

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 913 335**

51 Int. Cl.:

G01N 21/03	(2006.01)
G01N 21/05	(2006.01)
G02B 21/08	(2006.01)
G01N 21/64	(2006.01)
G02B 21/12	(2006.01)
G02B 21/34	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.02.2014 PCT/US2014/016962**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.08.2014 WO14127372**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2014 E 14751601 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2022 EP 2956759**

54 Título: **Análisis de imagen y medición de muestras biológicas**

30 Prioridad:

18.02.2013 US 201361766116 P
15.03.2013 US 201361802194 P
25.07.2013 WO PCT/US2013/052141
25.07.2013 US 201313951063
22.01.2014 US 201461930419 P
29.01.2014 US 201461933270 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.06.2022

73 Titular/es:

LABRADOR DIAGNOSTICS LLC (100.0%)
1209 Orange Street
Wilmington, Delaware 19801, US

72 Inventor/es:

MOHAN, KARAN;
PANGARKAR, CHINMAY;
WASSON, JAMES;
FOLKESSON, JENNY;
NOURSE, MARILYN y
KOLHAR, POORNIMA

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 913 335 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

Análisis de imagen y medición de muestras biológicas

5 Antecedentes

El análisis de muestras biológicas de un sujeto puede ser importante para el diagnóstico, la monitorización o tratamiento relacionado con la salud del sujeto. Se conocen una variedad de métodos para el análisis de muestras biológicas. Sin embargo, para proporcionar un mejor diagnóstico, monitorización o tratamiento de sujetos, se desean mejoras en el análisis de muestras biológicas. El documento US 2003/104494 A1 describe métodos para analizar células en series posicionales que se forman en subpocillos de una microplaca, de manera que los subpocillos son direccionables individualmente. El método usa un sistema para detectar ópticamente los resultados del ensayo de la microplaca con pocillos de muestra subdivididos. El sistema incluye fuentes de luz para iluminar muestras en microplaca y un detector para recibir y medir las señales ópticas que se producen por la iluminación de la muestra. También se proporcionan una platina para soportar la microplaca, ópticas que se disponen entre las fuentes de luz y el detector.

Resumen

Los métodos, dispositivos, sistemas y aparatos que se describen en la presente descripción son útiles para el análisis óptico y de imágenes o la medición de muestras biológicas y de otro tipo. Las "modalidades y aspectos de la invención" que se describen a continuación no deben considerarse modalidades de la presente invención, a menos que estén dentro del alcance de las reivindicaciones, sino que son aspectos de esta descripción que son útiles para comprender la invención. De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para identificar una célula en una muestra que contiene una pluralidad de células como se define en las reivindicaciones adjuntas. Las modalidades preferidas se proporcionan en las reivindicaciones dependientes.

Las modalidades que se describen en la presente descripción incluyen portamuestras adecuados para contener muestras, incluidas muestras biológicas, para examen óptico, para medición óptica y para otros exámenes y mediciones. En las modalidades, se proporciona un portamuestras que tiene una porción transmisiva ópticamente y una porción que se configura para proporcionar una reflexión interna de la luz dentro del portamuestras. En modalidades, las reflexiones internas pueden incluir una reflexión interna parcial y pueden incluir una reflexión interna total de la luz. La luz incidente de una fuente de luz externa, y dirigida desde un lado del portamuestras, es eficaz para iluminar una muestra dentro del portamuestras desde una pluralidad de direcciones. En modalidades, una fuente de luz externa que se dispone en un lado del portamuestras puede proporcionar epi-iluminación de una muestra dentro del portamuestras; puede proporcionar trans-iluminación de una muestra dentro del portamuestras; o puede proporcionar tanto epi-iluminación como trans-iluminación de una muestra dentro del portamuestras.

Las modalidades que se describen en la presente descripción incluyen sistemas que incluyen portamuestras adecuados para contener muestras. Dichos sistemas son adecuados para su uso en el examen y medición de muestras, incluidas muestras biológicas, por ejemplo mediante examen óptico, medición óptica y para otros exámenes y mediciones. En modalidades, se proporciona un sistema que se describe en la presente descripción que comprende un portamuestras que tiene una porción transmisiva ópticamente y una porción que se configura para proporcionar una reflexión interna de la luz dentro del portamuestras. En modalidades, las reflexiones internas dentro de un portamuestras de un sistema que se describe en la presente descripción pueden incluir una reflexión interna parcial y pueden incluir una reflexión interna total de la luz. Los sistemas que se describen en la presente descripción pueden incluir fuentes de luz. La luz incidente de una fuente de luz externa a un portamuestras, y que se dirige desde un lado del portamuestras, es eficaz para iluminar una muestra dentro del portamuestras desde una pluralidad de direcciones. En modalidades, una fuente de luz que se dispone en el exterior y en un lado del portamuestras puede proporcionar epi-iluminación de una muestra dentro del portamuestras; puede proporcionar trans-iluminación de una muestra dentro del portamuestras; o puede proporcionar tanto epi-iluminación como trans-iluminación de una muestra dentro del portamuestras. Los sistemas que se describen en la presente descripción pueden incluir un detector o detectores; dichos detectores pueden incluir detectores ópticos y pueden incluir otros detectores. Dichos detectores son adecuados y se configuran para realizar mediciones de una muestra y de objetos y características de una muestra y objetos en una muestra dentro de un portamuestras; dichas mediciones pueden incluir mediciones cualitativas y mediciones cuantitativas. Las modalidades de los sistemas como se describe en la presente descripción pueden incluir filtros, aberturas, rejillas, lentes y otros elementos ópticos. Las modalidades de los sistemas como se describe en la presente descripción pueden incluir un aparato mecánico para ubicar, mover y ajustar un portamuestras, una fuente de luz, una lente, un filtro u otro elemento o componente de un sistema como se describe en la presente descripción. Las modalidades de los sistemas como se describe en la presente descripción pueden incluir componentes y elementos para transferir, dividir en alícuotas, contener, calentar, mezclar, teñir, acondicionar o preparar, manipular o alterar de cualquier otra manera una muestra. Las modalidades de los sistemas como se describe en la presente descripción pueden incluir componentes y elementos para transportar, asegurar, llenar o manipular de cualquier otra manera un portamuestras. Las modalidades de los sistemas como se describe en la presente descripción pueden incluir componentes y elementos para la manipulación física y el tratamiento de una muestra, y para la manipulación física de un portamuestras, donde dichos componentes y

5 elementos pueden incluir, sin limitación, una pipeta, una bomba, una centrífuga, otros aparatos mecánicos para mover y manipular una muestra, un portamuestras, puntas de pipeta, recipientes y reactivos para su uso con una muestra o porción de la misma. Las modalidades de los sistemas como se describe en la presente descripción pueden incluir componentes y elementos para el análisis químico, incluido el análisis de ácidos nucleicos, el análisis de proteínas, el análisis químico general, el análisis electroquímico y otros análisis de una muestra o porción de la misma

10 Los portamuestras y los sistemas que se describen en la presente descripción se pueden usar, y los métodos que se describen en la presente descripción se pueden realizar en cualquier lugar, incluido un laboratorio clínico, un laboratorio de investigación, una clínica, un hospital, un consultorio médico, un punto de ubicación de servicio y cualquier otra ubicación adecuada. Las muestras contenidas por los portamuestras que se describen en la presente descripción, y las muestras examinadas mediante el uso de los sistemas y métodos que se describen en la presente descripción, incluyen cualquier muestra biológica y pueden ser muestras biológicas pequeñas. En modalidades, una muestra puede ser una pequeña muestra de sangre u orina, y puede tener un volumen de menos de aproximadamente 250 μL , o menos de aproximadamente 150 μL , o menos de aproximadamente 100 μL , o menos de aproximadamente 50 μL , o menos de aproximadamente 25 μL , o menos de aproximadamente 15 μL , o puede ser igual o menor que el volumen de sangre que se obtiene de una punción en el dedo.

20 En una modalidad, se proporciona un método para la medición de un componente de interés en células de una población celular en una muestra, que incluye: a) obtener una medición cuantitativa de un marcador presente en células de la población celular en la muestra; b) en base a la medición de la parte a), determinar, con la ayuda de una computadora, una cantidad aproximada de células en la población celular presente en la muestra; c) en base a los resultados de la parte b), seleccionar una cantidad de reactivo para agregar a la muestra, en donde el reactivo se une específicamente al componente de interés en las células de la población celular y se configura para ser fácilmente detectable; d) en base a los resultados de la parte c), agregar la cantidad seleccionada del reactivo a la muestra; e) analizar células en la muestra para el reactivo unido al componente de interés; y f) en base a la cantidad de reactivo unido al componente de interés, determinar la cantidad del componente de interés en las células de la población celular de la muestra. En una modalidad del método, el reactivo de la parte c) es un anticuerpo.

30 Los solicitantes describen además en la presente descripción un método para la medición de un componente de interés en las células de una población celular en una muestra, que comprende: a) obtener una medición cuantitativa de un marcador presente en las células, o de una propiedad de las células, de la población celular en la muestra; b) determinar, con la ayuda de una computadora, una cantidad aproximada de células en la población celular presente en la muestra en base a la medición de la parte a); c) agregar una cantidad de un marcador celular a la muestra, donde la cantidad de dicho marcador celular agregado se basa en los resultados de la parte b), y en donde el marcador celular se une específicamente al componente de interés en las células de la población celular y se configura para ser fácilmente detectable; d) analizar células en la muestra para el marcador unido al componente de interés; y e) determinar la cantidad del componente de interés en las células de la población celular de la muestra en base a la cantidad de marcador unido al componente de interés.

40 En otra modalidad, se proporciona un método para enfocar un microscopio, que incluye: a) mezclar una muestra que contiene un objeto para análisis microscópico con una partícula de referencia que tiene un tamaño conocido, para generar una mezcla que contiene la muestra y la partícula de referencia; b) posicionar la mezcla de la etapa a) en una trayectoria de luz de un microscopio; c) exponer la mezcla de la etapa a) a un haz de luz que se configura para visualizar la partícula de referencia; y d) enfocar el microscopio en base a la posición de la partícula de referencia dentro de la mezcla, o en base a la nitidez de la imagen de la partícula de referencia.

50 En otra modalidad, se proporciona en la presente descripción un método para identificar una célula en una muestra que contiene una pluralidad de células, que incluye: a) analizar una célula de la pluralidad de células para al menos uno de: (i) la presencia de un antígeno de superficie celular; (ii) la cantidad de un antígeno de superficie celular; o (iii) tamaño de célula; b) analizar la célula de a) para al menos uno de: (i) tamaño nuclear; o (ii) forma nuclear; y c) analizar la célula de a) y b) para la dispersión de luz celular cuantitativa, en donde la combinación de información de las etapas a), b) y c) se usa para identificar la célula en la muestra que contiene una pluralidad de células.

55 En otra modalidad más, se proporciona en la presente descripción un sistema que comprende un conjunto detector para su uso con un portamuestras que contiene una muestra a examinar. En un ejemplo no limitante, el portamuestras es una cubeta que tiene características o materiales que permiten que la cubeta se acople y se mueva desde una ubicación hasta el conjunto detector. En algunas modalidades, el conjunto detector tiene una primera superficie que se configura para acoplarse a una superficie del portamuestras de tal manera que la interfaz entre los dos no crea una interferencia óptica en la trayectoria óptica desde el conjunto detector hasta la muestra en el portamuestras. En una modalidad, puede haber más de una ubicación en el conjunto detector para uno o más de los portamuestras. Algunas modalidades pueden tener el mismo portamuestras para cada una de las ubicaciones. Opcionalmente, algunas modalidades pueden tener diferentes portamuestras para al menos algunas de las ubicaciones asociadas con el conjunto detector.

65

En una modalidad que se describe en la presente descripción, se proporciona un portamuestras tal como, entre otros, una cubeta con propiedades ópticas, dimensiones, materiales o características físicas que le permiten contener la muestra para su análisis por el conjunto detector mientras se mantiene físicamente separada y no en contacto directo con el conjunto detector. Esto puede ser particularmente útil para muestras de fluidos que contienen miembros conformados.

En una modalidad que se describe en la presente descripción, el conjunto detector puede ser una unidad de microscopía multicanal que se configura para detectar, obtener o medir la forma y las propiedades físicas, ópticas y bioquímicas de una célula o células en una muestra, todo en el mismo dispositivo. Puede proporcionar tanto información cuantitativa como información descriptiva. Una modalidad del conjunto detector puede usar múltiples marcadores del mismo color o longitud de onda, donde el conjunto detector se configura para deconvolucionar las señales que se originan en dichos marcadores en una muestra (por ejemplo, unidos a las células en una muestra), lo que permite una reducción en el número de canales espectrales y fuentes de luz que se requiere en el conjunto.

Debe entenderse que algunas modalidades en la presente descripción pueden incluir un portamuestras tal como, entre otros, una cubeta con características físicas en la forma del material de la cubeta que aumentan la iluminación de campo oscuro donde algunas características se configuran para proporcionar reflectancia de luz (incluyendo, entre otras, la reflectancia de la luz dentro de la cubeta), y algunas características pueden configurarse opcionalmente para soporte mecánico. En modalidades, algunas características pueden proporcionar soporte mecánico y también proporcionar reflectancia de la luz. En modalidades, un portamuestras se configura para proporcionar trans-iluminación de una muestra mediante la reflexión de la luz dentro del portamuestras. En modalidades, un portamuestras se configura para proporcionar trans-iluminación de una muestra mediante la reflexión de la luz dentro del portamuestras; dicha reflectancia puede incluir una reflexión interna parcial (PIR, también conocida como reflexión de Fresnel), y dicha reflectancia puede incluir una reflectancia interna total (TIR). En modalidades, un portamuestras se configura para proporcionar trans-iluminación de una muestra mediante la reflexión de la luz dentro del portamuestras, en donde la fuente de la luz reflejada se dispone en el mismo lado del portamuestras que la óptica que se usa para detectar o medir la luz (es decir, la fuente de luz es una fuente de luz de epi-iluminación).

El sistema de la presente descripción puede usar simultáneamente iluminación tanto epi (directa) como trans (reflejada) en imágenes de campo oscuro. Esto difiere de las imágenes de campo oscuro tradicionales que usan epi-iluminación o trans-iluminación, pero no ambos tipos de iluminación, y no ambos tipos de iluminación de una sola fuente o dirección o ubicación. Por tanto, la combinación de epi-iluminación y trans-iluminación que se describe en la presente descripción, en donde la trans-iluminación se origina en la misma fuente de luz que la epi-iluminación, difiere de los sistemas conocidos. Opcionalmente, se puede usar un portamuestras conformado, tal como la cubeta, para proporcionar la trans-iluminación. En modalidades, un portamuestras conformado se configura para proporcionar trans-iluminación por reflexión de la luz. En modalidades, un portamuestras conformado se configura para proporcionar trans-iluminación por reflexión de la luz dentro del portamuestras. En modalidades, uno o más del tamaño, la forma, la superficie, los materiales u otra característica de un portamuestras conformado es eficaz para proporcionar la reflexión interna de la luz dentro del portamuestras conformado. En modalidades, uno o más del tamaño, la forma, la superficie, los materiales u otra característica de un portamuestras conformado es eficaz para proporcionar una reflexión interna parcial (PIR) de la luz dentro del portamuestras conformado. En modalidades, uno o más del tamaño, la forma, la superficie, los materiales u otra característica de un portamuestras conformado es eficaz para proporcionar reflexión interna total (TIR) de luz dentro del portamuestras conformado. Opcionalmente, la intensidad de la trans-iluminación no es despreciable. En modalidades, un portamuestras conformado puede incluir una superficie reflectante eficaz para aumentar la intensidad de la luz de trans-iluminación. La fuente de luz de campo oscuro puede ser un diodo emisor de luz (LED), un láser u otra fuente de iluminación que pueda proporcionar la(s) longitud(es) de onda de excitación o iluminación deseada.

En una modalidad, la combinación del objetivo del microscopio y la fuente de luz tal como, entre otros, una luz anular (para microscopía de campo oscuro) está a una distancia física entre ellos que permite un tamaño compacto para el conjunto detector. En una modalidad, solo la luz a una longitud de onda deseada o dentro de un intervalo deseado de longitudes de onda se dirige a la muestra. En una modalidad, la luz es luz no polarizada. En otra modalidad, la luz es luz polarizada.

En otra modalidad más, la información del ensayo de citometría, ya sea de la fase de preparación de la muestra o de la fase de análisis, se usa para guiar o desencadenar un procedimiento secundario. En modalidades, tal procedimiento secundario puede ser proporcionar una alerta para revisión humana directa. En modalidades, dicho procedimiento secundario puede ser el uso de un recuento celular estimado u otra información que se obtiene durante una etapa de preparación de muestras de un procedimiento para guiar la realización de un ensayo, donde dicho ensayo puede ser un ensayo en una etapa posterior del procedimiento, o puede ser un ensayo en otro procedimiento.

Las técnicas para el recuento de células también pueden proporcionar maneras de tratar con portamuestras con formas irregulares o superficies de cámara. Un método comprende usar: a) una técnica de canal de volumen medido para introducir un volumen conocido de una muestra en un área de análisis, tal como un canal en el portamuestras.

El método puede incluir el recuento de todas las células en el portamuestras. Dado que se conoce el volumen de muestra, también se conoce la concentración de células en volumen (esto puede realizarse en recipientes o cubetas hidrófobos o portamuestras con cámaras con dichas superficies). Otro método comprende: b) una técnica métrica que se basa en relaciones para mezclar la muestra con una cantidad conocida de perlas, que se usa para calcular la concentración de células en la muestra en base al número de perlas observadas.

En otra modalidad más que se describe en la presente descripción, se proporciona un método que comprende medir los componentes sanguíneos formados, tal como, entre otros, medir el volumen de glóbulos rojos (RBC) en una muestra de sangre haciendo que los RBC adopten formas sustancialmente esféricas y medir el volumen de los RBC mediante el uso de microscopía de campo oscuro.

En aún otra modalidad que se describe en la presente descripción, se proporciona un método que comprende medir el volumen de plaquetas. El método puede incluir marcar las plaquetas con un colorante fluorescente y medir el tamaño de las plaquetas observadas; agregar perlas de tamaño conocido a la muestra; y comparar el tamaño observado de las imágenes de las perlas con las imágenes observadas de las plaquetas, mediante el uso de las perlas como calibración para determinar el tamaño de las plaquetas y determinar el volumen de plaquetas en la muestra.

En aún otras modalidades que se describen en la presente descripción, se proporcionan métodos para detectar y medir, en una muestra, la morfología celular; la medición del número de células; la detección de partículas; la medición del número de partículas; la detección de cristales; la medición de números de cristales; la detección de agregados celulares; la medición del número de agregados celulares; y otras propiedades y cantidades de o en una muestra.

En consecuencia, los solicitantes describen en la presente descripción:

Un sistema para analizar una muestra, el sistema que comprende: un portamuestras que comprende una cámara de muestra que se configura para contener dicha muestra, al menos una porción de dicho portamuestras que comprende un material ópticamente transmisor, dicho material ópticamente transmisor que comprende una superficie ópticamente transmisiva y una superficie reflectora; y una fuente de iluminación que se configura para proporcionar luz que ilumina y atraviesa dicha superficie ópticamente transmisiva; en donde dicho portamuestras se configura para que dicha luz procedente de dicha fuente de iluminación proporcione simultáneamente epi-iluminación y trans-iluminación a una muestra en el portamuestras, donde la epi-iluminación comprende luz que viaja desde dicha fuente de iluminación hasta dicha muestra sin reflexión en una superficie del material ópticamente transmisor del portamuestras, y donde la trans-iluminación comprende luz que viaja dentro del material ópticamente transmisor y hacia la muestra siguiendo al menos una reflexión desde al menos una superficie de dicho material ópticamente transmisor. En modalidades, un portamuestras de un sistema que tiene las características que se describen en la presente descripción puede comprender una cubeta que tiene un canal alargado que se configura para contener una muestra. En modalidades, el portamuestras puede tener una o más superficies ópticamente no transmisivas.

