 24 incide en el volumen de análisis 19. El fotodetector 27 y la lente 28 asociada proporcionan la señal de dispersión. La luz 31 fluorescente se enfoca por la lente 32 para pasar a través de tres divisores 81, 82 y 83 de haces dicróicos que reflejan la luz en tres longitudes de onda diferentes a través de los filtros 86, 87 y 88 sobre los fotodetectores 91, 92 y 93. La luz a la cuarta longitud de onda, que pasó por tres divisores 81, 82 y 83 de haces dicróicos, pasa a través del filtro 94 sobre el fotodetector 96. De este modo, hasta cuatro diferentes partículas que fluorescen intrínsecamente o que están marcadas para fluorescer a cuatro longitudes de onda diferentes pueden analizarse seleccionando las longitudes de onda que se reflejan de forma adecuada para el divisor de haz dicróico y los filtros.

La Figura 12 muestra esquemáticamente un sistema que utiliza una pluralidad de fuentes de luz (no se muestra) que proyectan haces de luz 106, 107 y 108 para analizar los volúmenes 111, 112 y 113, que están aparte a una distancia predeterminada. La luz dispersa indicada por las flechas 114, 116, 117 se detecta mediante sistemas detectores

individuales del tipo descrito. La luz fluorescente representada por las flechas 118, 119 y 121 se detecta por los sistemas de análisis individuales del tipo descrito anteriormente. Esta disposición permite analizar partículas que se han etiquetado con diferentes marcas seleccionando la longitud de onda de la fuente de luz para excitar diferentes etiquetas o marcadores fluorescentes. Como alternativa, la pluralidad de haces de luz se puede proyectar sobre un único volumen de análisis y los sistemas de análisis individuales reciben las diferentes longitudes de onda fluorescentes.

Más bien que las partículas sensibilizadas por la luz dispersa por las partículas, un cambio en la corriente eléctrica puede detectar las partículas a medida que viajan más allá de electrodos separados dispuestos en lados opuestos de la ruta de flujo. En referencia a la Figura 13, se muestra un capilar 11 con electrodos 123 y 124 separados que se extienden en el capilar 11. Los electrodos se separan a lo largo del capilar del volumen 19 de análisis. A medida que la célula o partícula fluye entre los electrodos, el fluido de trabajo conductivo eléctricamente se desplaza y se puede detectar el cambio resultante en la corriente (impedancia). Este método evita cualquier problema de ruido del láser. Es usualmente más conveniente mecánicamente colocar los electrodos a lo largo de la ruta de flujo fluido tanto antes como después del punto donde el haz 24 láser incide sobre el capilar. Esto crea un problema de temporalización en el que el detector de la impedancia detectará una célula en un punto diferente en el tiempo que el detector de fluorescencia, y es posible que una segunda célula próxima al primero pueda crear una señal en el detector de fluorescencia al mismo tiempo que la primera célula crea una señal en el canal de la impedancia. Este necesita el uso de un elemento de retardo para cambiar una señal en el tiempo con respecto a la otra por una cantidad igual a la distancia entre los dos detectores dividida por el caudal, de tal manera que las dos señales de una célula se vuelven congruentes. Este elemento de retardo puede implementarse en el hardware con una línea o circuito de retardo. La Figura 14 muestra la señal 126 de salida procedente del sensor de la celda de impedancia y la señal fluorescente 42 o 43 (Figura 1) con un retardo 127 en la señal del fotomultiplicador, por lo cual las señales están correlacionadas. Esto se puede implementar también en el software muestreando la señal de cada detector en su propia corriente de datos y a continuación desplazando una corriente de datos con respecto a la otra. Una característica adicional de esta disposición es que, si se conoce la distancia física entre los dos detectores, entonces se puede deducir el caudal real encontrando el retraso que corresponde a la mejor correlación entre los dos canales; esto puede ser útil cuando se trata de identificar un capilar obstruido.

Como se ha explicado anteriormente, los inventores han descubierto que debido a que la iluminación que atraviesa el capilar está en la forma de un haz rectangular fino, el volumen de detección se define de forma precisa por el grosor del haz y las paredes del capilar 11. Pensando en esto, los inventores llevaron a cabo experimentos en los que se eliminaron las ranuras 33 y 34. Los inventores encontraron que los resultados obtenidos en los ensayos de las partículas marcadas de forma diversa fueron comparables a los obtenidos con las ranuras. En referencia a la Figura 17, se ilustra de forma esquemática una realización de la invención que hace uso de este descubrimiento. El detector de partículas incluye una fuente de luz, por ejemplo un láser, cuya salida está ópticamente enfocada por la óptica 23 para formar un haz 24 uniforme fino, como se ha descrito anteriormente. El haz atraviesa el capilar 11 para definir el volumen 19 de detección. El detector de dispersión incluye un montaje de detector fuera de eje que incluye un grupo de lentes 26a y un detector 27a. En la medida de lo posible, la luz fluorescente emitida por las células o partículas etiquetadas se reúne o intercepta por un montaje de detector fuera de eje. Se puede reunir por una lente condensadora como se ilustra en la Figura 1. Sin embargo, en la presente realización, se recoge mediante una guía de luz 141 que recibe la luz 142 y transporta este al divisor de haz 143. El haz de luz se dirige a los filtros 144 y 146 y directamente a los detectores 147 y 148. Las señales de salida procedentes de los detectores y las señales de dispersión se procesan para proporcionar recuentos de partículas, viabilidad celular, cribado de anticuerpos, etc.

