
Octrooiraad



Nederland

⑩ A Terinzagelegging ⑪ 8201972

⑲ NL

- ⑤4 **Scheidingsorgaan.**
- ⑤1 Int.Cl³: G01N 1/00.
- ⑦1 Aanvrager: Coulter Electronics Inc. te Hialeah, Florida, Ver. St. v. Am.
- ⑦4 Gem.: Ir. F.X. Noz c.s.
Algemeen Octrooibureau
Boschdijk 155
5612 HB Eindhoven.

-
- ②1 Aanvraag Nr. 8201972.
- ②2 Ingediend 13 mei 1982.
- ③2 Voorrang vanaf 14 mei 1981.
- ③3 Land van voorrang: Ver. St. v. Am. (US).
- ③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 263711 .
- ⑥2 - -

-
- ④3 Ter inzage gelegd 1 december 1982.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Korte aanduiding: Scheidingsorgaan.

De uitvinding heeft betrekking op een scheidingsorgaan voor het scheiden van klusters van biologische cellen in een monstersuspensie, welk monster aanwezig is in een beker. Met name heeft de uitvinding be-
 5 trekking op scheidingsorganen voor cellulaire suspensies ter bereiding van monsters die verder kunnen worden geanalyseerd.

Het scheiden van klusters van cellen in weefselmonsters, schraapsel en lichaamsvloeistoffen is vaak gewenst voor visuele analyse en het is van groot belang voor kwantitatieve analyse, met name bij ge-
 10 automatiseerde inrichtingen. Diverse technieken, zowel mechanische als chemische zijn toegepast om celklusters te scheiden. Voor bepaalde toepassingen, met name bij celcultures, werken de chemische technieken goed. Voor veel toepassingen echter zijn deze technieken te agressief. Mechanische
 15 bewerkingen die zijn toegepast omvatten schudden en roeren, geforceerde filtratie, homogeniseren, spuiten en ultrasone roerbewerkingen zoals nader toegelicht in de volgende artikelen.

- 1) G.L. Garcia en W.E. Tolles, "Ultrasonic disaggregation of cell clusters", J. Histochem. Cytochem., 25:508, 1977,
- 20 2) B.H. Mayall, "Monodisperse cell samples: the problem and possible solutions", in The Automation of Uterine Cancer Cytology, uitgegeven door G.L. Wied, G.F. Bahr en P.H. Bartels, Tutorials of Cytology, Chicago, 1976, blz. 61,
- 3) F. Miller "Cytopreparatory methods: collection smearing
 25 staining, screening, reporting", Compendium of Cytopreparatory Techniques, uitgegeven door C.M. Keebler, J.W. Reagan en G.L. Wied, Tutorials of Cytology, Chicago, 1976, blz. 59,
- 4) L.L. Wheelles Jr. en M.A. Onderdonk, "Preparation of clinical gynecologic specimens for automated analysis: an overview",
 30 J. Histochem. Cytochem., 22:522, 1974, en
- 5) D.L. Rosenthal, E. Stern, C. McLatchie, A. Wu, L.D. Lagasse, R. Wall en K.R. Castleman, "A simple Method of Producing a Monolayer of Cervical Cells for Digital Image Processing", Anal. Quant. Cytol., 1:84, 1979.

35 Van alle mogelijke methoden die zijn beschreven in deze artikelen is het spuiten zonder twijfel de beste methode voor het doen scheiden van cellen. Bij het gebruik van een spuit wordt de celsuspensie herhaaldelijk door de naald van de spuit gespoten. De schuif-

krachten bij het uiteinde van de naald zijn sterk genoeg om de klusters van de cellen uit elkaar te halen.

De onderhavige uitvinding is gericht op een inrichting voor het uiteenhalen of scheiden van klusters van biologische cellen in een monster-
 5 suspensie, welke inrichting een beker omvat die de monstersuspensie bevat, en wordt hierdoor gekenmerkt, dat een rotor is aangebracht in de beker en roterende organen voor het doen roteren van de rotor om afschuifspanningen te kunnen bewerkstelligen, zodat de klusters van cellen aanwezig in de monstersuspensie tussen de rotor en de beker van elkaar
 10 worden gescheiden. Volgens een uitvoeringsvorm van de inrichting kan een concentrisch binnenste flesje worden aangebracht op de bodem van de beker tussen de rotor en de binnenwand van de beker om de fracties met verschillende dichtheden te kunnen verzamelen. Volgens een andere uitvoeringsvorm van de inrichting kan een binnenste holte worden gevormd
 15 in de rotor met een aantal gaten die zich uitstrekken door de rotor zodat de centrifugale kracht de vloeistof vanuit de holte door de opening kan persen. Volgens een andere uitvoeringsvorm van de inrichting kan de rotor worden voorzien van een spiraalvormig, wormvormig buitenoppervlak en dit is aangebracht binnen een cap met een aantal gaten met een grote
 20 diameter, aangebracht in het bovenste gedeelte en een aantal gaten met een kleinere diameter aangebracht in het onderste gedeelte.