En las modalidades de los sistemas que se describen en la presente descripción, dicha trans-iluminación puede proporcionarse al menos en parte por la reflexión interna de la luz en una superficie, y puede proporcionarse al menos en parte por la reflexión interna total de la luz dentro de la cubeta. En las modalidades de los sistemas que se describen en la presente descripción, dicha trans-iluminación puede proporcionarse al menos en parte por la reflexión interna parcial de la luz en una superficie, y puede proporcionarse al menos en parte por la reflexión interna parcial de la luz dentro de la cubeta.

En modalidades, un portamuestras puede tener dos o más cámaras de muestra para contener la muestra. Un portamuestras, por ejemplo, una cubeta, que tiene la característica que se describe en la presente descripción puede tener una forma de sección transversal horizontal rectangular; puede tener una forma de sección transversal circular horizontal; puede tener una forma de sección transversal vertical de diente de sierra; puede tener una forma de sección transversal vertical en forma de escalón; o puede tener otra forma.

En modalidades, un portamuestras puede moverse con relación a una fuente de iluminación, y puede moverse a una pluralidad de ubicaciones, en donde una superficie transmisiva ópticamente del portamuestras puede iluminarse por la fuente de iluminación en cada ubicación.

En modalidades, una fuente de iluminación puede incluir una luz anular. En modalidades, una luz anular puede seleccionarse de una luz anular que se basa en diodo emisor de luz (LED) y una luz anular que se basa en láser.

En modalidades, un sistema como se describe en la presente descripción puede incluir una estructura de soporte que tiene una superficie transmisiva ópticamente conformada para acoplarse con una superficie transmisiva ópticamente del portamuestras.

En modalidades, un sistema como se describe en la presente descripción puede tener un dispositivo de compresión que se configura para retener el portamuestras en una ubicación deseada para la iluminación por la fuente de iluminación.

5 En modalidades, un sistema como se describe en la presente descripción puede incluir un detector que se configura para generar imágenes de al menos una porción de un canal en el portamuestras.

10 En modalidades, un portamuestras como se describe en la presente descripción puede incluir un canal alargado que se configura para contener al menos una porción de la muestra, y en donde un detector se configura para generar imágenes de un canal alargado completo en el portamuestras.

15 En modalidades, un portamuestras como se describe en la presente descripción puede configurarse para contener la muestra de manera estática, sin flujo durante la formación de imágenes. En modalidades, un portamuestras puede configurarse para contener una porción de la muestra de manera estática, sin flujo y otra porción de manera fluida.

En modalidades, una fuente de iluminación como se describe en la presente descripción puede moverse con relación al portamuestras.

20 En modalidades, un portamuestras como se describe en la presente descripción puede configurarse para contener la muestra de manera fluida durante la formación de imágenes.

25 En modalidades, un portamuestras como se describe en la presente descripción puede incluir un circuito de fluido completamente confinado en el portamuestras, y en donde la muestra se ubica en dicho circuito de fluido, de manera que la muestra permanece separada de dicho detector.

En modalidades, un portamuestras como se describe en la presente descripción se puede mover con relación al detector. En modalidades, un detector como se describe en la presente descripción se puede mover en relación con el portamuestras.

30 En modalidades, un portamuestras y una fuente de iluminación como se describe en la presente descripción comprenden al menos parte de una unidad de análisis óptico, y el sistema incluye además una unidad de análisis clínico que se configura para realizar análisis clínicos en una muestra.

35 En modalidades, un sistema como se describe en la presente descripción se configura para proporcionar una alícuota de una sola muestra a una unidad de análisis óptico y a una unidad de análisis clínico, de manera que la unidad de análisis clínico y la unidad de análisis óptico pueden realizar el análisis óptico y el análisis clínico en porciones de una muestra al mismo tiempo. En modalidades, dicho análisis clínico puede seleccionarse de análisis químico general, análisis de ácidos nucleicos y análisis de unión ligada a enzimas.

40 En modalidades, un sistema como se describe en la presente descripción puede incluir una pluralidad de unidades de análisis clínico, en donde cada una de dichas unidades de análisis clínico se configura para proporcionar un análisis clínico que se selecciona del análisis químico general, el análisis de ácido nucleico y el análisis de unión ligada a enzima.

45 Los solicitantes proporcionan además una cubeta que comprende una cámara de muestra que se configura para contener una muestra, al menos una porción de dicha cubeta que comprende un material ópticamente transmisor, dicho material ópticamente transmisor que comprende una superficie ópticamente transmisiva y una superficie reflectante, en donde dicha superficie ópticamente transmisiva y dicha superficie reflectante se configuran de manera que la luz que pasa a través de la superficie ópticamente transmisiva proporcione simultáneamente tanto epi-iluminación y trans-iluminación a dicha muestra en la cámara de muestra, donde la epi-iluminación comprende luz que viaja desde dicha fuente de iluminación a la muestra sin reflexión en una superficie del material ópticamente transmisor, y donde la trans-iluminación comprende luz que viaja dentro del material ópticamente transmisor y hacia la muestra siguiendo al menos una reflexión desde al menos una superficie de dicho material ópticamente transmisor.

55 En modalidades, una cubeta como se describe en la presente descripción tiene una cámara de muestra que comprende un canal alargado. En modalidades, una cubeta como se describe en la presente descripción comprende dos o más cámaras de muestra para contener la muestra. En modalidades, una cubeta puede comprender un canal curvo, incluso en forma de U. En modalidades, una cubeta puede comprender una pluralidad de canales. En modalidades, una cámara de muestra comprende un puerto de entrada. En modalidades, una cámara de muestra comprende un respiradero eficaz para permitir que el aire o el gas entren o salgan (por ejemplo, durante el llenado de la cámara con una muestra). En modalidades, un puerto de entrada puede comprender, o puede servir como un respiradero. En modalidades, un respiradero puede comprender, o cubrirse con, una membrana eficaz para reducir o evitar la evaporación del fluido contenido dentro del canal. En modalidades, un canal alargado de una cubeta puede comprender un respiradero cubierto con una membrana porosa eficaz para reducir o evitar la evaporación del fluido contenido dentro del canal. En modalidades, un adhesivo; una membrana recubierta por uno o dos lados con una

capa adhesiva; soldadura ultrasónica; o combinaciones de los mismos pueden usarse en la fabricación de una cubeta.

5 En modalidades, una cubeta como se describe en la presente descripción puede tener una o más superficies ópticamente no transmisivas.

10 En modalidades, la trans-iluminación se puede proporcionar en una cubeta como se describe en la presente descripción, al menos en parte mediante la reflexión interna de la luz dentro de la cubeta. En modalidades, la trans-iluminación se puede proporcionar en una cubeta como se describe en la presente descripción, al menos en parte mediante la reflexión interna parcial de la luz en una superficie de la cubeta. En modalidades, la trans-iluminación se puede proporcionar en una cubeta como se describe en la presente descripción, al menos en parte mediante la reflexión interna total de la luz en una superficie de la cubeta.

15 En modalidades, una cubeta como se describe en la presente descripción puede tener una forma de sección transversal horizontal rectangular. En modalidades, una cubeta como se describe en la presente descripción puede tener una forma de sección transversal circular horizontal. En modalidades, una cubeta como se describe en la presente descripción puede tener una forma de sección transversal vertical de diente de sierra. En modalidades, una cubeta como se describe en este documento puede tener una forma de sección transversal vertical en forma de escalón.

20 Los solicitantes describen métodos en la presente descripción. Por ejemplo, los solicitantes describen en la presente descripción un método para identificar una célula en una muestra que contiene una pluralidad de células, que comprende: (a) colocar dicha muestra en un portamuestras que comprende una cámara de muestra que se configura para contener la muestra, al menos una porción de dicho portamuestras que comprende un material ópticamente transmisor, dicho material ópticamente transmisor que comprende una superficie ópticamente transmisiva y una superficie reflectante, en donde dicha superficie ópticamente transmisiva y dicha superficie reflectante se configuran de manera que la luz que pasa a través de la superficie ópticamente transmisiva proporciona simultáneamente epi-iluminación y trans-iluminación a la muestra en la cámara de muestra, donde la epi-iluminación comprende luz que viaja desde dicha fuente de iluminación a la muestra sin reflexión en una superficie del material ópticamente transmisor, y donde la trans-iluminación comprende luz que viaja dentro del material ópticamente transmisor y a la muestra siguiendo al menos una reflexión de al menos una superficie de dicho material ópticamente transmisor; (b) iluminar dicho portamuestras de manera efectiva para proporcionar simultáneamente epi-iluminación y trans-iluminación de la muestra; y (c) identificar una célula en la muestra. En modalidades, los métodos que se describen en la presente descripción incluyen métodos en donde dicha identificación comprende identificar dicha célula con un detector que se configura para generar imágenes de al menos una porción de dicha cámara de muestra. En las modalidades que se describen en la presente descripción, una cámara de muestra para su uso en dichos métodos puede comprender un canal alargado.

40 Los solicitantes describen además en la presente descripción un método para enfocar un microscopio, que comprende: a) mezclar una muestra que contiene un objeto para análisis microscópico con una partícula de referencia que tiene un tamaño conocido, eficaz para generar una mezcla que contiene la muestra y la partícula de referencia; b) posicionar la mezcla de la etapa a) en una trayectoria de luz de un microscopio; c) exponer la mezcla de la etapa a) a un haz de luz que se configura para visualizar la partícula de referencia; y d) enfocar el microscopio en base a la posición de la partícula de referencia dentro de la mezcla o en base a la nitidez de una imagen de la partícula de referencia.

50 Los solicitantes describen además en la presente descripción métodos para procesar muestras, que comprenden mezclar una muestra directamente con un reactivo que comprende perlas y anticuerpos, en donde las perlas son de un tamaño conocido y en una concentración conocida, y los anticuerpos son útiles para marcar objetivos dentro de la muestra. En modalidades, los solicitantes describen métodos para procesar muestras de sangre, que comprenden mezclar una muestra de sangre total con un reactivo que comprende perlas y anticuerpos, en donde las perlas son de un tamaño conocido y en una concentración conocida, y los anticuerpos son útiles para marcar células sanguíneas dentro de la muestra. Dichos métodos proporcionan exactitud y precisión mejoradas del análisis de muestras, por ejemplo, exactitud y precisión mejoradas del número y las características de las células sanguíneas, y reducen la sensibilidad del análisis de muestras a imprecisiones que se derivan de la transferencia, mezcla y alícuotas de muestras. En un ejemplo no limitante, analizando el número de perlas en una muestra, se puede inferir el número de células si se conoce la relación de células a perlas y esa relación se mantiene durante cada etapa de dilución. Debe entenderse que cada etapa de dilución podría tener variaciones debido a la dosificación de muestra y la dosificación de diluyente. Al comenzar con una solución de perlas y reactivos a la que se agrega una muestra sin diluir, el sistema se vuelve insensible a las imprecisiones de las etapas de dispensación siempre que la relación de componentes formados, tales como perlas y células, entre otros, no cambie.

65 Los solicitantes describen en la presente descripción un método para identificar una célula en una muestra que contiene una pluralidad de células, que comprende: (a) analizar una célula de la pluralidad de células para al menos uno de: (i) la presencia de un antígeno de superficie celular; (ii) la cantidad de un antígeno de superficie celular; o (iii) tamaño de célula; (b) analizar la célula de (a) para al menos uno de: (i) tamaño nuclear; o (ii) forma nuclear; y (c)

analizar la célula de (a) y (b) para la dispersión de luz celular cuantitativa, en donde la combinación de información de las etapas (a), (b) y (c) se usa para identificar la célula en la muestra que contiene una pluralidad de células.

En al menos una modalidad que se describe en la presente descripción, un sistema para obtener imágenes de una muestra, el sistema que comprende: un recipiente de muestras que contiene dicha muestra, una platina que tiene un receptor de recipiente de muestras con una superficie ópticamente transparente; una fuente de luz para iluminar los componentes que se forman en la muestra a través de la platina, en donde el recipiente de muestras tiene una superficie de interfaz que se configura para acoplarse a la superficie ópticamente transparente del receptor del recipiente de muestras, de manera que la superficie de interfaz se adapta a la superficie ópticamente transparente sin una distorsión significativa del paso de la luz a través de la superficie de la interfaz.

Debe entenderse que las modalidades de la presente descripción pueden configurarse para incluir una o más de las siguientes características. Por ejemplo, la superficie de interfaz del recipiente de muestras se puede formar a partir de un material polimérico. Opcionalmente, este puede ser un material transparente. Opcionalmente, la superficie de interfaz del recipiente de muestras se forma por un material más blando que el material que se usa para formar la superficie ópticamente transparente del receptor del recipiente de muestras. Opcionalmente, se proporciona una unidad de compresión para aplicar presión para adaptar la superficie de interfaz a una forma que se configura para adaptarse a la superficie ópticamente transparente del receptor del recipiente de muestras. Opcionalmente, una unidad de manipulación puede configurarse para acoplarse al recipiente de muestras para facilitar el transporte del recipiente de muestras dentro y fuera de la platina, y aumentar la rigidez mecánica del recipiente de muestras. Opcionalmente, la unidad de manipulación puede ser una unidad ópticamente opaca que se configura para acoplarse al recipiente de muestras. Opcionalmente, la unidad de manipulación se puede formar con características físicas, protuberancias o similares para facilitar el acoplamiento con un manipulador robótico, una unidad de pipeta u otro motor mecánico. Opcionalmente, la unidad de manipulación puede formarse con características magnéticas, electromagnéticas u otras para facilitar el acoplamiento o desacoplamiento. Opcionalmente, todas las imágenes de la muestra se pueden realizar sin pasar la luz en una línea sustancialmente recta a través de una superficie y fuera de una superficie opuesta a un detector. Opcionalmente, la fuente de luz no se ubica en un lado del recipiente de muestras para enviar luz a un detector en el lado opuesto del recipiente de muestras.

En un ejemplo no limitante, la cubeta puede tener una pluralidad de canales en donde al menos algunos de los canales tienen diferentes anchos de sección transversal u otras dimensiones de sección transversal. Opcionalmente, algunas cubetas también pueden tener muchas formas diferentes de canales. Opcionalmente, algunas modalidades pueden tener al menos un canal que, visto desde arriba, tiene una configuración en espiral. Opcionalmente, alguna modalidad puede tener una pluralidad de canales que se forman como círculos concéntricos, óvalos concéntricos y/o polígonos concéntricos. Algunas modalidades pueden tener canales de cubetas en donde al menos dos son de diferentes longitudes.

En modalidades, se pueden usar modos de llenado hidrofílicos o modos de llenado hidrofóbicos con la cubeta. La mayoría de los microfluidos se basan en la acción capilar (hidrofílica) para llenar los canales en una cubeta. Por el contrario, al menos algunas modalidades en la presente descripción pueden usar modos de llenado hidrofóbicos. En un ejemplo no limitante de un modo hidrofóbico de llenado, una punta dispensadora de líquido forma un sello con al menos un puerto de la cubeta, y la punta se puede usar para empujar el líquido hacia el canal de la cubeta bajo presión positiva, en donde hay típicamente un respiradero al final o en otra porción del canal en la cubeta para facilitar este tipo de llenado de líquido. Mediante el uso de una superficie hidrofoba en todo el canal o en porciones del mismo, se puede controlar hasta dónde llega el líquido al canal controlando la presión. En un ejemplo no limitante de una cubeta para uso en modo hidrofóbico de llenado, la capa superior de la cubeta puede ser acrílica y la parte inferior de la cubeta es de un material diferente. En una modalidad, la porción inferior de la cubeta puede definir tres lados del canal (parte inferior y dos lados) mientras que una capa de cubierta define la superficie superior del canal. La mayoría de los materiales ópticamente transparentes son hidrofobos, por lo que, para trabajar con estos materiales, el uso de la técnica de llenado a base de presión puede facilitar el llenado de este tipo de canales.

Debe entenderse que las modalidades en esta descripción pueden adaptarse para tener una o más de las características que se describen en esta descripción.

Este resumen se proporciona para presentar una selección de conceptos en una forma simplificada que se describen en más detalle más adelante en la descripción detallada. Este resumen no pretende identificar las características clave o las características esenciales del objeto reivindicado, ni pretende usarse para limitar el alcance del objeto reivindicado.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra un gráfico de la intensidad de la dispersión lateral (eje x) frente a la intensidad de la fluorescencia de una mezcla de células que incluye células asesinas naturales y neutrófilos marcados con un aglutinante fluorescente que reconoce CD16.

La Figura 1B muestra un gráfico de barras que muestra la relación entre el área nuclear y el área celular total de las células asesinas naturales ("NK") y los neutrófilos ("Neu").

La Figura 1C muestra células asesinas naturales teñidas con anticuerpo anti-CD 16 (columna izquierda) y una tinción nuclear (columna derecha).

La Figura 1D muestra neutrófilos teñidos con anticuerpo anti-CD16 (columna izquierda) y una tinción nuclear (columna derecha).

5 La Figura 2A muestra plaquetas marcadas con anticuerpos CD41 y CD61 conjugados con fluorescencia (puntos brillantes).

La Figura 2B muestra la distribución de intensidad de imágenes de plaquetas marcadas con fluorescencia con un aumento de 10X (izquierda) y 20X (derecha).

10 La Figura 2C muestra la distribución de intensidad de una imagen de una plaqueta marcada con fluorescencia que muestra la intensidad medida (gris claro) y el ajuste de la curva a la intensidad medida (gris oscuro).

La Figura 3 muestra: un gráfico de la curva que muestra la relación entre el diámetro nominal de las partículas estándar en μm (eje x) y la medida del tamaño basada en la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias (a.u.; eje y). La figura también muestra perlas representativas en diferentes puntos a lo largo de la curva.

15 La Figura 4A muestra glóbulos rojos esféricos con microscopía de campo oscuro en cubetas que solo permiten epi-iluminación.

La Figura 4B muestra glóbulos rojos esféricos con microscopía de campo oscuro en cubetas que permiten una mezcla de epi-iluminación y trans-iluminación.

La Figura 5A muestra neutrófilos en banda putativa teñidos con anticuerpo anti-CD16 y una tinción nuclear.

20 La Figura 5B muestra neutrófilos segmentados putativos teñidos con anticuerpo anti-CD16 y una tinción nuclear.

La Figura 6A muestra una modalidad de un sistema óptico adecuado como parte de un dispositivo o sistema como se describe en la presente descripción, y adecuado para su uso en los métodos que se describen en la presente descripción, que incluyen elementos ópticos ilustrativos (por ejemplo, una fuente de luz que se muestra como una luz anular y un objetivo), cubeta, y una estructura de soporte que se configura para sostener y posicionar una cubeta para formación de imágenes. En esta modalidad, la cubeta tiene una forma de sección transversal horizontal rectangular.