Se ha proporcionado un aparato analizador de partículas sencillo de usar para caracterizar partículas tales como determinar su recuento, viabilidad, concentración e identificación. El aparato analizador detecta partículas en un fluido de muestra que fluye a través de un tubo capilar que tiene un extremo de muestreo para la inserción en un fluido, y una bomba acoplada al otro extremo para arrastrar la muestra a través del capilar. Se proporciona una fuente de luz para proyectar un haz de luz a través de un volumen de análisis predeterminado del tubo capilar para excitar la fluorescencia en las partículas que fluyen a través del volumen. Al menos un detector se dispone para recibir la luz fluorescente de las partículas excitadas y otro detector se dispone para proporcionar una señal que representa todas las partículas que fluyen a través del volumen de análisis. La salida de dichos detectores proporciona señales que se pueden procesar para proporcionar las características de las partículas.

Las descripciones anteriores de realizaciones específicas de la presente invención se han presentado a fines de ilustración y descripción. No se pretende que sean exhaustivas o limiten la invención a las formas precisas divulgadas, y, obviamente, son posibles muchas modificaciones y variaciones a la luz de la enseñanza anterior. Se seleccionaron y describieron las realizaciones a fin de explicar mejor los principios de la invención y su aplicación práctica, para permitir de ese modo a otros expertos en la materia usar mejor la invención y las diversas realizaciones con diversas modificaciones que son adecuadas al uso concreto contemplado. Se pretende que el alcance de la invención se defina por las reivindicaciones adjuntas al presente documento y sus equivalentes.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato analizador de partículas que comprende:

- 5 un tubo (11) capilar de una sección transversal interna predeterminada seleccionado de tal manera que singulariza partículas que fluyen a su través,
 un divisor, una bomba (71) conectada al primer brazo del divisor,
 un conducto (72) capilar que se extiende desde el segundo brazo del divisor y se conecta a un extremo del tubo (11) capilar,
 10 una fuente de luz (21) para iluminar un volumen (19) de análisis predeterminado de fluido en el tubo capilar, al menos un detector (36) para detectar luz fluorescente emitida por partículas que fluyen a través del volumen en respuesta a la iluminación, y un detector (18) para detectar partículas que fluyen a través del volumen de análisis;
 en el que el aparato se **caracteriza por**:
 15 un conducto (74) de descarga y una válvula (76) dispuesta en el conducto de descarga y conectada al tercer brazo del divisor, por lo cual cuando la válvula se cierra, la bomba se conecta de tal manera que, en uso, el fluido se arrastra desde el otro extremo del tubo capilar a través del tubo capilar, y cuando la válvula se abre, la bomba se conecta de tal manera que en uso, descarga la muestra de fluido arrastrada previamente a través del tubo capilar;
 20 en el que el conducto (74) de descarga tiene un diámetro de al menos 10 veces el diámetro de la sección transversal interna del tubo (11) capilar.

2. Un aparato analizador de partículas como en la reivindicación 1 en el que el al menos un detector (36) para detectar la luz fluorescente emitida por las partículas en el volumen incluye:

- medios (32, 33, 34) para reunir la luz fluorescente emitida por las partículas en el volumen,
 un divisor (38) de haz para recibir la luz reunida y que refleja luz por encima de una longitud de onda predeterminada y que pasa luz por debajo de la longitud de onda predeterminada,
 30 un primer detector (36) para recibir la luz transmitida y proporcionar una primera señal de salida de las partículas etiquetadas para emitir luz por debajo de la longitud de onda predeterminada,
 un segundo detector (37) para recibir la luz reflejada y proporcionar una segunda señal de salida de las partículas etiquetadas para emitir luz por encima de la longitud de onda predeterminada.

3. Un aparato analizador de partículas como en la reivindicación 2 en el que la longitud de onda predeterminada es de 620 nm, la luz por debajo de la longitud de onda predeterminada es de 580 nm, y por encima de la longitud de onda predeterminada es de 675 nm.