Met behulp van de inrichting volgens de uitvinding kan een hoge opbrengst aan enkelvoudige cellen worden verkregen, zonder dat een aanzienlijke verdere cellulaire beschadiging optreedt door de toegepaste
 25 techniek, binnen een tijdsduur die aanzienlijk korter is dan kon worden bewerkstelligd met bekende werkwijzen.

De uitvinding zal nader worden toegelicht aan de hand van de volgende beschrijving, waarbij is verwezen naar de bijgevoegde tekening, welke uitvoeringsvormen niet als beperkend moeten worden opgevat.

30 Fig. 1 is een perspectivische tekening van een eerste uitvoeringsvorm van een scheidingsorgaan volgens de uitvinding,

fig. 2 is een perspectivische tekening van een deel van een eerste modificatie van de scheidingsapparatuur weergegeven in fig. 1,

35 fig. 3 is een dwarsdoorsnede van een tweede modificatie van de uitvoeringsvorm volgens fig. 1, waarbij de dwarsdoorsnede is genomen over de lijn 3-3 in fig. 4,

fig. 4 is een dwarsdoorsnede, bovenaanzicht van de modificatie die is weergegeven in fig. 3, genomen over de lijnen 4-4 en

fig. 5 is een zijaanzicht van een andere uitvoeringsvorm van het scheidingsorgaan volgens fig. 1.

Een scheidingsorgaan, in het algemeen aangegeven met cijfer 10, is weergegeven in fig. 1 en kan worden gebruikt voor het doen uiteen-
5 vallen of scheiden van celklusters in afzonderlijke weefselcellen, schraapsel en lichaamsvloeistof. De van elkaar gescheiden cellen kunnen daarna worden gebruikt voor een aantal algemene doeleinden, zoals het leggen van de cellen op microscoopplaatjes voor het daaropvolgende
visuele onderzoek met behulp van een microscoop of door analyse met ge-
10 automatiseerde patroonherkenningsystemen en voor systemen waarbij een doorstroming wordt bewerkstelligd.

Het scheidingsorgaan 10 bestaat uit een drumachtige rotor 12 die aan de binnenzijde van een ronde beker 14 tot rotatie kan worden ge-
bracht, waarbij ook een andere bekervorm kan worden toegepast als aange-
15 geven in fig. 1. De rotor 12 en beker 14 hebben bij voorkeur een cilindrische vorm, doch kunnen ook andere vormen hebben, zoals een conische configuratie. De beker 14 is geschikt voor het bevatten van het cel-
monster in een vloeibare suspensie 16. De rotor 12 is stevig gekoppeld aan een elektrische motor 18 met behulp van een as 20. De elektrische
20 motor is op zijn beurt elektrisch gekoppeld aan een krachtbron (niet weergegeven) voor het bekrachtigen van de elektrische motor zodat rotor 12 kan worden geroteerd. De elektrische motor 18 heeft een huis 22 met
een nekvormig deel 24 dat zich naar beneden toe uitstrekt vanaf de buitenkant van het huis. Het nekvormige gedeelte is zodanig aangepast
25 dat het verschuifbaar past binnen de bovenkant van beker 14, zodat het huis 22 kan rusten op en kan worden gedragen door beker 14. Bij voorkeur, doch niet noodzakelijkerwijs, is een of meer richels 23 aangebracht op
het bovengedeelte van rotor 12 om mede te voorkomen dat de vloeibare sus-
pensie 16 aan de binnenkant van beker 14 omhoog beweegt. Het verdient de
30 voorkeur, doch het is niet noodzakelijk, dat beker 14 is gevormd uit een kunststof, rotor 12 is gevormd uit een kunststof, as 20 is vervaardigd uit metaal en het huis 22 en het nekvormige gedeelte 24 zijn vervaardigd uit een kunststof. Ter toelichting van de afmetingen kan worden gesteld
dat het oppervlak van de rotor 12 op bepaalde afstand is gelegen van het
35 binnenste van de beker en wel op ongeveer 4 mm. De diameter van de rotor 12 kan bijvoorbeeld 17 mm zijn en de binnendiameter van de beker kan 25 mm zijn. De rotor is geplaatst op een afstand van de onderkant van de beker 14 te weten op 1 mm en de verticale hoogte van rotor 12 is