25 La Figura 6B muestra una modalidad de un sistema óptico adecuado como parte de un dispositivo o sistema como se describe en la presente descripción, y adecuado para su uso en los métodos que se describen en la presente descripción, que incluyen elementos ópticos ilustrativos (por ejemplo, una fuente de luz que se muestra como una luz anular y un objetivo), una cubeta, y una estructura de soporte que se configura para sostener y posicionar una cubeta para formación de imágenes. En esta modalidad, la cubeta tiene una forma de sección transversal horizontal circular.

30 La Figura 7A muestra modalidades de elementos de un sistema óptico adecuado para su uso en un dispositivo o sistema como se describe en la presente descripción, y adecuado para usar en los métodos que se describen en la presente descripción.

35 La Figura 7B muestra modalidades de elementos de un sistema óptico adecuado para su uso en un dispositivo o sistema como se describe en la presente descripción, y adecuado para su uso en métodos que se describen en la presente descripción, que comprende una lente adicional y una abertura adecuada para limitar el intervalo de ángulos de luz dispersa que alcanza un detector

40 La Figura 8A proporciona una vista de una modalidad de un sistema óptico que incluye una estructura de soporte para sujetar una cubeta para obtener imágenes de una muestra, en la que la luz de un sistema de iluminación de luz anular cae directamente sobre la muestra (epi-iluminación) y la luz también se refleja de la característica de la cubeta para proporcionar trans-iluminación también. En esta modalidad, la cubeta tiene una sección transversal vertical en forma de escalón.

45 La Figura 8B proporciona una vista de una modalidad de un sistema óptico que incluye una estructura de soporte para sujetar una cubeta para obtener imágenes de una muestra, en la que la luz de un sistema de iluminación de luz anular cae directamente sobre la muestra (epi-iluminación) y la luz también se refleja de la característica de la cubeta para proporcionar trans-iluminación también. Como se muestra, la luz incidente puede reflejarse completamente en una superficie (reflexión interna total, TIR) o solo una porción de la luz incidente puede reflejarse en una superficie (reflexión interna parcial, PIR). En esta modalidad, la cubeta tiene una sección transversal vertical en forma de diente de sierra.

50 La Figura 8C muestra una modalidad de un sistema óptico adecuado como parte de un dispositivo o sistema como se describe en la presente descripción, y adecuado para su uso en los métodos que se describen en la presente descripción, que incluyen elementos ópticos ilustrativos (por ejemplo, una fuente de luz que se muestra como una luz anular y un objetivo), una cubeta, y una estructura de soporte que se configura para sostener y posicionar una cubeta para formación de imágenes. En esta modalidad, la cubeta incluye características que afectan la trayectoria de la luz que ilumina la cubeta y la muestra dentro de la cubeta.

55 La Figura 8D muestra una modalidad de un sistema óptico adecuado como parte de un dispositivo o sistema como se describe en la presente descripción, y adecuado para su uso en los métodos que se describen en la presente descripción, que incluyen elementos ópticos ilustrativos (por ejemplo, una fuente de luz que dirige la luz desde una dirección transversal), una cubeta, y una estructura de soporte que se configura para sujetar y posicionar una cubeta para formación de imágenes. En esta modalidad, la cubeta incluye características que afectan la trayectoria de la luz que ilumina la cubeta y la muestra dentro de la cubeta.

60 La Figura 8E proporciona una representación esquemática del transporte de una cubeta desde una ubicación de preparación de muestras hasta una ubicación de observación de muestras cerca de un detector óptico (etiquetado como "D").

65

La Figura 8F proporciona una representación esquemática detallada adicional de un sistema que incluye un mecanismo de transporte para transportar una cubeta desde una ubicación de preparación de muestras hasta una ubicación de observación de muestras cerca de un detector óptico.

La Figura 9A es una imagen de campo oscuro que muestra imágenes de células sanguíneas representativas extraídas de sangre total. Las otras figuras de la Figura 9 también son imágenes representativas de células sanguíneas extraídas de sangre total, mediante el uso de diferentes técnicas de imagen y colorantes.

La Figura 9B es una imagen que muestra la fluorescencia de anticuerpos anti-CD14 marcados unidos a monocitos.

La Figura 9C es una imagen que muestra la fluorescencia de anticuerpos anti-CD123 marcados unidos a basófilos.

La Figura 9D es una imagen que muestra la fluorescencia de anticuerpos anti-CD16 marcados unidos a neutrófilos.

La Figura 9E es una imagen que muestra la fluorescencia de anticuerpos anti-CD45 marcados unidos a leucocitos.

La Figura 9F es una imagen que muestra leucocitos y células plaquetarias teñidas con tinción nuclear DRAQ5® (los glóbulos rojos, que carecen de núcleo, no se tiñen con DRAQ5®).

La Figura 10 es una imagen compuesta que muestra imágenes representativas de células sanguíneas extraídas de sangre total, que muestra un monocitos, un linfocito, un eosinófilo y un neutrófilo.

La Figura 11A muestra la identificación de monocitos mediante el gráfico de la intensidad del marcador de CD14 (FL-17) frente a la intensidad de dispersión (FL-9). Esta imagen y las otras imágenes en las Figuras 11B-11D muestran gráficos de fluorescencia detectada en células marcadas con diferentes marcadores (anticuerpos marcados dirigidos a diferentes superficies celulares u otros marcadores); dicho marcaje múltiple es útil para identificar células.

La Figura 11B muestra la identificación de basófilos mediante el gráfico de la intensidad de CD123 (FL-19) frente a la intensidad de CD16 (FL-15).

La Figura 11C muestra la identificación de linfocitos mediante el gráfico de la intensidad de CD16 (FL-15) frente a la intensidad de CD45 (FL-11).

La Figura 11D muestra la identificación de neutrófilos y eosinófilos mediante el gráfico de la intensidad de CD16 (FL-15) frente a la intensidad de dispersión (FL-9).

La Figura 12A representa los recuentos de glóbulos blancos que se obtienen por los presentes métodos frente a los recuentos de glóbulos blancos que se obtienen por el analizador de sangre comercial. Las Figuras 12A-12F muestran comparaciones de recuentos de células (medidas a partir de alícuotas de la misma muestra de sangre) que se obtienen mediante los presentes métodos y los que se obtienen mediante otros métodos (usando un analizador de sangre comercial).

La Figura 12B representa los recuentos de glóbulos rojos que se obtienen por los presentes métodos frente a los recuentos de glóbulos rojos que se obtienen por el analizador de sangre comercial.

La Figura 12C representa los recuentos de plaquetas que se obtienen por los presentes métodos frente a los recuentos de plaquetas que se obtienen por el analizador de sangre comercial.

La Figura 12D representa los recuentos de neutrófilos que se obtienen por los presentes métodos frente a los recuentos de neutrófilos que se obtienen por el analizador de sangre comercial.

La Figura 12E representa los recuentos de monocitos que se obtienen por los presentes métodos frente a los recuentos de monocitos que se obtienen por el analizador de sangre comercial.

La Figura 12F representa gráficamente los recuentos de linfocitos que se obtienen por los presentes métodos frente a los recuentos de linfocitos que se obtienen por el analizador de sangre comercial.

La Figura 13A muestra imágenes de campo oscuro de glóbulos blancos (WBC) que se obtienen usando microscopía. Las Figuras 13A-13E muestran imágenes de leucocitos que se obtienen mediante el uso de microscopía, para su uso en la realización de análisis de segmentación secuencial para determinar los contornos de cada célula y diferenciar así las imágenes de células de las imágenes de fondo.

La Figura 13B es una imagen de fluorescencia que muestra el marcaje de células por anticuerpos anti-CD45.

La Figura 13C es una imagen de fluorescencia de células marcadas por la tinción nuclear DRAQ5®.

La Figura 13D es una imagen de fluorescencia que muestra el marcaje de células por anticuerpos anti-CD16.

La Figura 13E es una imagen de fluorescencia que muestra el marcaje de células por anticuerpos anti-CD123.

La Figura 14A es una imagen de campo oscuro, que se obtiene mediante microscopía, de glóbulos blancos (WBC). Las Figuras 14A-14E muestran imágenes de WBC obtenidas mediante el uso de microscopía, como en la Figura 13, para realizar un análisis de segmentación secuencial para determinar los contornos externo (por ejemplo, membrana celular) e interno (por ejemplo, núcleo) para cada célula y así identificar el núcleo celular como así como también para diferenciar las regiones celulares de interés (ROI celulares) de las regiones de fondo. Las líneas dentro de las imágenes de las células identifican los límites del núcleo WBC para cada célula según lo determinado por el análisis de segmentación secuencial.

La Figura 14B es una imagen de fluorescencia que muestra el marcaje de células por anticuerpos anti-CD45.

La Figura 14C es una imagen de fluorescencia de células marcadas por la tinción nuclear DRAQ5®.

La Figura 14D es una imagen de fluorescencia que muestra el marcaje de células por anticuerpos anti-CD16.

La Figura 14E es una imagen de fluorescencia que muestra el marcaje de células por anticuerpos anti-CD123.

La Figura 15A es una imagen compuesta de las células que se muestran en las Figuras 13 y 14, con los contornos de las células que se obtienen por segmentación de cuencas hidrográficas realizada una vez. Las

Figuras 15A y 15B muestran imágenes compuestas de glóbulos blancos (WBC) que se muestran en las Figuras 13 y 14.

La Figura 15B es el resultado de la segmentación secuencial como se describe en la presente descripción aplicada a la imagen compuesta de las células que se muestran en las Figuras 13 y 14, que muestran los contornos de las células obtenidos por ese análisis.

Descripción detallada

La descripción que puede ayudar a comprender el alcance completo y las ventajas de los dispositivos, sistemas y métodos que se describen en la presente descripción se pueden encontrar, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 7,888,125; la patente de Estados Unidos 8,088,593; la patente de Estados Unidos 8,158,430; la patente de Estados Unidos 8,380,541; la solicitud PCT Núm. PCT/US2013/052141, presentada el 25 de julio de 2013; la solicitud PCT Núm. PCT/US2012/057155, presentada el 25 de septiembre de 2012; la solicitud PCT Núm. PCT/US2011/053188, presentada el 25 de septiembre de 2011; la solicitud PCT Núm. PCT/US2011/053189, presentada el 25 de septiembre de 2011; la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 14/098,177, presentada el 5 de diciembre de 2013; la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 13/951,063, presentada el 25 de julio de 2013; la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 13/951,449, presentada el 25 de julio de 2013; la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 13/769,798, presentada el 18 de febrero de 2013; la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 13/769,779, presentada el 18 de febrero de 2013; la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 13/769,818, presentada el 18 de febrero de 2013; la solicitud de patente de los Estados Unidos 13/769,820, presentada el 18 de febrero de 2013; la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 13/355,458, presentada el 20 de enero de 2012; la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 13/244,947 presentada el 26 de septiembre de 2011; la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 13/244,946, presentada el 26 de septiembre de 2011; la solicitud de patente de los Estados Unidos 13/244,949, presentada el 26 de septiembre de 2011; la solicitud de patente de los Estados Unidos 13/244,950, presentada el 26 de septiembre de 2011; la solicitud de patente de los Estados Unidos 13/244,951, presentada el 26 de septiembre de 2011; la solicitud de patente de los Estados Unidos 13/244,952, presentada el 26 de septiembre de 2011; la solicitud de patente de los Estados Unidos 13/244,953, presentada el 26 de septiembre de 2011; la solicitud de patente de los Estados Unidos 13/244,954, presentada el 26 de septiembre de 2011; la solicitud de patente de los Estados Unidos 13/244,956, presentada el 26 de septiembre de 2011; la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 61/673,245, presentada el 26 de septiembre de 2011; la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 61/675,811, presentada el 25 de julio de 2012; la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 61/676,178, presentada el 26 de julio de 2012; la solicitud de patente de los Estados Unidos 61/697,797, presentada el 6 de septiembre de 2012; la solicitud de patente de los Estados Unidos 61/766,113, presentada el 18 de febrero de 2013; la solicitud de patente de los Estados Unidos 61/766,116, presentada el 18 de febrero de 2013; la solicitud de patente de los Estados Unidos 61/766,076, presentada el 18 de febrero de 2013; la solicitud de patente de los Estados Unidos 61/786,351, presentada el 15 de marzo de 2013; la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 61/802,194, presentada el 15 de marzo de 2013; la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 61/837,151, presentada el 19 de junio de 2013; la solicitud de patente de los Estados Unidos 61/933,270, presentada el 29 de enero de 2014; la solicitud de patente de los Estados Unidos 61/930,419, presentada el 22 de enero de 2014; la solicitud de patente de los Estados Unidos 14/161,639, presentada el 22 de enero de 2014; y la solicitud de patente de los Estados Unidos 14/167,264, presentada el 29 de enero de 2014.

Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son solo ilustrativas y explicativas y no son restrictivas de la invención, como se reivindica. Debe notarse que, como se usa en la descripción y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otra forma. Así, por ejemplo, la referencia a "un material" puede incluir mezclas de materiales, la referencia a "un compuesto" puede incluir múltiples compuestos y similares.

Como se usa en la presente descripción, a menos que se indique explícitamente lo contrario, o a menos que el contexto aclare lo contrario, el significado del término "o" incluye tanto la disyuntiva ("o") como la conjuntiva ("y").

En esta descripción y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a una serie de términos, que se definirán para que tengan los siguientes significados:

"Opcional" u "opcionalmente" significa que la circunstancia descrita posteriormente puede ocurrir o no, por lo que la descripción incluye instancias en las que ocurre la circunstancia e instancias en las que no ocurre. Por ejemplo, si un dispositivo contiene opcionalmente una característica para una unidad de recolección de muestras, esto significa que la unidad de recolección de muestras puede estar presente o no y, por lo tanto, la descripción incluye estructuras en donde un dispositivo posee la unidad de recolección de muestras y estructuras en donde la unidad de recolección de muestras no está presente.

Como se usa en la presente descripción, los términos "sustancial" significan más que una cantidad mínima o insignificante; y "sustancialmente" significa más que mínimamente o insignificadamente. Así, por ejemplo, la frase

"sustancialmente diferente", como se usa en la presente descripción, denota un grado suficientemente alto de diferencia entre dos valores numéricos, de manera que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene significación estadística dentro del contexto de la característica medida por dichos valores. Por lo tanto, la diferencia entre dos valores que son sustancialmente diferentes entre sí es típicamente mayor que aproximadamente 10 % y puede ser mayor que aproximadamente 20 %, mayor que aproximadamente 30 %, mayor que aproximadamente 40 % o mayor que aproximadamente 50 % como una función del valor de referencia o valor de comparación.

Como se usa en la presente descripción, "reflexión interna" se refiere a la reflexión de la luz, dentro de un material (el primer material), en un límite entre el primer material y otro material (el segundo material). Por ejemplo, un primer material puede ser un sólido, tal como vidrio o plástico, y el segundo material puede ser, por ejemplo, aire. La luz que se refleja internamente viaja dentro del primer material antes de reflejarse. La reflexión interna puede ser parcial (reflexión interna parcial: PIR) o total (reflexión interna total: TIR). Por lo tanto, la reflexión interna donde toda la luz que incide en una superficie se refleja dentro del primer material es TIR, mientras que la reflexión interna donde no toda la luz que incide en una superficie se refleja dentro de un material es PIR (con PIR, parte de la luz puede atravesar el límite, y algo de luz se refleja en la superficie de regreso al material). El ángulo de incidencia es un factor importante para determinar el alcance de la reflexión interna; es el ángulo de un rayo de luz incidente medido contra una línea perpendicular a la superficie límite. Que ocurra o no TIR depende del ángulo de incidencia de la luz con respecto a la superficie en el límite entre el primer y el segundo material; el índice de refracción del primer material; el índice de refracción del segundo material; y otros factores (por ejemplo, la longitud de onda de la luz puede afectar a la TIR ya que el índice de refracción típicamente varía con la longitud de onda). El ángulo en el que la luz se refleja totalmente internamente se denomina ángulo crítico; la luz incidente que tenga un ángulo de incidencia mayor que el ángulo crítico se reflejará totalmente internamente (permanecerá dentro del material: TIR). Sin embargo, con PIR, una porción de la luz incidente que tiene un ángulo de incidencia menor que el ángulo crítico también se reflejará internamente (la luz restante se refractará y pasará del primer material al segundo material).

Como se usa en la presente descripción, una "muestra" puede ser, entre otras, una muestra de sangre, una muestra de orina u otra muestra biológica. Una muestra puede ser, por ejemplo, una muestra de sangre (por ejemplo, una muestra que se obtiene de una punción en el dedo o de una venopunción, o una muestra de sangre arterial, y puede ser sangre total, suero, plasma u otra muestra de sangre), una muestra de orina, una muestra de biopsia, un corte de tejido, una muestra de heces u otra muestra biológica; una muestra de agua, una muestra de suelo, una muestra de alimentos, una muestra de aire; u otra muestra (por ejemplo, frotis nasal o lavado nasofaríngeo, saliva, orina, lágrimas, líquido gástrico, líquido cefalorraquídeo, moco, sudor, cerumen, aceite, secreción glandular, líquido cefalorraquídeo, tejido, semen, líquido cervical, líquido vaginal, líquido sinovial, frotis de garganta, aliento, cabello, uñas, piel, biopsia, líquido placentario, líquido amniótico, sangre del cordón umbilical, líquidos linfáticos, fluidos de cavidades, esputo, moco, pus, una muestra de microbiota, meconio, leche materna u otras excreciones).

Por lo tanto, como se usa en la presente descripción, una "muestra" incluye una porción de sangre, orina u otra muestra biológica, puede ser de cualquier tamaño o volumen adecuado, y es preferentemente de pequeño tamaño o volumen. En algunas modalidades de los sistemas, ensayos y métodos descritos en la presente descripción, las mediciones se pueden realizar mediante el uso de una muestra de sangre de pequeño volumen, o no más de una porción de pequeño volumen de una muestra de sangre, donde un pequeño volumen comprende no más de aproximadamente 5 ml; o comprende no más de aproximadamente 3 ml; o comprende no más de aproximadamente 2 ml; o comprende no más de aproximadamente 1 ml; o comprende no más de aproximadamente 500 μ l; o comprende no más de aproximadamente 250 μ l; o comprende no más de aproximadamente 100 μ l; o comprende no más de aproximadamente 75 μ l; o comprende no más de aproximadamente 50 μ l; o comprende no más de aproximadamente 35 μ l; o comprende no más de aproximadamente 25 μ l; o comprende no más de aproximadamente 20 μ l; o comprende no más de aproximadamente 15 μ l; o comprende no más de aproximadamente 10 μ l; o comprende no más de aproximadamente 8 μ l; o comprende no más de aproximadamente 6 μ l; o comprende no más de aproximadamente 5 μ l; o comprende no más de aproximadamente 4 μ l; o comprende no más de aproximadamente 3 μ l; o comprende no más de aproximadamente 2 μ l; o comprende no más de aproximadamente 1 μ l; o comprende no más de aproximadamente 0,8 μ l; o comprende no más de aproximadamente 0,5 μ l; o comprende no más de aproximadamente 0,3 μ l; o comprende no más de aproximadamente 0,2 μ l; o comprende no más de aproximadamente 0,1 μ l; o comprende no más de aproximadamente 0,05 μ l; o comprende no más de aproximadamente 0,01 μ l.

En modalidades, el volumen de la muestra recolectada a través de una punción en el dedo puede ser, por ejemplo, aproximadamente 250 μ l o menos, o aproximadamente 200 μ l o menos, o aproximadamente 150 μ l o menos, o aproximadamente 100 μ l o menos, o aproximadamente 50 μ l o menos, o aproximadamente 25 μ l o menos, o aproximadamente 15 μ l o menos, o aproximadamente 10 μ l o menos, o aproximadamente 5 μ l o menos, o aproximadamente 3 μ l o menos, o aproximadamente 1 μ l o menos.