4. Un aparato analizador de partículas como en la reivindicación 3 que incluye un filtro (39, 41) intercalado entre el divisor (38) de haz y cada detector (36, 37) para pasar luz a 580 nm y 675 nm, respectivamente.

5. Un aparato analizador de partículas como en la reivindicación 2 en el que los medios para reunir la luz fluorescente emitida comprenden: una lente (32) para recoger la luz, y una ranura (33, 34) colocada frontalmente del al menos un detector para definir el volumen de análisis observado por el detector.

6. Un aparato analizador de partículas como en la reivindicación 1 en el que el al menos un detector (36) para detectar la luz fluorescente emitida por las partículas en el volumen incluye una pluralidad de detectores (36, 37) configurados para detectar la luz fluorescente emitida a una pluralidad de diferentes longitudes de onda.

7. Un aparato analizador de partículas como en la reivindicación 6 en el que la fuente (21) de luz para iluminar el volumen predeterminado ilumina el volumen con luz de una pluralidad de diferentes longitudes de onda.

8. El aparato analizador de partículas de la reivindicación 1 en el que el tubo (11) capilar tiene una sección transversal interna rectangular.

9. El aparato analizador de partículas de la reivindicación 1 en el que la bomba (71) es una bomba que funciona eléctricamente, y se configura para arrastrar el fluido de muestra a una velocidad constante.

10. El aparato analizador de partículas de la reivindicación 1 en el que la bomba (71) es una bomba de jeringa, y se configura para arrastrar el fluido de muestra a una velocidad constante.

11. El aparato analizador de partículas de la reivindicación 10 en el que la bomba (71) de jeringa comprende un émbolo (73) móvil de una manera predeterminada.