14,5 mm tot de richels 23, waarbij de twee richels 23 verder 5 mm toevoegen aan de hoogte. De diameter van de richels 23 zijn ongeveer 20 mm. De vloeibare suspensie 16 kan 9 mm hoog zijn zodat het vloeistofniveau boven de rotor 12 uitsteekt met ongeveer 3 mm. Deze waarden zijn slechts
5 als voorbeelden gegeven en kunnen aanzienlijk worden gevarieerd. Zo kan bijvoorbeeld de afstand 1 cm bedragen tussen de rotor 12 en beker 14, hetgeen resulteert in de gewenste afscheiding van de cellen. Bij het in werking zijn wordt de rotor 12 geroteerd, waardoor schuifkrachten worden opgewekt tussen de buitenwand van rotor 12 en de binnenwand van beker 14.
10 Deze afschuifkrachten zijn voldoende om de celklusters te breken, zonder dat de cellen zelf aanmerkelijk worden beschadigd. Er wordt aangenomen dat deze schuifkrachten worden opgewekt in een gebied direkt nabij de wand van rotor 12. Rotor 12 kan bijvoorbeeld worden geroteerd met een snelheid van 2000 tot 6000 omwentelingen per minuut. In het algemeen geldt
15 dat hoe hoger de rotatie is hoe beter de resultaten zijn, waarbij een rotatiesnelheid lager dan 2000 omwentelingen in het algemeen niet tot een gewenst resultaat leiden. De experimenten onder toepassing van deze inrichting hebben een aanzienlijke daling van de tijd gegeven die nodig is om de cellen van elkaar te scheiden, in vergelijking met de bekende
20 spuitbewerking van een celsuspensie. Bij de toepassing van het scheidingsorgaan 10 op cervicale monsters werd een opbrengst verkregen van 80 tot 90% enkelvoudige cellen zonder dat een cellulaire beschadiging optrad. Deze resultaten werden verkregen bij een gebruik van de rotor gedurende
25 een scheidingsperiode van 10 tot 15 minuten. De inrichting 10 is zeer geschikt om te worden toegepast binnen een geautomatiseerde inrichting voor het prepareren van monsters. Rotor 12 kan makkelijk worden gereinigd in een bad met stromend water.

Hoewel een elektrische motor 18 is weergegeven in de bij voorkeur
30 toegepaste uitvoeringsvorm kunnen ook andere organen voor het opwekken van de energie voor het doen roteren van rotor 12 worden toegepast. Zo kan bijvoorbeeld een compacte luchturbineaanrijving worden toegepast in plaats van de kleine elektrische motor 18.

Fig. 2 geeft een aanpassing weer van een scheidingsorgaan 10 waar-
35 mee fracties met verschillende dichtheden kunnen worden verzameld. Beker 14 is aangepast zodat een beker met twee ruimten wordt verkregen door het opnemen van een concentrisch geplaatst inwendig flesje 26. Het inwendige flesje 26 kan zich uitstrekken tot een plaats beneden of boven

de bodem van rotor 12. Bij voorkeur is de bovenkant van het inwendige flesje 26 iets lager dan de onderkant van rotor 12. Door het kiezen van de plaatsing van de intercompartementale wand en hoogte van flesje 26 is het mogelijk om de componenten van de vloeibare suspensie met verschillende dichtheden te verzamelen dankzij de centrifugale werking van rotor 12. Bovendien kan worden overwogen dat met een aantal concentrische inwendige flesjes 26, aangebracht op de onderkant van beker 14 het mogelijk is om het monster in meer dan twee fracties te scheiden.

De fig. 3 en 4 geven een andere modificatie weer van de uitvoeringsvorm volgens fig. 1. De rotor 12 heeft een centrale ronde holte 28, gevormd hierin met een aantal gaten 30 die zich uitstrekken vanaf de holte 28 tot de buitenwand 32 van de rotor. Elk van de gaten 30 heeft een langgerekt cilindrisch gedeelte 34 en een afgeknot, konisch gevormd uitlopend gedeelte 36. De wand 32 van rotor 12 is weer op afstand van de binnenwand van beker 14 geplaatst op een vergelijkbare afstand als die weer gegeven in fig. 1. Elk van de gaten 30 is in lijn gelegen zodat de centrale as hiervan rakend loopt aan een denkbeeldige cirkel die concentrisch loopt met as 12 zoals weergegeven in fig. 4. De cellen die van elkaar moeten worden gescheiden worden aangetrokken uit de holte 28 via de gaten 30 door de centrifugale kracht die wordt opgeroepen door de roterende rotor 12. Met andere woorden kan worden gesteld dat deze opbouw werkt als een centrifugale pomp. Naast de opwekking van de boven beschreven afschuifkracht tussen de buitenwand 32 van rotor 12 en de binnenwand van beker 14 wordt een additionele afschuifkracht bewerkstelligd wanneer het cellulaire materiaal door de gaten 30 stroomt. Zodoende versterkt de beweging van de cellen door de gaten 30 de scheiding van de cellen, veroorzaakt door de afschuifkracht tussen de wanden.