Como se usa en la presente descripción, el término "ubicación del punto de servicio" puede incluir ubicaciones donde un sujeto puede recibir un servicio (por ejemplo, pruebas, monitorización, tratamiento, diagnóstico, orientación, recolección de muestras, verificación de identidad, servicios médicos, servicios no médicos, etc.), y puede incluir, sin limitación, el hogar de un sujeto, el negocio de un sujeto, la ubicación de un proveedor de atención

médica (por ejemplo, un médico), hospitales, salas de emergencia, quirófanos, clínicas, consultorios de profesionales de la salud, laboratorios, minoristas [por ejemplo, farmacias (por ejemplo, farmacia minorista, farmacia clínica, farmacia hospitalaria), droguerías, supermercados, tiendas de comestibles, etc.], vehículos de transporte (por ejemplo, automóvil, barco, camión, autobús, avión, motocicleta, ambulancia, unidad móvil, camión de bomberos, 5 vehículo de emergencia, vehículo policial, coche de policía u otro vehículo que se configura para transportar a un sujeto de un punto a otro, etc.), unidades de atención médica itinerante, unidades móviles, escuelas, guarderías, ubicaciones de control de seguridad, ubicaciones de combate, residencias de salud asistida, oficinas gubernamentales, edificios de oficinas, tiendas de campaña, sitios de adquisición de muestras de fluidos corporales (por ejemplo, centros de recolección de sangre), sitios en o cerca de una entrada a un lugar al que un sujeto puede 10 desear acceder, sitios en o cerca de un dispositivo al que un sujeto puede desear acceder (por ejemplo, la ubicación de una computadora si el sujeto desea acceder a la computadora), una ubicación donde un dispositivo de procesamiento de muestras recibe una muestra, o cualquier otro punto de ubicación de servicio descrito en otra parte de la presente descripción.

15 El término "células", como se usa en el contexto de muestras biológicas, abarca muestras que generalmente son de tamaños similares a las células individuales, incluidas, entre otras, vesículas (tal como liposomas), células, viriones y sustancias unidas a pequeñas partículas tales como perlas, nanopartículas o microesferas.

20 Como se usa en la presente descripción, el término "se une" se refiere a una reacción, o interacción, entre dos materiales que conducen a la estrecha combinación de los dos; por ejemplo, una reacción entre un ligando y un receptor, en la que el ligando se une estrechamente al receptor, proporciona un ejemplo de unión. La combinación de un anticuerpo con su antígeno objetivo y de una proteína transportadora con su carga, tal como el factor intrínseco con vitamina B12, son otros ejemplos de reacciones en las que un material se une a otro.

25 El término "aglutinante", como se usa en la presente descripción, se refiere generalmente a cualquier compuesto o macromolécula, tal como un anticuerpo, que se une estrechamente o específicamente a un objetivo. Los aglutinantes incluyen, entre otros, anticuerpos (ya sean monoclonales o policlonales, fragmentos de anticuerpos, inmunoadhesinas y otras variantes e imitadores de anticuerpos), proteínas de unión naturales (por ejemplo, proteína de factor intrínseco que es específica de la vitamina B12), ligandos que se unen a sus receptores objetivo, sustratos 30 que se unen a enzimas particulares, pares de unión tales como avidina y biotina, moléculas pequeñas que se unen estrecha y específicamente a moléculas objetivo, y similares. Las bacterias, los virus, los andamios sintéticos y otros objetos y materiales que se unen o se adhieren a objetivos específicos pueden usarse como aglutinantes. Un aglutinante puede ser, o puede incluir, o puede unirse a, un marcador tal como un colorante, un fluoróforo u otra región detectable.

35 Como se usa en la presente descripción, un "marcador" es un material detectable cuya presencia hace que un objetivo sea visible o detectable de otro modo, o cuya presencia en una posición o ubicación es indicativa de la presencia de un objetivo en esa posición o ubicación. Se puede usar un marcador para marcar una célula, estructura, partícula u otro objetivo, y puede ser útil para detectar, determinar la presencia, localizar, identificar, 40 cuantificar o medir de otro modo un objetivo o una propiedad de una muestra. Los marcadores pueden incluir, sin limitación, tinciones, colorantes, ligandos, anticuerpos, partículas y otros materiales que pueden unirse o localizarse en objetivos o ubicaciones específicos; bacterias, virus o células que pueden crecer o localizarse en objetivos o ubicaciones específicas también pueden usarse como marcadores. Los atributos o propiedades detectables de las células u otros objetivos pueden usarse como marcadores.

45 Como se usa en la presente descripción, los términos "tinción" y "colorante" pueden ser intercambiables y se refieren a elementos, compuestos y macromoléculas que hacen que los objetos o componentes de una muestra sean más detectables que en ausencia de tratamiento con la tinción o el colorante. Por ejemplo, el tratamiento de una muestra de sangre con un colorante de ADN tal como el yoduro de propidio hace que los núcleos de las células nucleadas sean más visibles y hace que la detección y cuantificación de dichas células sea más fácil que de otra manera, 50 incluso en presencia de células no nucleadas (por ejemplo, glóbulos rojos).

55 Como se usa en la presente descripción, el término "surfactante" se refiere a un compuesto que es eficaz para reducir la tensión superficial de un líquido, tal como el agua. Un surfactante es típicamente un compuesto anfifílico, que posee propiedades tanto hidrófilas como hidrófobas, y puede ser eficaz para ayudar a la solubilización de otros compuestos. Un surfactante puede ser, por ejemplo, un surfactante hidrófilo, un surfactante lipófilo u otro compuesto, o mezclas de los mismos. Algunos surfactantes comprenden sales de bases o ácidos alifáticos de cadena larga, o fracciones hidrófilas tal como azúcares. Los surfactantes incluyen compuestos aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos y 60 no iónicos (donde el término "no iónico" se refiere a una molécula que no se ioniza en solución, es decir, es "iónicamente" inerte). Los ejemplos de compuestos anfifílicos comercialmente disponibles incluyen los surfactantes no iónicos Tergitol™; surfactantes aniónicos Dowfax™; polietilenglicoles y derivados de los mismos, incluidos los surfactantes Triton™; polisorbatos (polietilensorbitanes) tal como los compuestos TWEEN® y poloxámeros (por ejemplo, copolímeros en bloque de óxido de etileno/óxido de propileno) tal como los compuestos Pluronic®; 65 estearatos y sus derivados; lauratos y sus derivados; oleatos y sus derivados; fosfolípidos y sus derivados; lisofosfolípidos y sus derivados; esteroides y sus derivados; y combinaciones de los mismos.

Como se usa en la presente descripción, un "detector" puede ser cualquier dispositivo, instrumento o sistema que proporcione información derivada de una señal, imagen u otra información relacionada con un objetivo, tal como una muestra. Las señales e información detectables pueden incluir, por ejemplo, señales ópticas, eléctricas, mecánicas, químicas, físicas u otras. Un detector puede ser, por ejemplo, un detector óptico, un detector eléctrico, un detector químico, un detector electroquímico, un detector acústico, un detector de temperatura, un detector mecánico u otro detector.

Como se usa en la presente descripción, un "detector óptico" detecta radiación electromagnética (por ejemplo, luz). Un detector óptico puede detectar una imagen o usarse con una imagen, o puede detectar la intensidad de la luz independientemente de una imagen, o ambas cosas. Un detector óptico puede detectar o medir la intensidad de la luz. Algunos detectores ópticos pueden ser sensibles a, o restringirse a, detectar o medir una longitud de onda particular o intervalo de longitudes de onda. Por ejemplo, los detectores ópticos pueden incluir, por ejemplo, detectores de fotodiodos, fotomultiplicadores, dispositivos de carga acoplada, diodos láser, espectrofotómetros, cámaras, microscopios u otros dispositivos que miden la intensidad de la luz (de una sola longitud de onda, de múltiples longitudes de onda o de un intervalo, o intervalos, de longitudes de onda de luz), forman una imagen, o ambos.

El término "ploidía" como se usa en la presente descripción se refiere a la cantidad de ADN en una célula ya los ensayos y mediciones del contenido de ADN de las células en una muestra. Las mediciones de ploidía proporcionan una medida de si una célula, o una población de células, tienen una cantidad normal o anormal de ADN o, dado que el ADN se duplica durante la división y proliferación celular, si proliferan cantidades anormales de células en una población. Las mediciones de ploidía pueden realizarse mediante técnicas de formación de imágenes tras la tinción de células nucleadas en una muestra con un colorante específico de ADN.

Microscopía Cuantitativa

En algunas modalidades, se proporcionan en la presente descripción métodos, sistemas y dispositivos para microscopía cuantitativa. La microscopía cuantitativa puede implicar uno o más métodos de microscopía de fluorescencia cuantitativa, microscopía de campo oscuro cuantitativa, microscopía de campo claro cuantitativa y microscopía de contraste de fase cuantitativa para medir uno o más atributos celulares. Cualquiera de estos métodos puede proporcionar información morfológica sobre las células. Dicha información puede medirse cuantitativamente. En algunas modalidades, para microscopía cuantitativa, una muestra se analiza mediante dos o más de microscopía de fluorescencia cuantitativa, microscopía de campo oscuro cuantitativa, microscopía de campo claro cuantitativa y microscopía de contraste de fase cuantitativa. La microscopía cuantitativa puede incluir el uso de técnicas de análisis de imágenes o métodos de clasificación y aprendizaje estadístico para procesar imágenes que se obtienen por microscopía.

Se pueden medir múltiples atributos celulares diferentes durante la microscopía cuantitativa. Los atributos celulares que se pueden medir incluyen, sin limitación:

Atributos físicos: por ejemplo, tamaño de célula, volumen, conductividad, dispersión de ángulo bajo y alto y densidad. Otros atributos físicos que pueden medirse o cuantificarse incluyen, sin limitación, la circularidad de una célula o partícula; relación de aspecto de una célula o partícula; perímetro de una célula o partícula; convexidad de una célula o partícula; granularidad de una célula o partícula; intensidad de una imagen de una célula o partícula; altura (por ejemplo, tamaño a través de varios planos focales) de una célula o partícula; planitud de una célula o partícula; y otros atributos físicos.

Atributos morfológicos: por ejemplo, forma, área, tamaño y lobularidad de las células; área, tamaño y lobularidad de la forma del núcleo; forma, área, tamaño y lobularidad de las mitocondrias; y la relación entre el volumen nuclear y el volumen celular.

Atributos intracelulares: por ejemplo, distancia entre el centroide del núcleo y el centroide de la célula (es decir, la distancia entre el centro del núcleo y el centro de la célula), la distancia del centroide del lóbulo del núcleo (es decir, la distancia entre el centro de los diferentes lóbulos del núcleo), la distribución de proteínas dentro de las células (por ejemplo, actina, tubulina, etc.), distribución de organelas dentro de las células (por ejemplo, lisosomas, mitocondrias, etc.), colocalización de proteínas con otras proteínas y organelas, y otros atributos.

Atributos bioquímicos: por ejemplo, nivel de expresión de proteínas celulares, proteínas de la superficie celular, proteínas citoplasmáticas, proteínas nucleares, ácidos nucleicos celulares, ácidos nucleicos de la superficie celular, ácidos nucleicos citoplasmáticos, ácidos nucleicos nucleares, carbohidratos celulares, carbohidratos de la superficie celular, carbohidratos citoplasmáticos y carbohidratos nucleares.

En algunas modalidades, se proporcionan métodos, sistemas y dispositivos en la presente descripción para la medición cuantitativa de dos, tres, cuatro, cinco o más atributos de las células en una muestra, en donde los atributos se seleccionan de atributos físicos, atributos morfológicos, atributos intracelulares y atributos bioquímicos. En algunas modalidades, se proporcionan métodos, sistemas y dispositivos en la presente descripción para la

medición cuantitativa de dos, tres, cuatro, cinco o más atributos de las células en una muestra, en donde los atributos se seleccionan entre: el tamaño de la célula, el volumen de la célula, la conductividad de la célula, la dispersión de luz de ángulo bajo celular, la dispersión de luz de ángulo alto celular, la densidad celular, la forma celular, el área celular, la lobularidad celular, la forma del núcleo, el área del núcleo, el tamaño del núcleo, la lobularidad del núcleo, la forma de las mitocondrias, el área de las mitocondrias, el tamaño de las mitocondrias, la lobularidad de las mitocondrias, la relación de volumen nuclear a volumen celular, la distancia del centroide del núcleo/centroide de la célula, la distancia del centroide del lóbulo del núcleo, la distribución de proteínas con las células (por ejemplo, actina, tubulina, etc.), la distribución de organelas dentro de las células (por ejemplo, lisosomas, mitocondrias, etc.), el nivel de expresión de una proteína celular, el nivel de expresión de una proteína de superficie celular, el nivel de expresión de una proteína citoplasmática, el nivel de expresión de una proteína nuclear, el nivel de expresión de un ácido nucleico celular, el nivel de expresión de un ácido nucleico de la superficie celular, el nivel de expresión de un ácido nucleico citoplasmático, el nivel de expresión de un ácido nucleico nuclear, el nivel de expresión de un carbohidrato celular, el nivel de expresión de un carbohidrato de la superficie celular, el nivel de expresión de un carbohidrato citoplasmático y el nivel de expresión de un carbohidrato nuclear.

En algunas modalidades, se proporcionan métodos para la medición cuantitativa de dos, tres, cuatro, cinco o más atributos de las células en una muestra biológica por microscopía, en donde el método puede incluir uno o más de las siguientes etapas o elementos. Los atributos de las células que se miden cuantitativamente pueden seleccionarse de los atributos enumerados en el párrafo inmediatamente anterior. La muestra biológica se puede pretratar antes de la microscopía. El pretratamiento puede incluir cualquier procedimiento para ayudar en el análisis de la muestra por microscopía, incluyendo: tratamiento de la muestra para enriquecer las células de interés para microscopía, tratamiento de la muestra para reducir los componentes en la muestra que pueden interferir con la microscopía, adición de material a la muestra para facilitar el análisis de la muestra por microscopía (por ejemplo, diluyentes, moléculas de bloqueo para reducir la unión no específica de colorantes a las células, etc.). Opcionalmente, antes de la microscopía, una muestra puede ponerse en contacto con uno o más aglutinantes que se unen específicamente a un componente celular. Los aglutinantes se pueden vincular directamente a un colorante u otra partícula para la visualización del aglutinante. Una muestra también puede ponerse en contacto con un aglutinante secundario, que se une al aglutinante que se une al componente celular. Un aglutinante secundario puede vincularse directamente a un colorante u otra partícula para la visualización del aglutinante. Antes de la microscopía, una muestra puede analizarse en un espectrofotómetro. Para microscopía, una muestra biológica que contenga o se sospeche que contenga un objeto para análisis microscópico puede introducirse en un portamuestras, tal como un portaobjetos o una cubeta. El portamuestras que contiene una muestra puede introducirse en un dispositivo que se configura para realizar microscopía cuantitativa en la muestra. El microscopio puede acoplarse con un sensor de imagen para capturar imágenes que se generan a través del objetivo del microscopio. En el dispositivo, se pueden adquirir múltiples imágenes de la muestra por microscopía. Pueden usarse cualquiera o más de microscopía de fluorescencia cuantitativa, microscopía de campo oscuro cuantitativa, microscopía de campo claro cuantitativa y microscopía de contraste de fase cuantitativa para obtener imágenes de la muestra. Opcionalmente, las imágenes de la muestra completa en el portamuestras pueden adquirirse mediante microscopía. Es posible que se requieran varios campos de visión del microscopio para capturar imágenes de toda la muestra en el portamuestras. El portamuestras puede moverse con relación al microscopio o el microscopio puede moverse con relación al portamuestras para generar diferentes campos de visión para examinar diferentes porciones de la muestra en el portamuestras. Se pueden adquirir múltiples imágenes del mismo campo de visión de la muestra en el portamuestras. Opcionalmente, se pueden usar múltiples filtros con el mismo tipo de microscopía y el mismo campo de visión de la muestra, para adquirir diferentes imágenes de la misma muestra que contienen información diferente relacionada con la muestra. Los filtros que se pueden usar incluyen, sin limitación, filtros de paso de banda y de paso largo. Los filtros pueden permitir el paso de ciertas longitudes de onda de luz y bloquear el paso de otras. Opcionalmente, se pueden usar múltiples tipos de microscopía (por ejemplo, fluorescencia, campo oscuro, campo claro, etc.) para adquirir imágenes del mismo campo de visión de la muestra, para adquirir diferentes imágenes de la misma muestra que contienen diferente información relacionada a la muestra. Opcionalmente, se puede usar video para recopilar imágenes de microscopía. Opcionalmente, las imágenes de microscopía se pueden recopilar en 3-D. Para microscopía que se realiza como se describe en la presente descripción, el dispositivo o sistema puede configurarse para vincular información relacionada con una célula en una imagen de la muestra a la misma célula en una imagen diferente de la muestra. En base a diferentes imágenes de la misma muestra o de las mismas células, se pueden determinar múltiples atributos de células en la muestra. En algunos aspectos, la combinación de múltiples atributos/múltiples partes de información sobre las células en una muestra puede usarse para llegar a una decisión clínica o para sacar una conclusión sobre las células que no sería posible en base a la información de un solo atributo de las células.

En algunas modalidades, se proporcionan dispositivos y sistemas para la medición cuantitativa de dos, tres, cuatro, cinco o más atributos de las células en una muestra biológica por microscopía. En algunas modalidades, el dispositivo o sistema contiene un microscopio o citómetro y un espectrofotómetro. El dispositivo o sistema puede contener además un aparato de manejo de fluidos, que se configura para mover la muestra entre un espectrofotómetro y un microscopio o citómetro. En algunas modalidades, los dispositivos y sistemas para realizar los métodos que se describen en la presente descripción se configuran como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 13/244,947 y la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 13/769,779. Aunque lo anterior se ha descrito en el contexto de una célula, también debe entenderse que parte o

todo lo anterior también se puede aplicar a cristales, partículas, filamentos u otros objetos del tamaño de una célula que se pueden encontrar en una muestra.

Dilución Dinámica

5 En algunas modalidades, en la presente descripción se proporcionan métodos, sistemas y dispositivos para la dilución dinámica de muestras que contienen células.

10 A modo de ejemplo no limitante, un método para la dilución dinámica de una muestra puede incluir uno o más de las siguientes etapas o elementos, de manera que se determine el número o la concentración deseados de células u objetos en la muestra y esta información se use como un factor en el ajuste del procesamiento de muestras aguas abajo. En este ejemplo no limitante, se pueden añadir uno o más colorantes o tinciones a una muestra biológica que contiene células. La mezcla de colorante y muestra se puede incubar. Las células de la mezcla de colorante y muestra pueden lavarse para eliminar el exceso de colorante (no unido). Las células lavadas y teñidas se pueden 15 preparar en un volumen deseado para su posterior análisis. Las células lavadas y teñidas pueden analizarse para determinar el número aproximado o la concentración de células en la muestra o una porción de la misma. En base al número o concentración de células teñidas en la muestra o porción de la misma, se puede obtener un volumen de muestra para análisis adicional, de manera que se obtenga el número o concentración deseada de células para análisis adicional. En algunas modalidades, las muestras se pueden diluir como se describe en la solicitud de 20 patente de los Estados Unidos núm. 13/355,458.