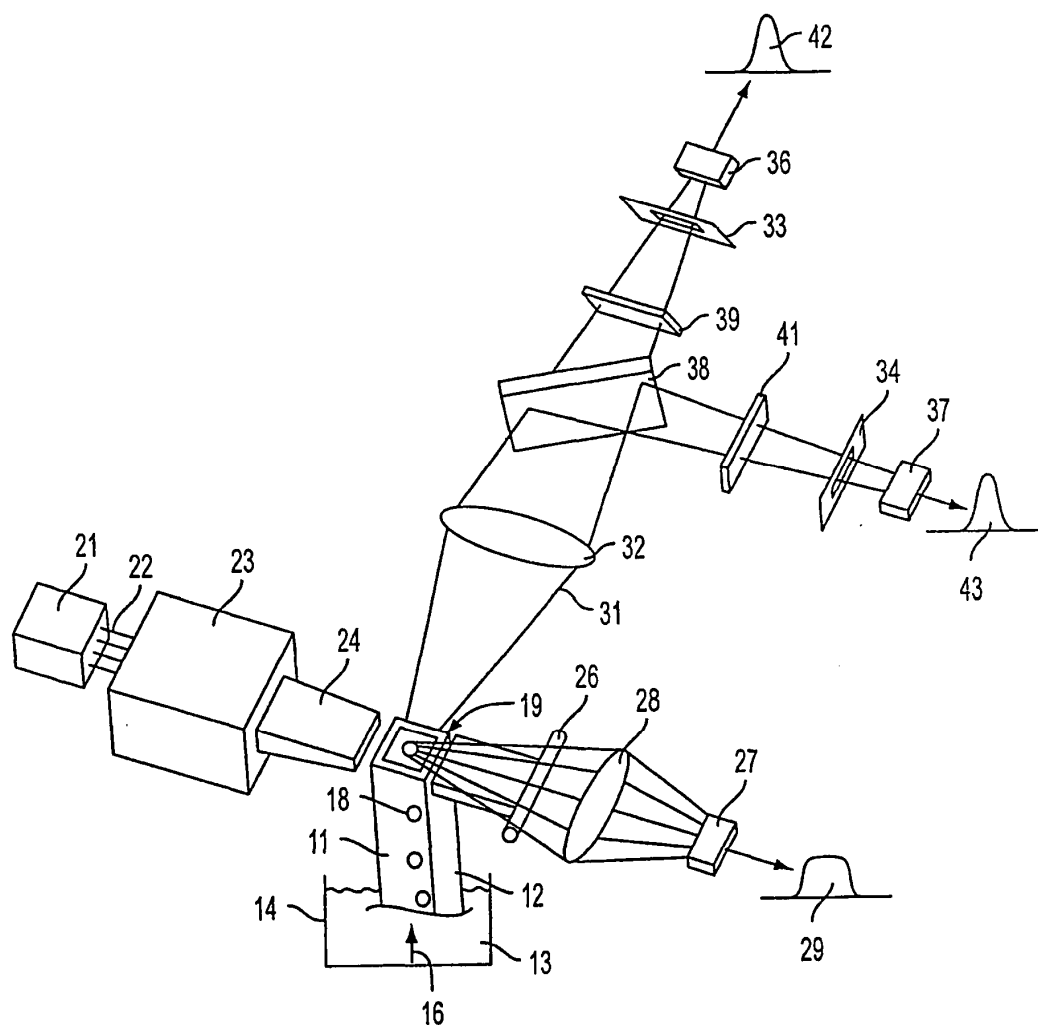


FIG. 1