Fig. 5 geeft een andere uitvoeringsvorm van het scheidingsorgaan 10, waarbij de rotor 12 een spiraalvormige uitsnijding 38 heeft waardoor een wormvormige buitenste configuratie wordt verkregen. De beker 14 heeft grotere afmetingen als dwarsdoorsnede ten opzichte van de grootte van de beker beschreven in de vorige uitvoeringsvormen. Een afgesloten mantel of cap 40 is aangebracht tussen de rotor 12 en beker 14. Met name rust de elektrische motor 18 nu op de bovenkant van cap 40. Deze cap 40 heeft een gesloten uiteinde 42, die is aangebracht in de bodem van beker 14. Een aantal gaten 44 met een kleine diameter doorboren de cap bij het lagere uiteinde hiervan zodat deze een verbinding vormen met het lagere uiteinde van rotor 12. Een aantal gaten 46 met een grotere diameter

loopt door cap 40 in een gebied nabij de bovenkant van rotor 12. Bij voorkeur, doch niet noodzakelijkerwijs, is een richel 47 aangebracht bij beker 14 op een hoogte nabij de bovenkant van het vloeistofmonster om te voorkomen dat de vloeistofsuspensie langs de wanden omhoog kruipt.

5 Door de richting van de spiraalvormige uitsnijding 38, weergegeven in fig. 5, wordt de vloeistof in een richting met de klok, gezien vanaf de onderkant, van rotor 12 naar beneden gedrukt, naar de onderkant van cap 40. Met behulp van deze rangschikking wordt vloeistof uit beker 14 door de openingen 46 met de grotere diameter geperst en naar beneden

10 gedrukt naar de onderkant van cap 40 en daar naar buiten door de openingen 44 met een kleine diameter. Naast de afschuifkracht die wordt bewerkstelligd tussen het wormvormige oppervlak van rotor 12 en de binnenwand van beker 14 worden additionele afschuifkrachten opgeroepen wanneer de vloeistof uit de gaten 44 wordt geperst met de kleine dia-

15 meter. Bovendien kan worden gesteld dat in vergelijking met de uitvoeringsvormen van de fig. 3 en 4, de rotatie van de spiraalvormige uitsnijding 38 de mogelijkheid wordt verkregen om aanzienlijk grotere drukken te krijgen om cellen door openingen 44 te persen. Met name geeft de combinatie van de afschuifkracht van rotor 12 en de openingen 44 in

20 cap 40 een voortreffelijke scheiding met een verbetering tot 10% ten opzichte van het rotororgaan dat als basisuitvoering kan worden beschouwd, zoals weergegeven in fig. 1. Deze extra druk is ook geschikt voor het strippen van cytoplasma uit celkernen.

Hoewel bepaalde uitvoeringsvormen volgens de uitvinding zijn be-

25 schreven en toegelicht, moeten deze niet worden beschouwd als een beperking van de uitvinding tot de beschreven vormen. De uitvinding betreft alle modificaties, alternatieven en uitvoeringsvormen waarbij de uit-

vinding wordt toegepast die betrekking heeft op een scheidingsorgaan voor het scheiden van klusters van biologische cellen in een monstersuspensie, welk orgaan een beker omvat die de suspensie bevat, een rotor die roteer-

30 baar is en aangebracht binnen de beker, een motor voor het doen roteren van de rotor, welke rotor is aangebracht op een afstand van de wand van de beker en die met een voldoende snelheid kan roteren om afschuifkrachten uit te oefenen op de klusters van cellen die zich in het

35 monster bevinden tussen de rotor en de beker, om de samenhangsels of klusters van cellen te scheiden of te breken.