En una modalidad como se describe en la presente descripción, es conveniente proporcionar otra técnica de detección tal como, pero sin limitarse a, un método que se basa en fluorescencia para enumerar células, para 25 estimar la concentración de células en lugar de usar un contador de células. Esta estimación se describe porque, para una tinción precisa y reproducible de muestras de pacientes, a menudo es conveniente que las tinciones (colorantes de ADN/anticuerpos/aglutinantes/etc.) se titulen de manera óptima para una cantidad/concentración específica de células. Por ejemplo, se aplicará una concentración conocida de colorante a un número específico de células (por ejemplo, 0,2 microgramos de colorante por mil glóbulos blancos (WBC)). Después de un período de incubación, la muestra se lavará para eliminar el exceso de colorante (no unido), se preparará con la densidad celular adecuada y se tomará la imagen. 30

En este ejemplo no limitante, para hacer una estimación de la concentración de células para un tipo de célula específico, se mide una muestra de forma no destructiva con una modalidad diferente a la que se usa para la citometría, tal como, entre otros, un espectrofotómetro, para informar el procesamiento de muestras para el ensayo 35 citométrico. El método puede comprender seleccionar otro marcador único para la población celular de interés. En un ejemplo no limitante, para las células B, se puede elegir CD20. El proceso comprende marcar la muestra con aglutinantes anti-CD20 conjugados con un fluoróforo de color diferente al CD5. A continuación, se mide la señal fluorescente de esta muestra de forma rápida y no destructiva mediante el uso de un dispositivo tal como, entre otros, un espectrofotómetro de fluorescencia. Mediante el uso de la calibración, es posible predecir la concentración de células B con precisión limitada para proporcionar la estimación. En un ejemplo no limitante, la calibración puede correlacionar la intensidad de la señal con el número de células para ese tipo de señal. La creación de estas curvas de calibración se puede usar para estimar el número de células u objetos. No se excluyen otras técnicas para 40 estimar el número de células en base a una intensidad de señal global tales como, entre otras, ópticas, eléctricas, acústicas o similares. En base a la concentración aproximada de células B, el sistema puede estimar la cantidad y la concentración apropiadas de aglutinante anti-CD5 para que se mantenga la relación proporcional entre la expresión de CD5 y la fluorescencia de CD5. De esta manera, la tinción y el procedimiento de tinción se pueden optimizar/normalizar para un número de células en particular. 45

Para maximizar el uso de muestras de pacientes (que pueden ser muestras de bajo volumen, tal como, por ejemplo, la sangre que se obtiene de una punción en el dedo, con un volumen igual o inferior a aproximadamente 120 μ L), es conveniente desarrollar métodos de manera que el número de glóbulos blancos contenidos en un volumen dado de sangre se pueda enumerar (por ejemplo, determinar la concentración de glóbulos blancos/ μ l). Esto permite determinar, o al menos estimar, el número de glóbulos blancos antes de agregar tinciones. Una vez que se determina, se puede dividir en alícuotas el número deseado de células para la incubación con una concentración 50 conocida de colorantes, lo que produce una resolución óptima de las subpoblaciones celulares. 55

En una aplicación en la que se desea medir la ploidía de las células, las células de una muestra se pueden teñir con un colorante de ADN y luego se puede cuantificar la intensidad de la tinción (donde "la intensidad de la tinción" significa la intensidad de una señal óptica debida al colorante). La intensidad de la señal del colorante debida a dicha tinción depende de la relación de ADN/colorante (es decir, de la cantidad de ADN teñido por el colorante a la 60 cantidad de colorante añadido). Si se agrega una cantidad predeterminada de colorante a cada muestra, independientemente de las características de la muestra, las muestras con una concentración de células muy alta serán menos brillantes en comparación con las muestras con una concentración de células baja. Esta situación confundiría la cuantificación de la cantidad de ADN en cada célula. Como se describe en la presente descripción, obtener una estimación del número de células nucleadas en una muestra antes de agregar el colorante permite 65 ajustar la cantidad de colorante para que la cuantificación del ADN y de la cantidad de ADN por célula en la muestra

se pueda realizar. Así, por ejemplo, una muestra, o una alícuota de una muestra, puede tratarse con una tinción o colorante dirigido a un marcador de superficie celular indicativo de la célula o células que se van a cuantificar, y ese marcador de superficie puede usarse para estimar de forma no destructiva la concentración de células en la muestra. Esta concentración estimada se puede usar para calcular la cantidad de colorante que debe agregarse a la muestra para mantener siempre un ADN constante: relación de colorante (mol a mol) para las mediciones posteriores.

En un primer ejemplo de un método que se basa en fluorescencia para enumerar células, un método puede comprender determinar la ploidía de las células (por ejemplo, enumerar células mediante tinción de anticuerpos conjugados con fluoróforo). En este ejemplo no limitante, se desea enumerar los glóbulos blancos en una muestra de sangre para que un número específico de glóbulos blancos se pueda teñir con una concentración predeterminada de colorante de ADN (por ejemplo, 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), o 1,5-bis[[2-(di-metilamino) etil]amino]-4, 8-dihidroxiantraceno-9,10-diona (DRAQ5[®]), o yoduro de propidio, u otro colorante de tinción de ADN). El método de este ejemplo comprende el recuento de glóbulos blancos mediante el uso de un anticuerpo conjugado con fluoróforo y un espectrofotómetro. Debe entenderse que este enfoque puede ser útil al teñir células con un colorante de ADN y determinar la ploidía, donde la relación entre el número de células y la concentración de colorante de ADN (número de células: [colorante de ADN]) es conveniente para generar datos comparables y consistentes. Dado que el número de células por microlitro de sangre varía dentro de una población sana, típicamente es conveniente determinar el número de glóbulos blancos por microlitro antes de intentar la tinción de ploidía.

En una modalidad, el procedimiento comprende el uso de células que primero se tiñen con un anticuerpo conjugado con fluoróforo (donde el anticuerpo se dirige preferentemente a un antígeno expresado de forma ubicua, tal como CD45, o a un antígeno específico de subpoblación, tal como CD3 para células T), o colorante fluorescente que marca todas las células (por ejemplo, una membrana o tinción citoplásmica tal como eosina, o una lectina u otra tinción o colorante) donde la longitud de onda de la fluorescencia del fluoróforo es espectralmente distinta (y preferentemente distante) de la longitud de onda de emisión del colorante de ADN. Después de un período de incubación, la muestra se lava para eliminar el exceso de anticuerpo (no unido), se prepara en el volumen adecuado y se analiza mediante un espectrofotómetro. Los datos resultantes permiten determinar el número de glóbulos blancos en una muestra de sangre, de modo que se pueda dividir en alícuotas un volumen específico de sangre (lo que produce un número particular/deseado de glóbulos blancos) y teñirlo con un colorante de ADN. Los datos resultantes son útiles para calcular y adaptar la cantidad de colorante de ADN que se usará para teñir una muestra, de acuerdo con el número de glóbulos blancos determinado mediante el uso del anticuerpo conjugado con fluoróforo como se describe.

Una modalidad adicional comprende determinar el número de células (mediante tinción de ADN) antes de la tinción de la superficie de las células. También se pueden encontrar detalles adicionales en la sección de enumeración de células a continuación. A veces es conveniente enumerar los glóbulos blancos en una muestra de sangre para poder teñir un número específico de glóbulos blancos con concentraciones óptimas de anticuerpos. En una modalidad, el método comprende el recuento de glóbulos blancos mediante el uso de un colorante de ADN y un espectrofotómetro, por ejemplo, como describió anteriormente.

Alternativamente, si el número de células por microlitro se determinó antes de la tinción, se podría dividir en alícuotas y teñir un número conocido de células para cada muestra, independientemente de (i) la variación dentro de una población sana y (ii) el estado de la enfermedad. Para determinar el número de células por microlitro de sangre, es posible utilizar colorantes de ADN tales como DAPI, DRAQ5[®] o yoduro de propidio. Opcionalmente, el colorante no unido puede eliminarse por lavado. Se puede usar un espectrofotómetro para determinar el número de células nucleadas (por ejemplo, DRAQ5[®] positivas) por microlitro de sangre.

El número y la concentración de glóbulos blancos (WBC) en alícuotas de sangre del mismo tamaño pueden variar de un sujeto a otro. Sin embargo, para un análisis adecuado de los glóbulos blancos en una muestra de sangre, se pueden agregar cantidades suficientes de reactivos (tal como anticuerpos dirigidos a antígenos específicos de glóbulos blancos), y la cantidad suficiente depende del número y la concentración de glóbulos blancos en una muestra de sangre. Se puede usar un procedimiento denominado "dilución dinámica" para garantizar que se agregue suficiente reactivo de anticuerpo a una muestra. En un ejemplo no limitante, el procedimiento trata las células sanguíneas para obtener un recuento celular provisional usado para medir la cantidad adecuada de reactivo (por ejemplo, un cóctel de anticuerpos para teñir los glóbulos blancos (WBC)) que se usará con la muestra para proporcionar una tinción completa de las células. En el procedimiento, las células se tiñen con un colorante de ADN (por ejemplo, DAPI, DRAQ5[®] o yoduro de propidio) que es espectralmente distinto/distante de la emisión de los anticuerpos conjugados con fluoróforo que se usará en etapas o ensayos posteriores. Opcionalmente, la muestra se puede lavar para eliminar el exceso de colorante de ADN (no unido) después de un período de incubación. Después de un período de incubación, la muestra se puede preparar en el volumen apropiado y se puede tomar una imagen o medir mediante el uso de un espectrofotómetro. Los datos resultantes permiten enumerar/determinar el número de glóbulos blancos en el volumen conocido de muestra, de modo que se pueda dividir en alícuotas un volumen específico de sangre (lo que produce un número particular/deseado de glóbulos blancos) y teñir con la cantidad adecuada de anticuerpos (es decir, en base al número estimado de WBC determinado con el colorante de ADN, se puede determinar la cantidad de anticuerpos necesarios para proporcionar la saturación deseada de tinción de

anticuerpos). Por lo tanto, la estimación proporcionada por la tinción de ADN permite el cálculo y la adición de la cantidad adecuada de colorante de anticuerpo necesaria para el número de glóbulos blancos en la alícuota de la muestra.

5 Protocolo de Dilución Dinámica:

En una modalidad, un protocolo de dilución dinámica implica tomar una alícuota de una muestra de sangre que contiene glóbulos blancos (WBC) (por ejemplo, sangre total o una porción de sangre que contiene WBC) para estimar la cantidad de reactivo que contiene anticuerpos dirigidos a los WBC que es necesario para el análisis de la muestra.

En este ejemplo no limitante, se toma un volumen conocido de una muestra de sangre. Se añade una cantidad conocida de colorante nuclear (por ejemplo, un colorante de tinción de ADN TAL como yoduro de propidio, DAPI o DraQ5®) a esta muestra de volumen conocido. Luego, la mezcla se incuba durante un período de 2 a 10 minutos a una temperatura entre 25 °C y 40 °C.

A continuación, se añade un tampón de lisis de glóbulos rojos (RBC). En este ejemplo no limitante, la mezcla se incuba luego durante un período de 2 a 10 minutos a una temperatura entre 25 °C y 40 °C (también se pueden usar temperaturas más bajas). Un tampón de lisis adecuado puede ser, por ejemplo, una solución salina hipotónica; una solución hipotónica de sacarosa; una solución isotónica de cloruro de amonio; una solución isotónica que incluye un surfactante suave tal como la saponina u otro tampón en el que se lisarán los glóbulos rojos. Se pueden usar otros surfactantes que se describen en la presente descripción; por ejemplo, los surfactantes que pueden ser adecuados para su uso en un tampón de lisis incluyen, sin limitación, polisorbatos (por ejemplo, TWEEN™), polietilenglicoles (por ejemplo, surfactantes Triton™), poloxámeros (por ejemplo, PLURONICS™), detergentes y otros agentes anfífilos. compuestos. En modalidades, dichos tampones de lisis incluirán un fijador (tal como, por ejemplo, formaldehído, paraformaldehído, glutaraldehído u otro fijador) para ayudar a estabilizar los glóbulos blancos. Un surfactante tal como la saponina provoca la formación de un gran número de agujeros en las membranas de las células. Los glóbulos rojos, debido a sus propiedades únicas de membrana, son particularmente susceptibles a la formación de este agujero y se lisan por completo, y su contenido se filtra al líquido que los rodea. La presencia de un fijador evita la lisis involuntaria de los glóbulos blancos. Las plaquetas también permanecen sin lisar. El propósito de esta etapa es eliminar los glóbulos rojos intactos de la mezcla, ya que superan en número a los glóbulos blancos en aproximadamente 1000:1. Las plaquetas no interfieren con la obtención de imágenes y, por lo tanto, no se tienen en cuenta en este proceso. En modalidades, un tampón de lisis también puede contener perlas no fluorescentes en una concentración conocida; estas perlas pueden servir como marcadores de tamaño o concentración. La lisis de los glóbulos rojos, junto con las etapas posteriores de este protocolo, elimina sustancialmente cualquier interferencia de glóbulos rojos en la obtención de imágenes o en las mediciones ópticas de los glóbulos blancos. Dicha optimización de la relación de agente lítico a fijador (por ejemplo, saponina a paraformaldehído) proporciona una lisis eficaz de los glóbulos rojos con un volumen mínimo de tampón de lisis y con efectos adversos mínimos en los glóbulos blancos (o plaquetas) en una muestra. Al aumentar la concentración tanto del agente lítico como del fijador (por ejemplo, concentraciones de saponina y paraformaldehído, respectivamente), los solicitantes han podido reducir la concentración del tampón de lisis al volumen de la muestra de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 4:1 (volumen del tampón de lisis:volumen de la muestra). Aumentos adicionales en la concentración de agente lítico corren el riesgo de un aumento excesivo de la lisis de glóbulos blancos, así como la lisis deseada de glóbulos rojos.

A continuación, se separa la muestra tratada, pudiendo realizarse la separación mediante cualquier método adecuado, tal como, entre otros, centrifugar la muestra tratada en una centrífuga a 1200 xg durante 3 minutos.

Después de la separación (por ejemplo, centrifugación), se elimina el sobrenadante; luego se resuspende el sedimento restante. En las modalidades, el sedimento se resuspende en parte o en todo el sobrenadante. De esta etapa resulta un volumen conocido de solución que contiene el sedimento resuspendido.

Si se desea, se puede realizar una etapa de separación adicional y una etapa de resuspensión adicional. Estas etapas proporcionan una muestra concentrada con células que tienen una concentración de aproximadamente 10 veces (ignorando cualquier posible pérdida de células en cada etapa).

Luego se mide la cantidad de colorante de tinción de ADN en la muestra concentrada resuspendida. Por ejemplo, la fluorescencia de un colorante de tinción de ADN fluorescente tal como DRAQ5® puede medirse en un espectrofotómetro. En modalidades, la muestra se puede iluminar con luz a una longitud de onda de 632 nm (la longitud de onda de excitación de DRAQ5®), la luz emitida por la suspensión celular se puede filtrar mediante un filtro de paso largo de 650 nm y luego la luz emitida se puede medir en un espectrofotómetro. Luego, esta medición de emisión se correlaciona con una curva de calibración generada previamente para estimar una concentración aproximada de glóbulos blancos en la suspensión celular. Típicamente, las concentraciones de células han oscilado entre unas 1000 células por microlitro y unas 100 000 células por microlitro. La estimación del número de glóbulos blancos que se obtiene de esta manera se puede usar para calcular un factor de dilución apropiado para garantizar que la concentración de células en la muestra, cuando se use en mediciones cuantitativas posteriores, esté restringida dentro de un intervalo (por ejemplo, un intervalo doble u otro) alrededor de una concentración objetivo

predefinida. Luego, la muestra se diluye según el factor de dilución calculado para proporcionar una muestra con una concentración de glóbulos blancos dentro del intervalo de concentración deseado.

El propósito de esta etapa de "dilución dinámica" es garantizar que los glóbulos blancos no estén presentes en una concentración demasiado alta o demasiado baja en la muestra. Si la concentración de células es demasiado alta, la precisión de los algoritmos de procesamiento de imágenes se ve comprometida, y si la concentración de células es demasiado baja, se muestrea un número insuficiente de células. La dilución de una muestra concentrada como se describe en la presente descripción proporciona concentraciones de WBC dentro de un intervalo deseado y asegura que las señales de la muestra durante el análisis se encuentren dentro de un intervalo óptimo para la detección y el análisis.

Además, la estimación del número de WBC de esta manera permite el cálculo (dentro de un intervalo pequeño) de las cantidades de reactivos necesarios para ensayos posteriores y etapas del método aplicados a la muestra, ya que el número de WBC en una muestra puede variar, pero la cantidad de reactivo necesaria para los diversos ensayos puede depender del número de glóbulos blancos en la muestra que se va a analizar. Por ejemplo, los reactivos que se agregarán después de la estimación del número de glóbulos blancos mediante el protocolo de dilución dinámica incluyen anticuerpos que se dirigen a antígenos específicos que se encuentran en diferentes tipos de glóbulos blancos o, si estos antígenos se encuentran en varios tipos de glóbulos blancos, que están presentes en diferentes cantidades en diferentes tipos de glóbulos blancos. En ausencia de dicha estimación del número de WBC en una muestra, se deben usar cantidades predeterminadas de colorantes y otros reactivos en los ensayos posteriores de la muestra, lo que genera cantidades incorrectas de reactivos y resultados de ensayos inexactos o incompletos. Por lo tanto, este protocolo de dilución dinámica sirve como una etapa inicial importante y útil en la evaluación completa de una muestra de sangre de un paciente, y permite realizar mediciones más precisas de lo que sería posible de cualquier otra manera.

Tinción Dinámica

En algunas modalidades, se proporcionan en la presente descripción métodos, sistemas y dispositivos para la tinción dinámica de muestras que contienen células.

Medición de un Componente de Interés en Células de una Población Celular

En una modalidad, un método para teñir dinámicamente una muestra celular se relaciona con un método para medir un componente de interés en las células de una población celular en una muestra.

Como se usa en la presente descripción, un "componente de interés" se refiere a cualquier tipo de molécula que pueda estar presente en una célula. Los "componentes de interés" incluyen proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. Típicamente, un "componente de interés" es una especie específica de molécula, tal como un antígeno particular. Los ejemplos no limitantes de "componentes de interés" de una célula incluyen: proteína CD5, proteína CD3, etc.

Como se usa en la presente descripción, una "población celular" se refiere a cualquier agrupación de células, en base a una o más características comunes. Una "población celular" puede tener cualquier grado de amplitud y puede incluir un gran número de células o sólo un pequeño número de células. Los ejemplos no limitantes de "poblaciones celulares" incluyen: glóbulos rojos (RBC), glóbulos blancos, células B, células B CD34+, etc.

En algunas circunstancias, puede ser conveniente medir cuantitativamente un componente de interés en células de una determinada población celular en una muestra de un sujeto. Por ejemplo, puede ser conveniente medir el grado de expresión de CD5 (el "componente de interés") en células B (la "población celular") en una muestra de células de un sujeto que tiene leucemia linfocítica crónica. La detección o medición del nivel de un componente de interés puede implicar el uso de una molécula de unión que tenga afinidad por el componente específico de interés, tal como un anticuerpo o un fragmento variable de cadena sencilla ("scFv"). Para medir con precisión el nivel de un componente específico de interés en las células en un método que implique el uso de una molécula aglutinante, puede ser ventajoso exponer las células a la molécula aglutinante en una relación específica o intervalo de relaciones de molécula aglutinante a componente objetivo de interés. Por ejemplo, puede ser conveniente proporcionar una cantidad de aglutinante a una colección de células de manera que exista una relación lineal entre la cantidad de componente de interés en las células y la cantidad de aglutinante que se une al componente de interés en las células. Por ejemplo, puede ser no conveniente tener muy poco aglutinante (de manera que no haya suficiente aglutinante para unirse a todos los componentes de interés en las células) o tener demasiado aglutinante (de manera que el aglutinante se una de forma no específica a las células).