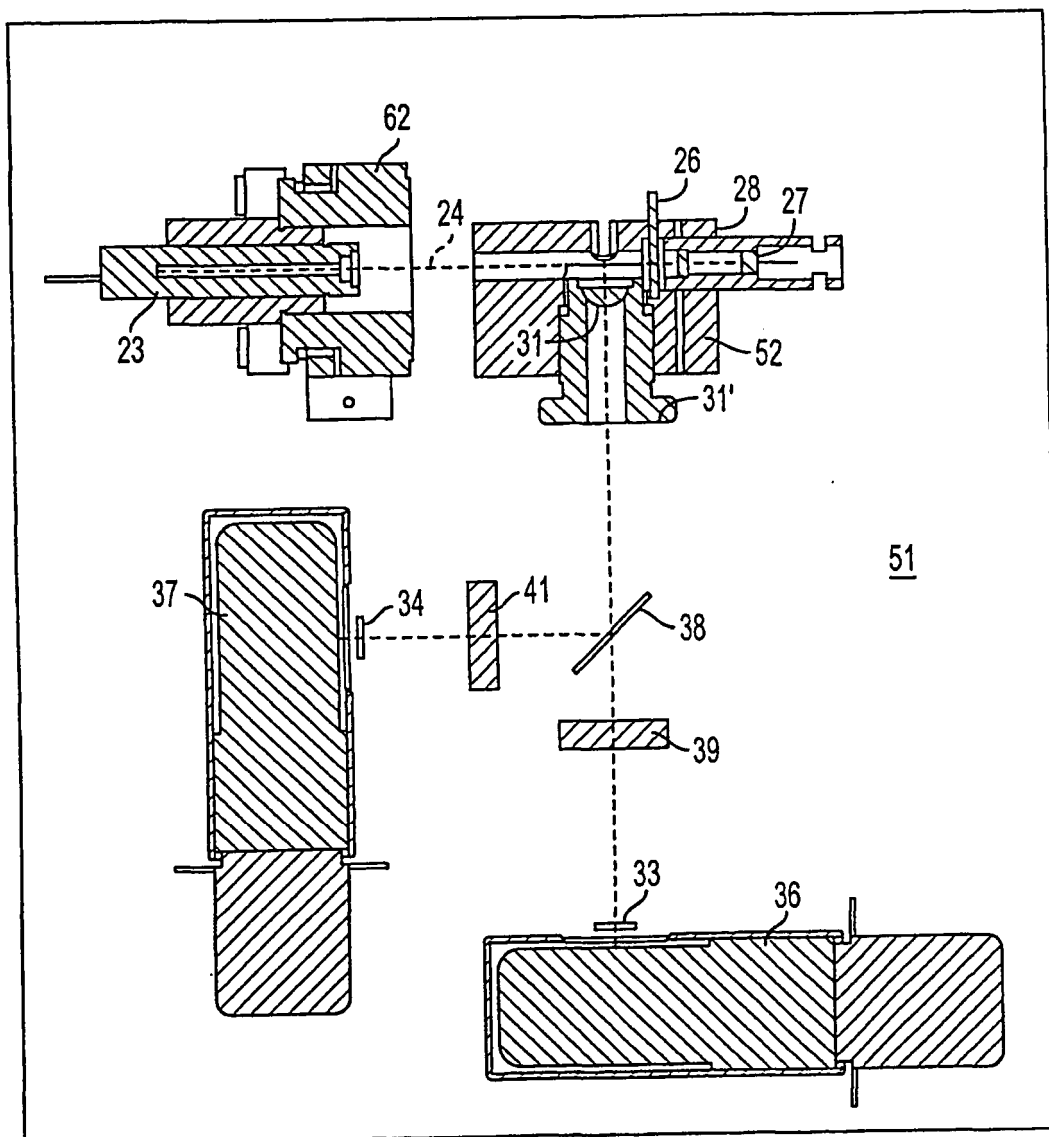
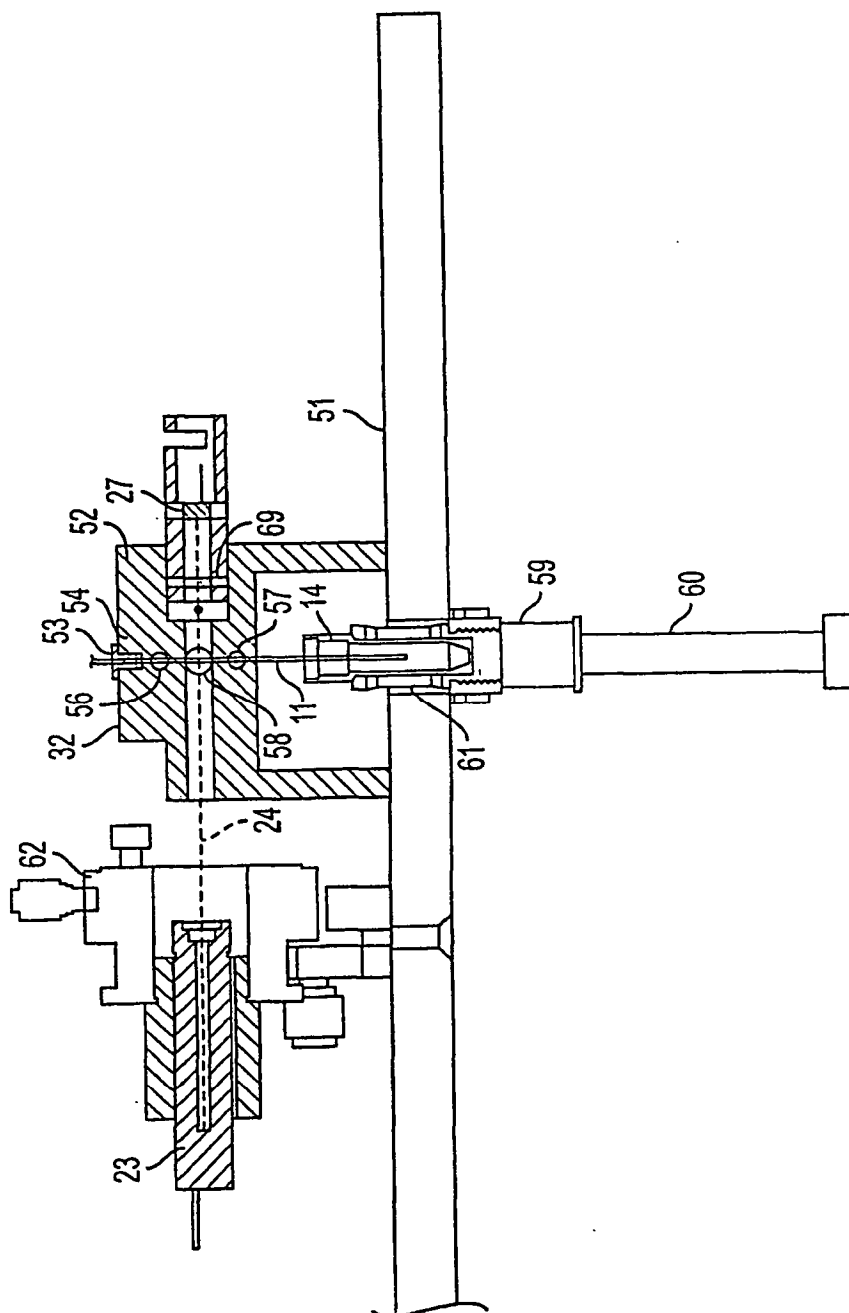