CONCLUSIES

1. Scheidingsorgaan, voor het scheiden van klusters van biologische cellen in een monstersuspensie bestaande uit een beker met hierin de
5 monstersuspensie, met het kenmerk, dat een rotor 12 is aangebracht in de beker 14 en roterende organen 18, 20 voor het doen roteren van de rotor om afschuifkrachten te kunnen bewerkstelligen zodat de klusters van cellen aanwezig in de monstersuspensie tussen de rotor en de beker van elkaar worden gescheiden.
- 10 2. Scheidingsorgaan volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het buitenoppervlak van de rotor 12 en de binnenwand van beker 14 ronde dwarsdoorsneden hebben.
3. Scheidingsorgaan volgens conclusies 1 of 2, met het kenmerk, dat rotor 12 een onderste uiteinde heeft dat op afstand is geplaatst van
15 de bodem van beker 14.
4. Scheidingsorgaan volgens een van de conclusies 1-3, met het kenmerk, dat een binnenfles 26 is aangebracht tussen de rotor en de beker op de bodem van de beker.
5. Scheidingsorgaan volgens conclusie 4, met het kenmerk, dat het
20 inwendige flesje 26 een ronde dwarsdoorsnede heeft en is aangebracht in concentrisch verband met beker 14 en rotor 12 en het inwendige flesje een hoogte heeft dat zich uitstrekt tot nabij het lagere uiteinde van de rotor.
6. Scheidingsorgaan volgens een van de conclusies 1, 2 of 3, met
25 het kenmerk, dat dit bestaat uit rotor 12 met een hierin gevormde holte 28, een aantal gaten 30 die door de rotor lopen en welke gaten zich uitstrekken vanaf de holte naar het buitenoppervlak van de rotor, waarbij de rotatie van de rotor een centrifugale kracht bewerkstelligt waardoor het monster vanuit de holte door de gaten wordt gestuwd.
- 30 7. Scheidingsorgaan volgens een van de conclusies 1,2 of 3, met het kenmerk, dat een cap 40 is aangebracht aan de binnenkant van beker 14, welke cap een aantal relatief kleine openingen 44 heeft en een aantal openingen 46 met een relatief grotere diameter, die alle door de wand van de cap lopen, waarbij de openingen 46 met een grotere diameter
35 zijn aangebracht boven de openingen 44 met een kleinere diameter en de rotor met op het oppervlak hiervan een spiraalvormige uitsnijding 38, waarbij de rotatie van de rotor, de monstersuspensie door de openingen met de grotere diameter perst en de monstersuspensie aan de onderkant

van de cap naar binnen drukt zodat de monstersuspensie door de gaten met kleinere diameter wordt gedrukt.

8. Scheidingsorgaan volgens conclusie 7, met het kenmerk, dat de gaten 46 met grotere diameter zijn aangebracht nabij of boven het
- 5 bovenste gedeelte van de rotor en de gaten 44 met een kleinere diameter zijn aangebracht bij of beneden het onderste gedeelte van de rotor.

Eindhoven, mei 1982

FIG. 1.

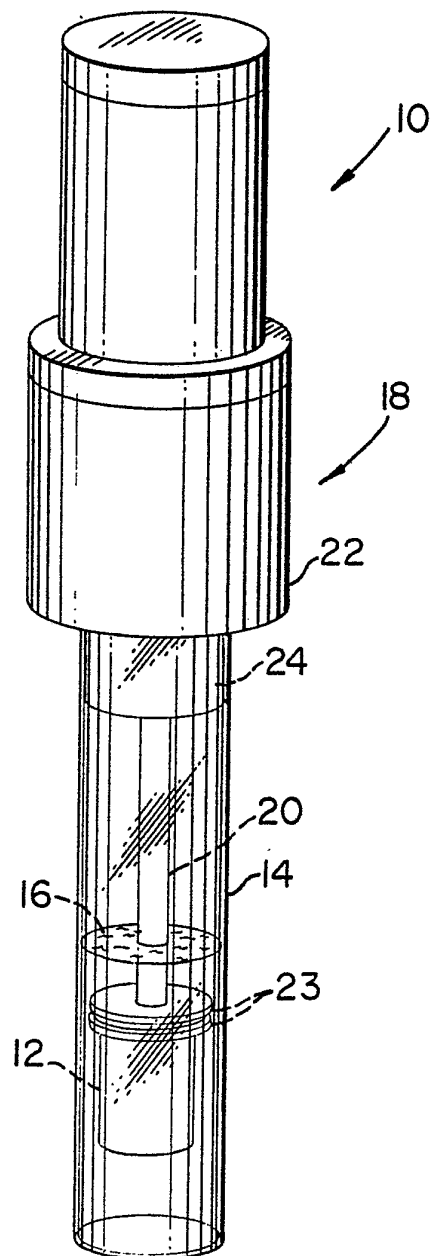


FIG. 2.