Mediante el uso de métodos tradicionales, puede ser difícil proporcionar un nivel apropiado de aglutinante a una muestra para medir con precisión la cantidad de componente de interés en una población celular en la muestra, debido al hecho de que el tamaño de la población celular o componente de interés en la muestra puede variar significativamente entre diferentes muestras. Por el contrario, en la presente descripción se proporcionan métodos,

dispositivos y sistemas para teñir dinámicamente muestras celulares para acomodar muestras que contienen una amplia gama de poblaciones celulares y componentes de interés.

5 En una modalidad, se proporciona un método para la medición de un componente de interés en células de una población celular en una muestra. El método no se limita, pero puede incluir una o más de las siguientes etapas.

10 En primer lugar, se puede obtener una medida cuantitativa o semicuantitativa de un marcador presente en las células de la población celular. El marcador puede ser cualquier marcador que esté presente en la población celular de interés, y puede ser un marcador presente exclusivamente en la población celular de interés (es decir, no presente en ningún otro tipo de célula de la muestra). La medición del marcador puede realizarse por cualquier método, siempre que el método no destruya la muestra, y puede usar cualquier sistema o dispositivo. Se puede mezclar con la muestra un aglutinante que reconozca el marcador. El aglutinante puede tener una molécula unida para facilitar la detección del aglutinante (por ejemplo, un marcador fluorescente). En un ejemplo, el marcador puede detectarse o medirse mediante espectrofotometría de fluorescencia. En modalidades en las que el aglutinante tiene un marcador fluorescente y el marcador se mide mediante espectrofotometría de fluorescencia, la espectrofotometría de fluorescencia puede usarse para medir la fluorescencia global de la muestra o una porción de la misma, en lugar de medir la fluorescencia de células individuales.

20 En segundo lugar, en base a la medición cuantitativa o semicuantitativa del marcador presente en las células de la población celular, se puede determinar una cantidad o concentración aproximada de células de la población celular presente en la muestra. El número aproximado o la concentración de células en la población celular presente en la muestra puede determinarse, por ejemplo, mediante el uso de una curva de calibración. Las curvas de calibración pueden prepararse o pueden estar disponibles para diferentes combinaciones de marcadores/aglutinantes. Las curvas de calibración pueden desarrollarse, por ejemplo, midiendo la señal de un número conocido de células que tienen un determinado marcador y unidas con un determinado aglutinante. En algunas modalidades, la cantidad o concentración aproximada de células de la población celular presente en la muestra puede determinarse con la ayuda de una computadora. En algunos aspectos, se puede determinar el número aproximado o la concentración de células en la población celular presente en la muestra, con dicha determinación que no es superior a aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400 o 500 % de la concentración real.

30 En tercer lugar, en base a la cantidad o concentración determinada de células en la población celular presente en la muestra, se puede seleccionar una cantidad de reactivo para agregar a la muestra, en donde el reactivo se une específicamente al componente de interés en las células de la población celular. El reactivo puede ser o incluir cualquier molécula que se una específicamente al componente de interés. Por ejemplo, el reactivo puede ser un aglutinante, tal como un anticuerpo. El reactivo puede configurarse de manera que pueda detectarse fácilmente (por ejemplo, mediante fluorescencia o luminiscencia) o de manera que, al menos en algunas circunstancias, produzca una señal detectable. En algunas modalidades, el reactivo se puede unir a una molécula para facilitar la detección del reactivo. La cantidad de reactivo añadido a la muestra puede ser cualquier cantidad. En algunas modalidades, se puede agregar una cantidad de reactivo a la muestra de manera que exista una relación aproximadamente lineal entre el nivel del componente de interés en las células individuales de la población celular y la señal producida por los reactivos unidos a los componentes de interés en células individuales de la población celular.

40 En cuarto lugar, después de seleccionar la cantidad de reactivo a añadir a la muestra, se puede añadir a la muestra la cantidad seleccionada de reactivo.

45 En quinto lugar, las células de la muestra pueden analizarse en busca de reactivo unido al componente de interés.

50 En sexto lugar, en base a la cantidad de reactivo unido al componente de interés, se puede determinar la cantidad del componente de interés en las células de la población celular de la muestra.

En algunas modalidades, las etapas quinta y sexta se pueden realizar juntas de manera que la medida de la cantidad de reactivo unido al componente de interés sea suficiente para identificar la cantidad del componente de interés en las células de la población celular de la muestra.

55 En otras modalidades, se proporcionan en la presente descripción sistemas y dispositivos para la tinción dinámica de muestras. Los sistemas y dispositivos pueden contener, sin limitación, un espectrofotómetro y un microscopio de fluorescencia. En una modalidad, un sistema o método para la tinción dinámica de muestras puede configurarse como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 13/244,947 o 13/355,458. En una modalidad, los sistemas y dispositivos pueden automatizarse para determinar una cantidad de un reactivo para agregar a una muestra para determinar la cantidad de un componente de interés en las células de una población celular en una muestra, en base a una medición de una cantidad de un marcador presente en las células de la población celular. En otra modalidad, los sistemas y dispositivos pueden automatizarse para determinar una cantidad de un reactivo para agregar a una muestra para determinar la cantidad de un primer componente en células de una población celular en una muestra, en base a una medición de una cantidad de un segundo componente en las células de la población celular en una muestra.

Enfoque Automático que se Basa en el Contexto

En algunas modalidades, en la presente descripción se proporcionan métodos, sistemas y dispositivos para el enfoque automático de microscopía que se basa en el contexto.

5 El tamaño (por ejemplo, longitud, altura u otra medida) de muchos objetos clínicamente relevantes en muestras biológicas abarca un amplio intervalo. Por ejemplo, las bacterias suelen tener aproximadamente 1 μm de longitud, los eritrocitos son de aproximadamente 6 a 8 μm de longitud, los leucocitos suelen ser de aproximadamente 10 a 12 μm de longitud, las células epiteliales pueden ser de aproximadamente 100 μm de longitud y los moldes y cristales pueden ser de aproximadamente 200-300 μm de longitud. Además, hay muchos elementos amorfos, tal como la mucosidad urinaria, que existen como hebras o filamentos que pueden oscilar entre aproximadamente 10 y 400 μm de longitud.

15 Un desafío en microscopía es adquirir imágenes precisas de campos de visión que contienen una composición desconocida y arbitraria de objetos de varios tamaños, tales como los que se describieron anteriormente. Dado que la profundidad de enfoque de muchos objetivos de microscopía es limitada (típicamente de aproximadamente 1-10 μm), para un campo de visión dado que contiene elementos de varios tamaños, es posible que sea necesario adquirir múltiples planos focales para el campo de visión dado para obtener imágenes precisas y nítidas de los diversos elementos dentro del campo de visión. Un problema con muchos métodos tradicionales de enfoque automático es que se diseñan para enfocarse en la característica dominante en un campo de visión, de modo que se pueda maximizar la nitidez de esa característica. Dichos métodos pueden ser ineficaces para capturar elementos de varios tamaños en una muestra.

25 En una modalidad, se proporciona un método para el enfoque automático de microscopía que se basa en el contexto, que incluye mezclar una partícula de referencia de un tamaño conocido con una muestra para microscopía. En modalidades, se agrega más de una partícula de referencia a la muestra; preferentemente todas, o sustancialmente todas, de dichas partículas de referencia son del mismo tamaño conocido. En modalidades, se conoce el número de partículas de referencia añadidas a un volumen particular de muestra. Las partículas de referencia pueden detectarse durante la microscopía y usarse para lograr el enfoque. Mediante el uso de partículas de referencia para lograr el enfoque, los planos focales pueden seleccionarse independientemente de la composición general de la imagen. En un aspecto, el método puede ser útil para lograr enfocarse en una muestra que tiene una composición de elementos desconocida. En otro aspecto, el método puede soportar la generación de planos de enfoque precisos, independientemente de la precisión del microscopio o del hardware relacionado con la microscopía. Por ejemplo, cuando se selecciona un plano de enfoque en base a la retroalimentación de la nitidez de las partículas de referencia dentro de un campo de visión, se puede lograr un enfoque preciso en varios elementos dentro de una muestra, independientemente del nivel de exactitud o precisión del hardware de enfoque [por ejemplo, la actuación del objetivo del microscopio, la forma de un portamuestras (por ejemplo, una cubeta o un portaobjetos), o la falta de uniformidad de un portamuestras].

40 En una modalidad, una partícula de referencia puede contener o marcarse con una molécula para facilitar la detección de la partícula durante la microscopía. En un ejemplo, una partícula de referencia puede marcarse o contener una molécula fluorescente. La molécula fluorescente puede absorber luz en una primera longitud de onda de luz y, en respuesta a la absorción de la primera longitud de onda de luz, puede emitir luz en una segunda longitud de onda. En una modalidad, una muestra que se mezcla con una partícula de referencia puede exponerse a una longitud de onda de luz capaz de excitar una molécula fluorescente en una partícula de referencia de interés y puede medirse la luz que emite la molécula fluorescente. La fluorescencia específica de una partícula de referencia se puede usar para detectar partículas de referencia, y la información de las partículas de referencia detectadas en una muestra se puede usar para el enfoque automático.

50 Las partículas de referencia pueden tener cualquier forma, tal como esférica o cuboide. Las partículas de referencia incluyen, sin limitación, perlas y microesferas. Las partículas de referencia pueden ser de cualquier tamaño, por ejemplo, con un diámetro o una longitud de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, o 500 μm . Las partículas de referencia pueden hacerse de, o pueden contener, cualquier material adecuado, tal como poliestireno, polietileno, látex, acrílico o vidrio. Por ejemplo, una partícula de referencia puede ser una perla de poliestireno, por ejemplo, una perla de poliestireno que tiene un diámetro de entre aproximadamente 0,1 μm y aproximadamente 50 μm ; o entre aproximadamente 1 μm y aproximadamente 20 μm ; o entre aproximadamente 5 μm y aproximadamente 15 μm ; o que tiene un diámetro de aproximadamente 10 μm .

60 En una modalidad, se proporciona un método para enfocar un microscopio, que puede incluir uno o más de las siguientes etapas. Primero, una muestra que contiene un objeto para análisis microscópico (por ejemplo, bacterias, eritrocitos, etc.) puede mezclarse con una partícula de referencia. La partícula de referencia puede contener o marcarse con una molécula para facilitar la detección de la partícula, tal como un fluoróforo. En segundo lugar, la mezcla que contiene la partícula de referencia y la muestra se puede colocar en una trayectoria de luz de un microscopio, por ejemplo, en una cubeta o un portaobjetos. Opcionalmente, la partícula de referencia puede hundirse hasta el fondo de la muestra en la cubeta o portaobjetos, de manera que la partícula de referencia

65

descanse sobre la superficie más baja de la cubeta o portaobjetos que está en contacto con la muestra. El microscopio puede ser de cualquier tipo, incluido un microscopio fluorescente. En tercer lugar, la mezcla puede exponerse a un haz de luz que se configura para visualizar la partícula de referencia. El haz de luz puede ser de cualquier tipo y puede tener cualquier orientación con relación a la partícula de referencia. Por ejemplo, el haz de luz puede tener una longitud de onda capaz de excitar un fluoróforo dentro o unido a la partícula de referencia. La exposición de la partícula de referencia al haz de luz puede dar como resultado, por ejemplo, la generación y emisión de luz a una longitud de onda particular desde la partícula de referencia o la dispersión de la luz desde la partícula de referencia. En cuarto lugar, el microscopio puede detectar la luz emitida o dispersada por la partícula de referencia, y esta información puede usarse para determinar la posición de la partícula de referencia dentro de la mezcla o para enfocar el microscopio. Opcionalmente, el microscopio puede enfocarse en un plano de enfoque adecuado para objetos de tamaño similar a la partícula de referencia. Se puede obtener una imagen del microscopio mediante un sensor de imagen. La imagen se puede guardar o usar para el análisis de imágenes.

En algunas modalidades, se puede agregar una pluralidad de partículas de referencia a una muestra. Las partículas de referencia pueden ser todas del mismo tamaño o pueden ser de diferentes tamaños. En algunas modalidades, las partículas de referencia de diferentes tamaños contienen diferentes fluoróforos. Diferentes fluoróforos pueden tener diferentes longitudes de onda de absorción, diferentes longitudes de onda de emisión o ambas.

En una modalidad, se proporciona un método para enfocar un microscopio, que incluye mezclar más de una partícula de referencia de tamaño conocido con una muestra para microscopía, en donde al menos dos de las partículas de referencia son de diferentes tamaños y contienen diferentes fluoróforos. El método puede incluir uno o más de las siguientes etapas. Primero, una muestra que contiene un objeto para análisis microscópico puede mezclarse con dos o más partículas de referencia, en donde al menos dos de las partículas de referencia son de diferentes tamaños y contienen diferentes fluoróforos (es decir, la "primera partícula de referencia" y la "segunda partícula de referencia"). En segundo lugar, la mezcla que contiene las partículas de referencia y la muestra se puede colocar en la trayectoria de la luz de un microscopio. El microscopio puede ser de cualquier tipo, incluido un microscopio fluorescente. En tercer lugar, la mezcla puede exponerse a un haz de luz que se configura para visualizar la primera partícula de referencia. El haz de luz puede ser de cualquier tipo y puede tener cualquier orientación con relación a la primera partícula de referencia. Por ejemplo, el haz de luz puede tener una longitud de onda capaz de excitar un fluoróforo dentro o unido a la primera partícula de referencia. La exposición de la primera partícula de referencia al haz de luz puede dar como resultado la generación y emisión o dispersión de luz a una longitud de onda particular desde la primera partícula de referencia. En cuarto lugar, se puede detectar la luz emitida o dispersada por la primera partícula de referencia, y esta información se puede usar para determinar la posición de la primera partícula de referencia dentro de la mezcla o para enfocar el microscopio en un primer plano de enfoque adecuado para objetos de tamaño similar a la primera partícula de referencia. Opcionalmente, se puede obtener una imagen del primer plano focal mediante un sensor de imagen. La imagen se puede guardar o usar para el análisis de imágenes. Quinto, la mezcla puede exponerse a un haz de luz que se configura para visualizar la segunda partícula de referencia. El haz de luz puede ser de cualquier tipo y puede tener cualquier orientación con relación a la segunda partícula de referencia. La exposición de la segunda partícula de referencia al haz de luz puede dar como resultado la generación y emisión o dispersión de luz a una longitud de onda particular desde la segunda partícula de referencia. Sexto, se puede detectar la luz emitida o dispersada por la segunda partícula de referencia, y esta información se puede usar para determinar la posición de la segunda partícula de referencia dentro de la mezcla o para enfocar el microscopio en un segundo plano de enfoque adecuado para objetos de tamaño similar a la segunda partícula de referencia. Opcionalmente, se puede obtener una imagen del segundo plano focal mediante un sensor de imagen. La imagen se puede guardar o usar para el análisis de imágenes.

En otras modalidades, se proporcionan en la presente descripción sistemas y dispositivos para enfoque automático de microscopía que se basa en contexto. Los sistemas y dispositivos pueden contener, sin limitación, un microscopio de fluorescencia. En una modalidad, los sistemas y dispositivos pueden automatizarse para agregar una partícula de referencia que tiene un tamaño conocido a una muestra para análisis microscópico para formar una mezcla, para colocar la mezcla en la trayectoria de luz de un microscopio, para exponer la mezcla a un haz de luz que se configura para visualizar la partícula de referencia, para determinar la posición de la partícula de referencia dentro de la mezcla o para enfocar el microscopio en base a la posición de la partícula de referencia dentro de la mezcla. En una modalidad, un sistema o método para el enfoque automático de microscopía que se basa en contexto puede configurarse como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 13/244,947 o 13/355,458.

Localización de un Portamuestras

En algunas modalidades, se proporcionan en la presente descripción métodos, sistemas y dispositivos para determinar la ubicación de un portamuestras, o de una porción o una marca indicadora en un portamuestras. Dicha determinación es preferentemente una determinación precisa y es útil para identificar células, partículas u otros objetos en un campo de visión dentro de un portamuestras incluso después de que se mueva el portamuestras o se altere un campo de visión (por ejemplo, cambiando el enfoque, o mediante la inspección de diferentes áreas en un portamuestras).

En las modalidades, se puede usar un mecanismo de retroalimentación que se basa en imágenes para determinar con precisión y exactitud una determinada ubicación en una cubeta, por ejemplo, en un canal u otra región que contiene una muestra (ver, por ejemplo, un área de análisis 608 que se muestra en las Figuras 7 y 8). Dicha determinación, en particular cuando se mueve el portamuestras y luego se vuelve a colocar en una posición anterior, es importante para la comparación de imágenes y medidas ópticas que se toman antes de dicho movimiento y después de dicho movimiento. La variabilidad de múltiples fuentes puede afectar la posición de la muestra en relación con el eje del sistema de imágenes; por ejemplo, la variabilidad en las piezas de la cubeta, la variabilidad en el ensamblaje de la cubeta, la variabilidad en la posición dentro de la cubeta en el sistema de imágenes y otras posibles fuentes de variabilidad pueden afectar la posición de una muestra con respecto al sistema de imágenes incluso si la muestra permanece en la misma posición dentro del portamuestras. En la presente descripción se describen métodos para identificar y caracterizar la posición de un portamuestras con respecto a un sistema de formación de imágenes. Por ejemplo, para obtener una imagen precisa y reproducible de un área de interés en una cubeta, se puede ejecutar un programa de registro de cubetas. En modalidades, dicho programa comienza analizando imágenes que se toman en una ubicación predefinida en un portamuestras, la ubicación predefinida que está cerca de una característica de registro o marcador fiduciario dentro del campo de visión, o detectable de cualquier otra manera por el programa. Un programa de registro de cubetas comprende un programa de procesamiento de imágenes, cuyo programa de procesamiento de imágenes que busca la existencia del marcador fiduciario en la imagen y devuelve una respuesta sí/no (sobre si el marcador fiduciario se encuentra o no dentro de la región inspeccionada) o una probabilidad de que el marcador esté en la imagen. En los casos en que el marcador fiduciario no se encuentra en el área que se inspeccionó, se usa un algoritmo de búsqueda, que mueve el área de inspección a una ubicación diferente en el portamuestras y repite la imagen. Este proceso se repite hasta que el programa encuentra el marcador fiduciario (es decir, obtiene un "sí" a la pregunta de si el marcador fiduciario se encuentra o no dentro de la región inspeccionada, o maximiza la probabilidad de que el marcador esté dentro de esa región). Una vez que se identifica la posición del marcador fiduciario, se pueden determinar todas las demás posiciones en o sobre el portamuestras, ya que se conocen las dimensiones y el diseño del portamuestras. Por lo tanto, después de la identificación de la ubicación del marcador fiduciario, se puede encontrar y visualizar cualquier punto de interés para la obtención de imágenes, ya que también se conoce la ubicación del punto de interés (es decir, se conoce su distancia y orientación desde el marcador fiduciario, y, dado que se conoce la posición del marcador fiduciario, también se conoce el punto de interés). En modalidades, un marcador fiduciario puede ser o incluir una característica diseñada especialmente en la propia cubeta (por ejemplo, puede ser un orificio, una protrusión, un patrón impreso o moldeado u otra característica) que puede fabricarse para estar en la misma ubicación para cada parte a cualquier tolerancia deseada. En modalidades, un marcador fiduciario puede ser o incluir una característica de la cubeta (por ejemplo, el borde de un canal) que siempre está a una distancia fija del punto de interés (por ejemplo, donde el marcador fiduciario es el borde del canal, el marcador fiduciario es siempre una distancia fija desde el eje central del canal).