FIG. 2



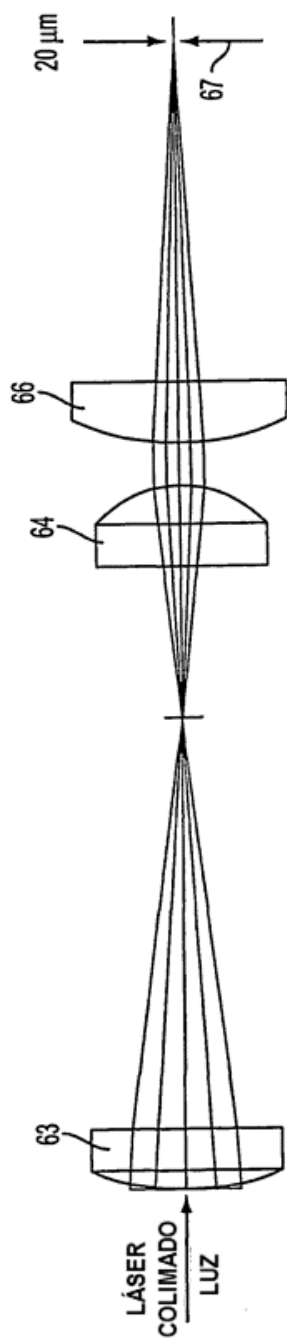


FIG. 4

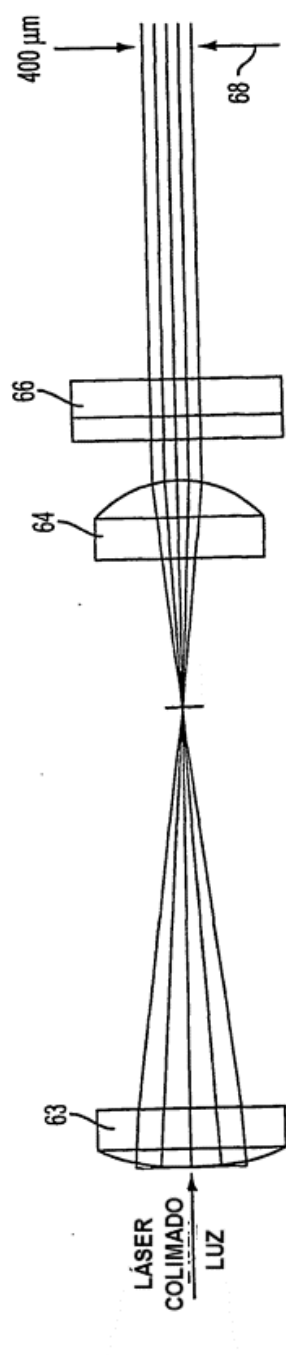


FIG. 5

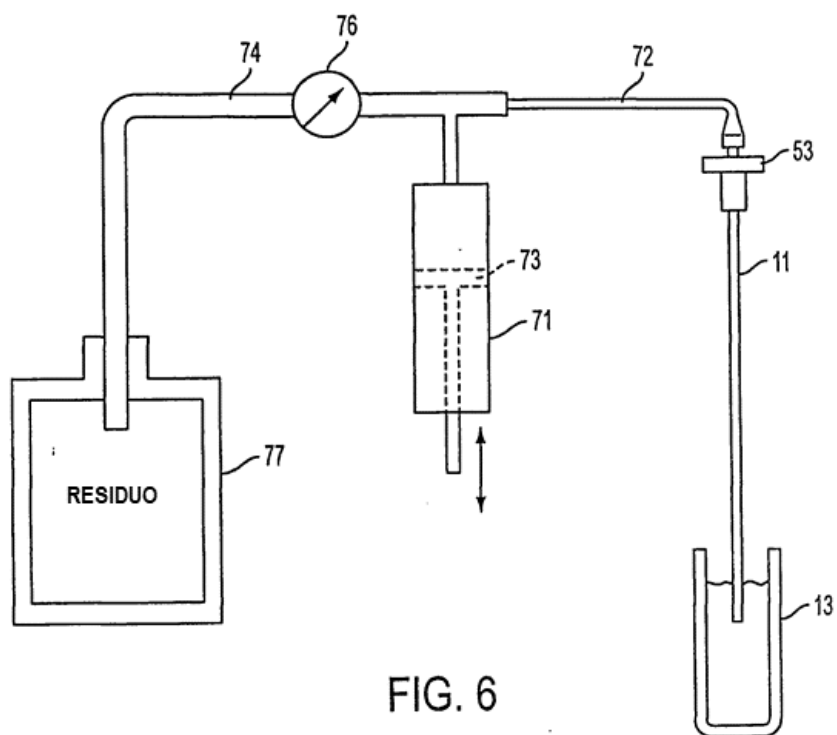


FIG. 6

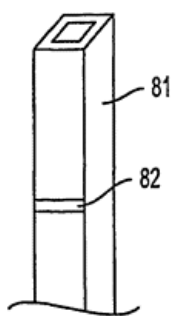