Recuento de Células/Enumeración de Células

En algunas modalidades, se proporcionan en la presente descripción métodos, sistemas y dispositivos para enumerar células en una muestra.

Ciertos métodos tradicionales para teñir muestras que contienen células implican teñir un volumen específico de una muestra (por ejemplo, sangre) con una concentración o cantidad particular de colorante. Esto puede denominarse "tinción volumétrica". La tinción volumétrica tiene una serie de deficiencias, que incluyen: (i) no aborda las variaciones normales en las subpoblaciones de células entre diferentes sujetos (por ejemplo, diferentes sujetos sanos pueden tener cantidades muy diferentes de subpoblaciones de células, tal como las células T CD3+ (donde "CD3+" indica que las células T expresan el marcador CD3)) y (ii) no aborda que las muestras patológicas pueden tener una composición celular radicalmente diferente en comparación con las muestras sanas (por ejemplo, el porcentaje y la cantidad de células T CD3+ en la sangre son muy elevados en pacientes con leucemia de células T sobre el porcentaje y el número en sujetos sanos).

Para una tinción precisa y reproducible de muestras que contienen células, puede ser conveniente agregar una cantidad específica de una tinción celular (por ejemplo, colorantes de ADN, anticuerpos, aglutinantes, etc.) a un número o concentración específicos de células. Por ejemplo, puede ser conveniente agregar 0,2 microgramos de una tinción particular para glóbulos blancos por cada 1000 glóbulos blancos en una muestra. Después de un período de incubación del colorante con las células, se puede lavar una muestra para eliminar el exceso de colorante (no unido), prepararla a una densidad celular adecuada para microscopía y obtener imágenes. De esta manera, una tinción y un procedimiento de tinción pueden optimizarse o normalizarse para un número de células particular.

En una modalidad, se proporciona un método para enumerar el número de células de interés en una muestra. El método puede incluir uno o más de las siguientes etapas o elementos. Se puede añadir a la muestra una primera tinción que se unirá a las células de interés en una muestra. La mezcla de la primera tinción y la muestra se puede incubar. Las células de la mezcla de la primera tinción y la muestra pueden lavarse para eliminar el exceso de tinción (sin unir). Las células lavadas teñidas con una primera tinción se pueden preparar en un volumen deseado para un análisis posterior. Las células lavadas teñidas con una primera tinción pueden analizarse con un espectrofotómetro. Los datos del espectrofotómetro pueden usarse para enumerar el número aproximado de células en la muestra. Por

ejemplo, la primera tinción puede ser un colorante fluorescente que se une a los ácidos nucleicos, y el espectrofotómetro puede incluir una fuente de luz que emite luz a una longitud de onda de excitación del colorante fluorescente y un sensor de luz que puede detectar luz en la longitud de onda de emisión del colorante fluorescente. En este ejemplo, en base a la señal fluorescente del colorante, se puede calcular la cantidad aproximada de ácido nucleico en la muestra y, a partir de esta cantidad aproximada de ácido nucleico en la muestra, se puede determinar el número aproximado de células en la muestra. En base al número de células en la muestra, se puede agregar a la muestra una segunda tinción que se unirá a las células de interés en una muestra. En modalidades, la cantidad de la segunda tinción que se añade a la muestra puede determinarse en vista del número aproximado de células que se determina mediante el uso de la primera tinción. En modalidades, la cantidad de segunda tinción que se añade a la muestra se puede calcular mediante el uso del número de células que se determina mediante el uso de la primera tinción, para que se obtenga una relación deseada de segunda tinción por célula. La mezcla de la segunda tinción y la muestra se puede incubarse. Las células de la mezcla de la segunda tinción y la muestra pueden lavarse para eliminar el exceso de tinción. Las células que se lavan y tiñen con una segunda tinción se pueden preparar en el volumen deseado para su posterior análisis. Las células lavadas teñidas con una segunda tinción pueden analizarse por microscopía.

Enumeración de Células en una Muestra Antes de Determinar la Ploidía de las Células

En una modalidad, se proporciona un método para enumerar células en una muestra antes de determinar la ploidía de las células, en donde el método incluye uno o más de las siguientes etapas o elementos. Puede añadirse a la muestra una primera tinción que se une a las células de interés en la muestra y que es espectralmente distinta de la emisión de un colorante de ADN. Las células de interés pueden ser, por ejemplo, glóbulos blancos. La primera tinción puede ser, por ejemplo, un anticuerpo conjugado con fluoróforo. Un anticuerpo conjugado con fluoróforo puede unirse, por ejemplo, a un antígeno ampliamente expresado (por ejemplo, CD45), o puede unirse a un antígeno expresado por una subpoblación específica de células (por ejemplo, CD3 para células T). La mezcla de la primera tinción y la muestra se puede incubarse. Las células de la mezcla de la primera tinción y la muestra pueden lavarse para eliminar el exceso de tinción (sin unir). Las células lavadas teñidas con una primera tinción se pueden preparar para un volumen deseado para un análisis posterior. Las células lavadas teñidas con una primera tinción pueden analizarse con un espectrofotómetro. Los datos del espectrofotómetro pueden usarse para enumerar el número aproximado de células en la muestra. En base al número de células en la muestra, se puede agregar a la muestra una segunda tinción que se unirá a las células de interés en una muestra. La segunda tinción puede ser un colorante de ADN, tal como yoduro de propidio o 4',6-diamidino-2-fenilindol ("DAPI"). En modalidades, la cantidad de la segunda tinción que se añade a la muestra puede determinarse en vista del número aproximado de células que se determina mediante el uso de la primera tinción. En modalidades, la cantidad de segunda tinción que se añade a la muestra se puede calcular mediante el uso del número de células que se determina mediante el uso de la primera tinción, para que se obtenga una relación deseada de segunda tinción por célula. La mezcla de la segunda tinción y la muestra se puede incubarse. Las células de la mezcla de la segunda tinción y la muestra pueden lavarse para eliminar el exceso de tinción. Las células que se lavan y tiñen con una segunda tinción se pueden preparar en el volumen deseado para su posterior análisis. Las células que se lavan y tiñen con una segunda tinción pueden analizarse por ploidía mediante microscopía.

En los métodos para determinar la ploidía de las células, puede ser importante combinar un número determinado de células para el análisis de la ploidía con una determinada cantidad o concentración de tinción de ADN, para generar datos precisos y coherentes sobre la ploidía de las células. En un ejemplo, la cantidad de glóbulos blancos por volumen de sangre puede variar dentro de una población sana y, por lo tanto, puede ser conveniente determinar la cantidad de glóbulos blancos en un volumen de sangre antes de intentar teñir los glóbulos blancos para el análisis de ploidía.

Los métodos proporcionados anteriormente para determinar la ploidía de las células también se pueden realizar para cualquier método en el que se desee enumerar las células en una muestra antes de determinar un atributo relacionado con el contenido de ácido nucleico de una célula. Por ejemplo, el método anterior puede usarse con métodos que impliquen enumerar células en una muestra antes de determinar la morfología de los núcleos de las células, el tamaño de los núcleos de las células, la relación entre el área de los núcleos y el área total de las células, etc.

Enumeración de Células en una Muestra Antes de la Tinción de la Superficie Celular

En una modalidad, se proporciona un método para enumerar células en una muestra antes de la tinción de la superficie celular, en donde el método incluye uno o más de las siguientes etapas o elementos. Se puede añadir a la muestra una primera tinción que se une a las células de interés en la muestra y que es espectralmente distinta de la emisión de un colorante que se usará para teñir la superficie de las células de interés. Las células de interés pueden ser, por ejemplo, glóbulos blancos. La primera tinción puede ser, por ejemplo, un colorante de ADN (por ejemplo, yoduro de propidio, DRAQ5® o DAPI). La mezcla de la primera tinción y la muestra se puede incubarse. Las células de la mezcla de la primera tinción y la muestra pueden lavarse para eliminar el exceso de tinción (sin unir). Las células que se lavan y tiñen con una primera tinción se pueden preparar en un volumen deseado para un análisis posterior. Las células que se lavan y tiñen con una primera tinción pueden analizarse con un espectrofotómetro. Los datos del

espectrofotómetro pueden usarse para enumerar el número aproximado de células en la muestra. En base al número de células en la muestra, se puede agregar a la muestra una segunda tinción que se unirá a las células de interés en una muestra. En modalidades, la cantidad de la segunda tinción que se añade a la muestra puede determinarse en vista del número aproximado de células que se determina mediante el uso de la primera tinción. En modalidades, la cantidad de segunda tinción que se añade a la muestra se puede calcular mediante el uso del número de células que se determina mediante el uso de la primera tinción, para que se obtenga una relación deseada de segunda tinción por célula. La segunda tinción puede ser, por ejemplo, un anticuerpo conjugado con fluoróforo. Un anticuerpo conjugado con fluoróforo puede unirse, por ejemplo, a un antígeno ampliamente expresado (por ejemplo, CD45), o puede unirse a un antígeno expresado por una subpoblación específica de células (por ejemplo, CD3 para células T). La mezcla de la segunda tinción y la muestra se puede incubar. Las células de la mezcla de la segunda tinción y la muestra pueden lavarse para eliminar el exceso de tinción. Las células que se lavan y tiñen con una segunda tinción se pueden preparar en el volumen deseado para su posterior análisis. Las células que se lavan y tiñen con una segunda tinción pueden analizarse en busca de un antígeno de superficie celular mediante microscopía.

En los métodos para la tinción de antígenos de superficie celular de las células, puede ser importante combinar un número determinado de células para el análisis con una cierta cantidad o concentración de tinción de antígenos de superficie celular, para generar datos precisos y consistentes sobre el contenido de las superficies celulares. En un ejemplo, la cantidad de glóbulos blancos por volumen de sangre puede variar dentro de una población sana (la sangre de sujetos sanos típicamente tiene entre aproximadamente 3000 y 10 000 glóbulos blancos por microlitro (μL)), y por lo tanto, puede ser conveniente determinar la número de glóbulos blancos en un volumen de sangre antes de intentar teñir los glóbulos blancos en busca de antígenos de superficie celular. En otro ejemplo, la cantidad de glóbulos blancos por volumen de sangre puede variar entre sujetos sanos y enfermos (por ejemplo, los pacientes con linfoma pueden tener hasta 100 000 glóbulos blancos por μL de sangre) y, por lo tanto, puede ser conveniente determinar la cantidad de glóbulos blancos en un volumen de sangre antes de intentar teñir los glóbulos blancos en busca de antígenos de superficie celular.

Así, como ejemplo teórico, un paciente sano puede tener 5000 células por μL de sangre, y 500 de estas son células T CD3+, mientras que un paciente con linfoma puede tener 50 000 células por microlitro de sangre y 45 000 de estas son células T CD3+. Si 100 microlitros de sangre se tiñen tradicionalmente, entonces una muestra de un sujeto sano contendría alrededor de 500 000 células en total, de las cuales alrededor de 50 000 células serían células T CD3+. Una muestra de 100 microlitros de un sujeto con linfoma contendría aproximadamente 5 000 000 de células en total, de las cuales aproximadamente 4 500 000 células serían células T CD3+. En este ejemplo teórico, la muestra patológica contiene diez veces el número de células totales y noventa veces el número de células T CD3+, en comparación con una muestra de un sujeto sano. Si la muestra patológica se tiñe con un enfoque tradicional de "tinción volumétrica" que se optimiza para muestras de sujetos sanos, la muestra del sujeto con linfoma puede no teñirse suficientemente. Por esta razón, por ejemplo, los presentes métodos en los que se usa una estimación previa del número de células en una muestra para ajustar la cantidad de colorante que se aplica a una muestra proporcionan ventajas sobre los métodos tradicionales de tinción volumétrica.

En consecuencia, los métodos que se proporcionan en la presente descripción se pueden usar para enumerar las células en una muestra antes de la tinción celular, para generar datos precisos o consistentes con respecto a las muestras.

45 Velocidades de Método

Los métodos, sistemas y dispositivos que se proporcionan en la presente descripción pueden respaldar la adquisición rápida de resultados de análisis de muestras. Los métodos que se proporcionan en la presente descripción pueden proporcionar resultados de análisis en menos de, por ejemplo, aproximadamente 6 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora, 45 minutos, 30 minutos, 15 minutos, 10 minutos o 5 minutos desde el inicio del método.

Los resultados del análisis rápido se pueden usar para proporcionar información en tiempo real relevante para el tratamiento, diagnóstico o monitorización de un paciente. Por ejemplo, los resultados de análisis rápidos pueden usarse para guiar una decisión de tratamiento de un cirujano que opera a un paciente. Durante la cirugía, un cirujano puede obtener una muestra biológica de un paciente para su análisis. Al recibir un análisis rápido de una muestra mediante un método que se proporciona en la presente descripción, un cirujano puede tomar una decisión de tratamiento durante el curso de la cirugía.

En otro ejemplo, los resultados de análisis rápidos que proporcionan los métodos, sistemas y dispositivos que se proporcionan en la presente descripción pueden ayudar a que un paciente reciba información sobre una muestra biológica que proporciona el paciente en un punto de servicio durante la misma visita a la ubicación del punto de servicio en el que el paciente proporcionó la muestra biológica.

Por ejemplo, los solicitantes describen en la presente descripción un ensayo rápido que puede usarse para preparar una muestra de sangre total para el análisis de glóbulos blancos en busca de la presencia de múltiples marcadores y

tipos de células. Dicho ensayo es útil para preparar muestras de sangre total para análisis de imágenes; las muestras están listas para la formación de imágenes en menos de aproximadamente 20 minutos, o en menos de aproximadamente 15 minutos.

5 *Ensayo Rápido de Glóbulos Blancos de Sangre total*

10 Este ensayo prepara muestras de sangre total para el análisis citométrico de glóbulos blancos en menos de aproximadamente 15 minutos o menos de aproximadamente 20 minutos. El análisis citométrico automatizado de dichas células preparadas también se puede realizar rápidamente, de modo que el análisis citométrico de WBC se puede realizar a partir de sangre total en aproximadamente media hora o menos. Además, este ensayo usa sólo un pequeño volumen de la muestra de sangre, por lo que ahorra recursos y es menos inconveniente o incómodo para un sujeto que los ensayos que requieren mayores volúmenes de sangre.

15 Los reactivos usados en este ensayo incluyen: solución salina tamponada con fosfato, tampón Lyse Fix, perlas, tampón de resuspensión y cócteles de reactivos que contienen colorantes y anticuerpos conjugados con colorantes. Los anticuerpos se dirigen a marcadores WBC específicos.

20 Solución salina tamponada con fosfato (PBS): NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, pH ajustado a pH de 7,2 a pH 7,4 (con HCl).

Tampón de resuspensión (RSB): albúmina de suero bovino al 5 % en PBS.

25 Tampón Lyse Fix: 0,0266 % de saponina en PBS con 10 % de paraformaldehído (PFA), donde "%" indica gramos/100 ml (la relación final es aproximadamente 13:1 de saponina PBS:PFA).

Cóctel de reactivos 1: DRAQ5[®], anticuerpo anti-CD14 conjugado con colorante Pacific Blue[™], bloque Fc (por ejemplo, inmunoglobulina tal como IgG de ratón), en BSA al 0,2 % en PBS.

30 Cóctel de reactivos 2: anticuerpo anti-CD16 conjugado con colorante de ficoeritrina (PE), anticuerpo anti-CD45 conjugado con colorante Alexa Fluor[®] 647, anticuerpo anti-CD123 conjugado con colorante PECy5, bloque Fc (por ejemplo, inmunoglobulina), en BSA al 15 % en PBS.

Las etapas del ensayo incluyen:

35 Obtener sangre total de un sujeto.

40 Colocar 50 µL de sangre total en un tubo. Si se desea, la muestra de sangre puede adquirirse directamente en un tubo. Donde 50 µL es la cantidad total de sangre que se extrae del sujeto, entonces la muestra completa se agrega o adquiere en un tubo; cuando se adquieren más de 50 µL de un sujeto, entonces los 50 µL son una alícuota de la muestra.

Centrifugar la muestra a 1200×g durante 3 minutos.

45 Retirar 20 µl de plasma del tubo.

Colocar el tubo en el bloque de calor (para elevar la temperatura a 37 °C), agregar 20 µL de RSB y mezclar bien.

50 Agregar el coctel 1 (aproximadamente 5 µL). (En las modalidades, el coctel 1 se puede agregar directamente a la sangre total y se pueden omitir las etapas anteriores de centrifugación, extracción de una alícuota de plasma y reemplazo con RSB).

Incubar la muestra a 37 °C durante 2 minutos.

55 Agregar el tampón Lyse Fix (en una relación de 6:1 de (tampón Lyse Fix) a (sangre teñida); aproximadamente 300-350 µL). Se puede incluir una concentración conocida de perlas en el tampón Lyse Fix para proporcionar objetivos (partículas de referencia) para el enfoque y para proporcionar una calibración para la concentración de la muestra (por ejemplo, como se describió anteriormente bajo el título "Autoenfoco que se Basa en el Contexto"). Se pueden usar perlas de poliestireno u otras que tengan diámetros de aproximadamente 1 micra a aproximadamente 30 micras. Por ejemplo, perlas de poliestireno de 10 micras a una concentración de aproximadamente 100 perlas a aproximadamente 2000 perlas por microlitro (µL), o de aproximadamente 150 perlas a aproximadamente 1500 perlas por µL, o de aproximadamente 200 perlas a aproximadamente 1000 perlas por µL, pueden usarse.

65 Incubar en el tampón Lyse Fix a 37 °C durante un total de 3 minutos; aproximadamente 1,5 minutos después de agregar el tampón, mezclar pipeteando la solución cinco veces.

Centrifugar la mezcla de muestra a 1200 xg durante 3 minutos.

Retirar el sobrenadante (aproximadamente 350 μL). Guardar el sobrenadante para ajustar el volumen, si es necesario, en etapas posteriores.

Agregar el coctel 2 (aproximadamente 15 μL) para obtener la mezcla final.

Cargar la mezcla final en una cubeta de formación de imágenes precalentada (37 °C).

Incubar la cubeta a 37 °C durante 5 minutos antes de obtener la imagen.

Obtener imagen de la muestra.

Por lo tanto, la muestra está lista para la obtención de imágenes en menos de aproximadamente 15 minutos. En modalidades, algunas de las etapas se pueden acortar (por ejemplo, en modalidades alternativas, se puede acortar una etapa de centrifugación o una etapa de incubación). Dado que los métodos que se describieron anteriormente preparan la muestra mediante el uso de cocteles que incluyen múltiples colorantes, el análisis de estas muestras para detectar la presencia de varios marcadores de tipo celular se puede realizar dentro de un solo campo de visión, proporcionando imágenes eficientes de las muestras con una mínima duplicación de esfuerzo. Las imágenes de dispersión de luz de estos mismos campos de visión proporcionan otro aspecto más del análisis que puede aplicarse eficientemente sin requerir muestras separadas o campos de visión separados para los diversos modos de análisis de imágenes de las muestras. La inclusión de partículas de referencia de un tamaño conocido ayuda aún más a la obtención de imágenes al permitir el uso del enfoque automático y, dado que se conoce la concentración de las partículas de referencia, proporciona una medida independiente de la dilución de la muestra y la concentración celular en cada imagen.