FIG. 7

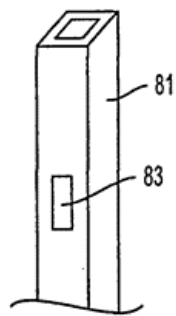


FIG. 8

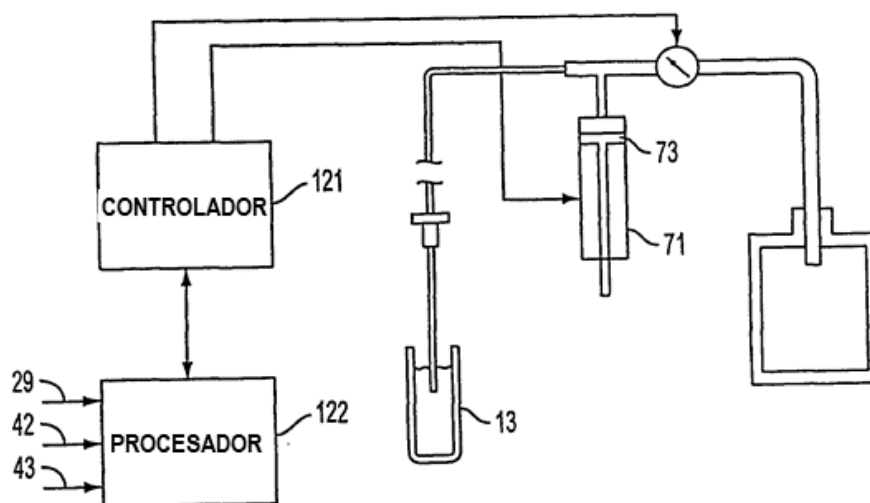


FIG. 9

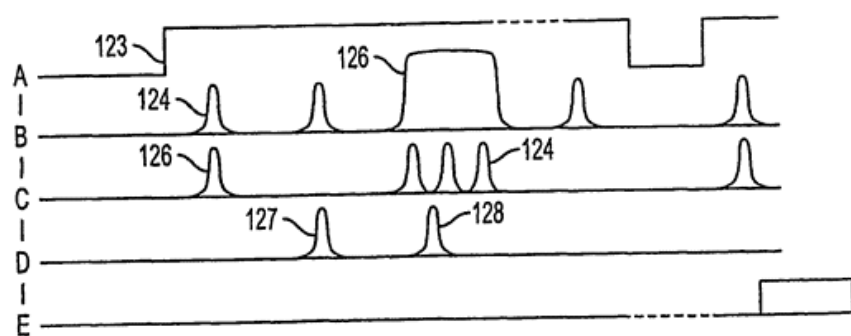


FIG. 10

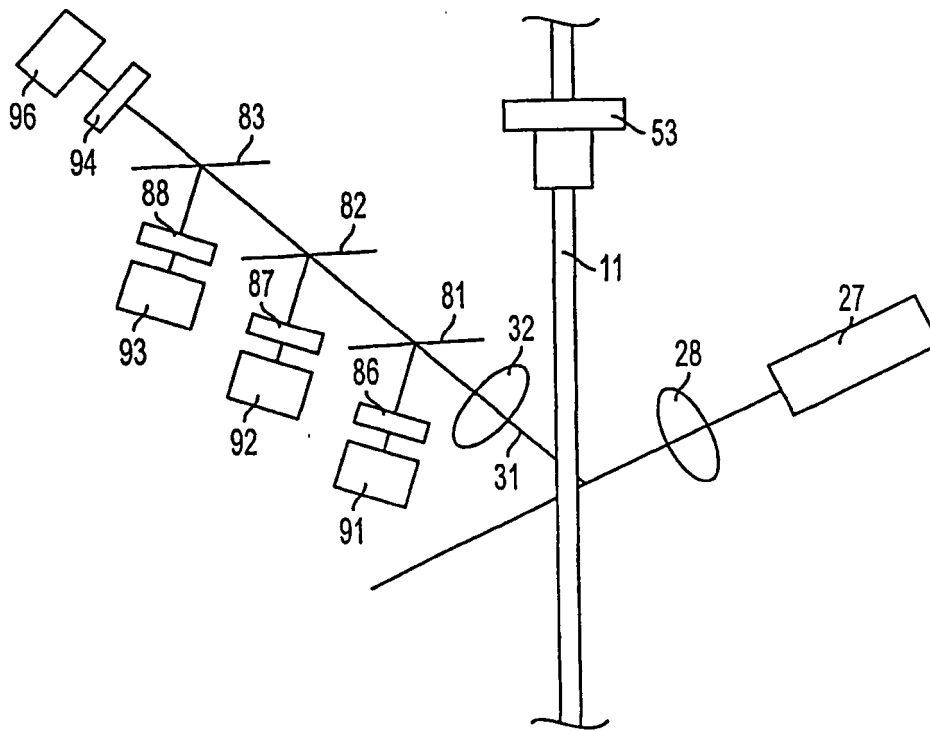


FIG. 11

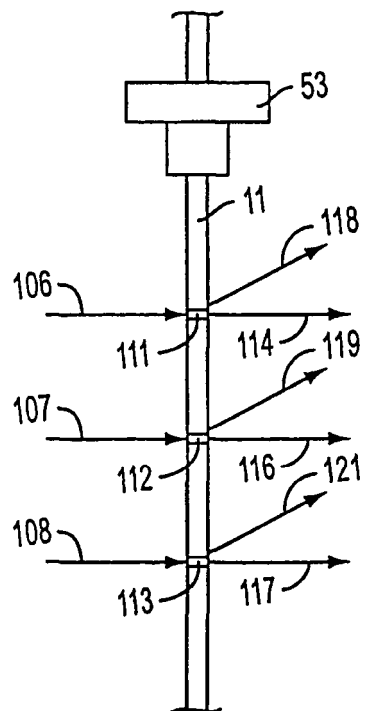


FIG. 12

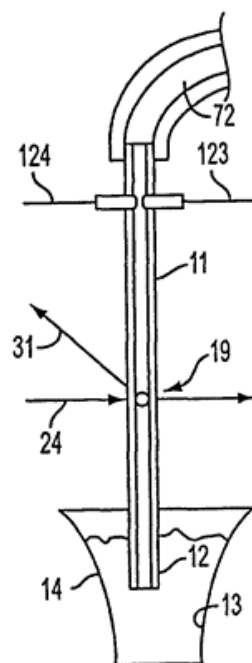


FIG. 13

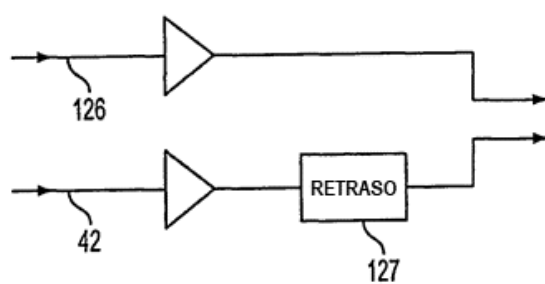


FIG. 14

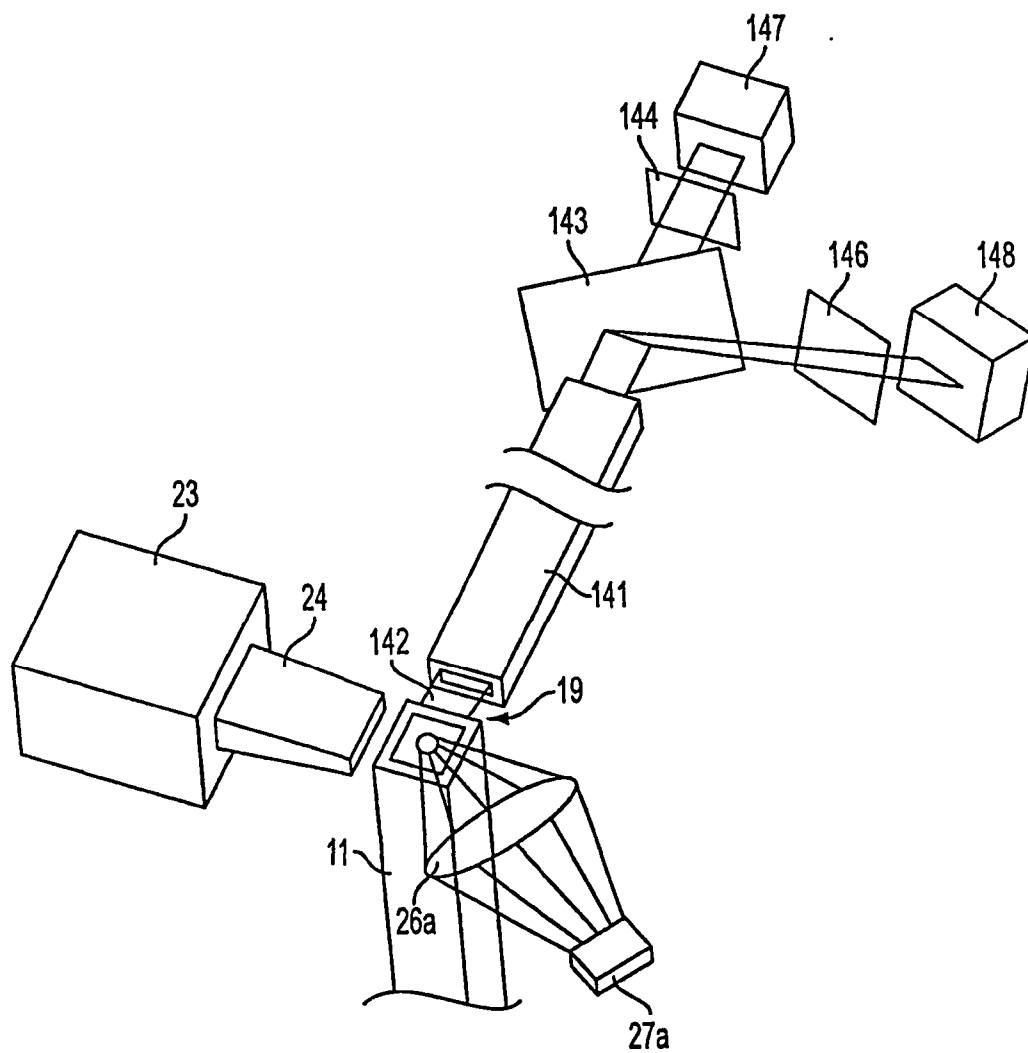


FIG. 15