La formación de imágenes de la muestra preparada también se puede realizar rápidamente; por ejemplo, dichas imágenes se pueden realizar en aproximadamente 10 minutos (típicamente entre aproximadamente 2 minutos y aproximadamente 12 minutos) mediante dispositivos automáticos que tienen características como se describe en la presente descripción y, por ejemplo, en la solicitud de patente de los Estados Unidos 13/244,947, en la solicitud de patente de los Estados Unidos 13/769,779 y solicitudes relacionadas. Por lo tanto, en las modalidades, el análisis completo, incluida la preparación de la muestra de sangre y la formación de imágenes de la muestra preparada, se puede realizar en aproximadamente 30 minutos o menos.

Las imágenes y el análisis de imágenes que se obtiene a partir de muestras preparadas de acuerdo con los métodos que se describieron anteriormente (y métodos similares que se describen a continuación) son adecuados para identificar diferentes poblaciones de glóbulos blancos a partir de sangre total. Dicha identificación y cuantificación se realiza rápidamente en la misma muestra iluminando la muestra (por ejemplo, secuencialmente) con diferentes longitudes de onda de luz y registrando y analizando las imágenes resultantes y las intensidades de luz. Dichos métodos son adecuados para proporcionar las imágenes y gráficos que se muestran, por ejemplo, en las Figuras 9, 10 y 11, que se prepararon mediante el uso de métodos como los que se describen en la presente descripción (por ejemplo, métodos que se describen *supra* e *infra*). Las comparaciones que se muestran en la Figura 12 demuestran que estos métodos son precisos y confiables, y se correlacionan bien con otros métodos (por ejemplo, análisis mediante un sistema Abbott CELL-DYN Ruby System (Abbott Diagnostics, Lake Forest, IL, EE. UU.)) el analizador de referencia usado para las comparaciones que se muestran en la Figura 12.

Análisis de Muestras de Patología

Cualquiera de los métodos que se proporcionan en la presente descripción puede usarse para analizar muestras de patología que contienen células. Si una muestra de patología es una muestra de tejido, la muestra puede tratarse para separar las células del tejido en células individuales para su análisis mediante métodos que se proporcionan en la presente descripción.

El análisis de muestras patológicas mediante cualquiera de los métodos que se proporcionan en la presente descripción puede respaldar un análisis patológico rápido y la integración rápida de los resultados del análisis patológico en una decisión de tratamiento para un paciente.

Procedimientos Adicionales en Respuesta a los Resultados del Análisis

En algunas modalidades, los dispositivos y sistemas que se proporcionan en la presente descripción pueden configurarse para activar un procedimiento adicional en respuesta a un resultado que se obtiene por un método de análisis que se proporciona en la presente descripción.

En un ejemplo, un dispositivo o sistema puede programarse para proporcionar una alerta a un usuario si un resultado está fuera de un intervalo esperado. La alerta puede indicar a un usuario o personal médico que, por ejemplo, analice manualmente una muestra, verifique que el dispositivo o sistema funcione correctamente, etc.

En otro ejemplo, un dispositivo o sistema puede programarse para ejecutar automáticamente una o más pruebas adicionales en una muestra si un resultado está dentro o fuera de un intervalo determinado. En algunos ejemplos, los dispositivos y sistemas que se proporcionan en la presente descripción son capaces de realizar múltiples ensayos diferentes, y el dispositivo o sistema puede ejecutar un ensayo adicional para verificar o investigar más a fondo un resultado generado por un método que se proporciona en la presente descripción.

Análisis Mediante el Uso Colorantes no Específicos

Un ejemplo no limitante para acelerar la formación de imágenes es usar una situación de "alta iluminación", en la que las células se marcan con una concentración muy elevada de colorantes. En la presente modalidad, se usan colorantes no específicos que marcan el ADN, las membranas u otra porción de las células. Este ejemplo no usa colorantes de anticuerpos que se dirijan a proteínas raras y específicas u otros marcadores.

Con el colorante no específico, es posible obtener información celular sin requerir una etapa de separación (tal como, por ejemplo, separación por centrifugación o realizar separación física). Sin esta etapa de separación, se puede pasar más rápido directamente a la obtención de imágenes de la muestra, tal como, entre otros, la obtención de imágenes de una gran área de células que pueden incluir tanto a) células no objetivo tal como glóbulos rojos (RBC) y b) células objetivo u objetos de interés tal como los glóbulos blancos (WBC). Así, en un ejemplo no limitante de obtención de imágenes de una muestra de sangre, se pueden obtener imágenes de cinco millones de glóbulos rojos y cinco mil u otro número de glóbulos blancos en la misma. Las células objetivo se pueden diferenciar en base a lo que hay dentro de la célula, tal como, entre otros, la forma del núcleo de una célula. En una modalidad, se usa una tinción nuclear para teñir los núcleos de las células en una muestra, y en base al tipo y la cantidad de tinción que tiene una célula en particular (por ejemplo, la presencia de tinción nuclear, o la forma de un núcleo teñido, u otra característica), se puede determinar su tipo de célula en base a esta tinción, aunque el colorante no sea específico. En otros ejemplos, otras formas internas en la célula (tales como, por ejemplo, si el citoplasma tiene o no gránulos u otros objetos en él) pueden ser indicativas o características y usarse para identificar y cuantificar células en una muestra. Para una muestra de orina, cualquier célula presente y las formas de los cristales en la muestra se pueden usar para identificar una muestra y determinar si se encuentran o no anomalías. De esta manera, el uso de colorantes no específicos se puede usar para generar rápidamente imágenes de células de una manera que se puede usar para determinar las células según se desee.

Análisis Mediante el Uso de Una Pluralidad de Canales de Excitación o Detección

En el contexto del uso de volúmenes de muestra incluso más pequeños para citometría, en modalidades de ensayos de citometría avanzada, se puede usar una longitud de onda de excitación o detección adicional. Por ejemplo, para la clasificación de WBC en un ensayo de subconjunto de linfocitos, se deben contar las diversas células, tales como las células T, las células B, las células K y otras células. En este caso, se usan dos marcadores simplemente para identificar que la célula es un linfocito. Para subclasificar aún más las células en una muestra de sangre, por ejemplo, se pueden usar de nuevo dos marcadores. Por lo tanto, si se tiene un sistema que solo puede detectar dos colores a la vez, hay un número insuficiente de longitudes de onda para el análisis.

En una modalidad, se puede hacer una alícuota de la muestra para hacer dos porciones de muestra separadas y luego se pueden obtener imágenes de una combinación en una parte y otra combinación en otra parte del sistema, mediante el uso de diferentes partes de la muestra. Desafortunadamente, esto puede causar una duplicación del volumen y el tiempo. Cuantos más canales independientes se integren en un sistema, menor será el número de estas partes de muestra o el volumen usado.

Ejemplos

50 Procesamiento Celular

En modalidades, a menudo es útil procesar muestras biológicas para obtener imágenes, probar y analizar. Por ejemplo, a menudo resulta útil procesar muestras biológicas que contienen células para la obtención de imágenes, pruebas y análisis.

El procesamiento de una muestra biológica puede incluir preprocesamiento (por ejemplo, preparación de una muestra para un procesamiento o medición posterior), procesamiento (por ejemplo, alteración de una muestra para que difiera de su estado original o anterior) y post-procesamiento (por ejemplo, eliminación de la totalidad o una porción de una muestra después de su medición o uso). Una muestra biológica se puede dividir en porciones, tal como alícuotas de una muestra de sangre u orina, o tal como rebanar, picar o dividir una muestra de tejido en dos o más piezas. El procesamiento de una muestra biológica, tal como una muestra de sangre, puede incluir mezcla, agitación, sonicación, homogeneización u otro procesamiento de una muestra o de una porción de la muestra. El procesamiento de una muestra biológica, tal como una muestra de sangre, puede incluir la centrifugación de una muestra o una porción de la misma. El procesamiento de una muestra biológica, tal como una muestra de sangre, puede incluir proporcionar tiempo para que los componentes de la muestra se separen o sedimenten, y puede incluir filtración (por ejemplo, pasar la muestra, o una porción de ella, a través de un filtro). El procesamiento de una

- muestra biológica, tal como una muestra de sangre, puede incluir permitir o hacer que una muestra de sangre se coagule. El procesamiento de una muestra biológica, tal como una muestra de sangre, puede incluir la concentración de la muestra o de una porción de la muestra (por ejemplo, por sedimentación o centrifugación de una muestra de sangre, o de una solución que contiene un homogeneizado de tejido de una muestra de tejido) para proporcionar un sedimento y un sobrenadante. El procesamiento de una muestra biológica, tal como una muestra de sangre, puede incluir la dilución de una porción de la muestra. La dilución puede ser de una muestra o de una porción de una muestra, incluida la dilución de un sedimento o de un sobrenadante de la muestra. Una muestra biológica se puede diluir con agua o con una solución salina, tal como una solución salina tamponada. Una muestra biológica se puede diluir con una solución que puede incluir o no un fijador (por ejemplo, formaldehído, paraformaldehído, glutaraldehído u otro agente de reticulación). Una muestra biológica puede diluirse con una solución eficaz para que se produzca un gradiente osmótico entre la solución circundante y el interior, o un compartimento interior, de dichas células, eficaz para que se altere el volumen celular. Por ejemplo, cuando la concentración de la solución resultante después de la dilución es menor que la concentración efectiva del interior de una célula, o de un compartimento interior de la célula, el volumen de dicha célula aumentará (es decir, la célula se hinchará). Una muestra biológica se puede diluir con una solución que puede incluir o no un osmótico (tal como, por ejemplo, glucosa, sacarosa u otro azúcar; sales tales como sodio, potasio, amonio u otra sal; u otro compuesto osmóticamente activo o ingrediente). En modalidades, un osmótico puede ser efectivo para mantener la integridad de las células en la muestra, por ejemplo, estabilizando o reduciendo los posibles gradientes osmóticos entre la solución circundante y el interior, o un compartimento interior, de dichas células. En modalidades, un osmótico puede ser eficaz para proporcionar o aumentar los gradientes osmóticos entre la solución circundante y el interior, o un compartimento interior, de dichas células, eficaz para que las células colapsen al menos parcialmente (donde el interior celular o un compartimento interior está menos concentrado que la solución circundante), o eficaz para que las células se hinchen (donde el interior celular, o un compartimento interior, está más concentrado que la solución circundante).
- Una muestra biológica puede ponerse en contacto con una solución que contiene un surfactante, que puede romper las membranas de las células de la muestra o tener otros efectos en la morfología celular. Por ejemplo, el contacto de los glóbulos rojos con una concentración baja de un surfactante hace que los glóbulos rojos pierdan su forma de disco y adopten una forma más esférica.
- Una muestra biológica se puede teñir, o se pueden agregar marcadores a la muestra, o la muestra se puede preparar de cualquier otra manera para la detección, visualización o cuantificación de la muestra, una porción de una muestra, un componente de una muestra o una porción de una célula o estructura dentro de una muestra. Por ejemplo, una muestra biológica puede ponerse en contacto con una solución que contiene un colorante. Un colorante puede teñir o hacer visible de otro modo una célula, o una porción de una célula, o un material o molécula asociada con una célula en una muestra. Un colorante puede unirse o alterarse por un elemento, compuesto u otro componente de una muestra. Por ejemplo, un colorante puede cambiar de color o alterar de cualquier otra manera una o más de sus propiedades, incluidas sus propiedades ópticas, en respuesta a un cambio o diferencial en el pH de una solución en la que está presente; un colorante puede cambiar de color o alterar una o más de sus propiedades, incluidas sus propiedades ópticas, en respuesta a un cambio o diferencial en la concentración de un elemento o compuesto (por ejemplo, sodio, calcio, CO₂, glucosa u otro ión, elemento o compuesto) presente en una solución en la que está presente el colorante. Por ejemplo, una muestra biológica puede ponerse en contacto con una solución que contiene un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. Por ejemplo, una muestra biológica puede ponerse en contacto con una solución que incluye partículas. Las partículas que se añaden a una muestra biológica pueden servir como estándares (por ejemplo, pueden servir como estándares de tamaño, cuando se conoce el tamaño o la distribución del tamaño de las partículas, o como estándares de concentración, cuando se conoce el número, la cantidad o la concentración de las partículas), o pueden servir como marcadores (por ejemplo, donde las partículas se unen o se adhieren a células o tipos de células particulares, a marcadores celulares o compartimentos celulares particulares, o donde las partículas se unen a todas las células en una muestra).
- La citometría incluye observaciones y mediciones de células, tales como glóbulos rojos, plaquetas, glóbulos blancos, incluidas observaciones y mediciones cualitativas y cuantitativas del número de células, tipos de células, marcadores de superficie celular, marcadores celulares internos y otras características de las células de interés. Cuando una muestra biológica incluye o es una muestra de sangre, la muestra se puede dividir en porciones y se puede diluir (por ejemplo, para proporcionar un mayor volumen para facilitar el manejo, para alterar la densidad o concentración de los componentes celulares en la muestra para proporcionar una densidad diluida deseada, concentración o número de células o intervalo de estos, etc.). La muestra se puede tratar con agentes que afectan la coagulación, o se puede tratar o manipular para concentrar o precipitar los componentes de la muestra (por ejemplo, se puede agregar a la muestra ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o heparina, o se puede centrifugar la muestra o dejar que las células se asienten). Una muestra, o porción de una muestra, puede tratarse añadiendo colorantes u otros reactivos que pueden reaccionar y marcar células particulares o componentes celulares particulares. Por ejemplo, colorantes que marcan núcleos celulares (por ejemplo, colorantes de hematoxilina, colorantes de cianina, colorantes draq tales como DRAQ5® y otros); los colorantes que marcan el citoplasma celular (por ejemplo, colorantes de eosina, incluidos los colorantes de fluoresceína y otros) pueden usarse por separado o juntos para ayudar en la visualización, identificación y cuantificación de células. Marcadores más específicos, incluidos anticuerpos y fragmentos de anticuerpos específicos para objetivos celulares, tales como proteínas de la superficie celular, proteínas y compartimentos intracelulares y otros objetivos, también son útiles en la citometría.

Las muestras biológicas pueden medirse y analizarse mediante citometría mediante el uso de medios ópticos, incluidos, por ejemplo, detectores de fotodiodos, fotomultiplicadores, dispositivos de carga acoplada, diodos láser, espectrofotómetros, cámaras, microscopios u otros dispositivos que miden la intensidad de la luz (de una sola longitud de onda, de múltiples longitudes de onda, o de un intervalo, o intervalos, de longitudes de onda de luz), forman una imagen, o ambos. Se puede generar una imagen de un campo de visión que incluye una muestra, o una porción de una muestra, o puede escanearse, o ambas cosas, mediante el uso de dichos detectores. Una muestra biológica puede medirse y analizarse mediante citometría antes del procesamiento, dilución, separación, centrifugación, coagulación u otra alteración. Una muestra biológica puede medirse y analizarse mediante citometría durante o después del procesamiento, dilución, separación, centrifugación, coagulación u otra alteración de la muestra. Por ejemplo, una muestra biológica puede medirse y analizarse mediante citometría directamente después de recibir la muestra. En otros ejemplos, una muestra biológica puede medirse y analizarse mediante citometría durante o después del procesamiento, dilución, separación, centrifugación, coagulación u otra alteración de la muestra.

Por ejemplo, se puede preparar una muestra de sangre o una porción de la misma para citometría mediante sedimentación o centrifugación. Una porción sedimentada de dicha muestra puede resuspenderse en un tampón de elección antes del análisis citométrico (por ejemplo, mediante aspiración, agitación, sonicación u otro procesamiento). Una muestra biológica se puede diluir o resuspender con agua o con una solución salina, tal como una solución salina tamponada antes del análisis citométrico. Una solución usada para dicha dilución o resuspensión puede incluir o no un fijador (por ejemplo, formaldehído, paraformaldehído u otro agente que reticule las proteínas). Una solución usada para dicha dilución o resuspensión puede proporcionar un gradiente osmótico entre la solución circundante y el interior, o un compartimento interior, de las células de la muestra, eficaz para que se altere el volumen celular de algunas o todas las células de la muestra. Por ejemplo, cuando la concentración de la solución resultante después de la dilución es menor que la concentración efectiva del interior de una célula, o de un compartimento interior de la célula, el volumen de dicha célula aumentará (es decir, la célula se hinchará). Una muestra biológica se puede diluir con una solución que puede incluir o no un osmótico (tal como, por ejemplo, glucosa, sacarosa u otro azúcar; sales tales como sodio, potasio, amonio u otra sal; u otro compuesto osmóticamente activo o ingrediente). En modalidades, un osmótico puede ser efectivo para mantener la integridad de las células en la muestra, por ejemplo, estabilizando o reduciendo los posibles gradientes osmóticos entre la solución circundante y el interior, o un compartimento interior, de dichas células. En modalidades, un osmótico puede ser eficaz para proporcionar o aumentar los gradientes osmóticos entre la solución circundante y el interior, o un compartimento interior, de dichas células, eficaz para que las células colapsen al menos parcialmente (donde el interior celular o un compartimento interior está menos concentrado que la solución circundante), o eficaz para que las células se hinchen (donde el interior celular o un compartimento interior está más concentrado que la solución circundante).

Por ejemplo, una muestra biológica puede medirse o analizarse después de la dilución de una porción de la muestra con una solución que incluye colorantes. Por ejemplo, una muestra biológica puede medirse o analizarse después de la dilución de una porción de la muestra con una solución que incluye anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, una muestra biológica puede medirse o analizarse después de la dilución de una porción de la muestra con una solución que incluye partículas. Las partículas que se añaden a una muestra biológica pueden servir como estándares (por ejemplo, pueden servir como estándares de tamaño, cuando se conoce el tamaño o la distribución del tamaño de las partículas, o como estándares de concentración, cuando se conoce el número, la cantidad o la concentración de las partículas), o pueden servir como marcadores (por ejemplo, donde las partículas se unen o se adhieren a células o tipos de células particulares, a marcadores celulares o compartimentos celulares particulares, o donde las partículas se unen a todas las células en una muestra).

Por ejemplo, una muestra biológica puede medirse o analizarse después del procesamiento que puede separar uno o más tipos de células de otro tipo o tipos de células. Dicha separación puede lograrse por gravedad (por ejemplo, sedimentación); centrifugación; filtración; contacto con un sustrato (por ejemplo, una superficie, tal como una pared o una perla, que contiene anticuerpos, lectinas u otros componentes que pueden unirse o adherirse a un tipo de célula con preferencia a otro tipo de célula); u otros medios. La separación puede ayudarse o lograrse mediante la alteración de un tipo o tipos de células. Por ejemplo, se puede añadir una solución a una muestra biológica, tal como una muestra de sangre, que hace que algunas o todas las células de la muestra se hinchen. Cuando un tipo de célula se hincha más rápido que otro tipo o tipos de célula, los tipos de célula pueden diferenciarse observando o midiendo la muestra después de la adición de la solución. Dichas observaciones y mediciones se pueden realizar a la vez, o en múltiples ocasiones, seleccionadas para acentuar las diferencias en la respuesta (por ejemplo, tamaño, volumen, concentración interna u otra propiedad afectada por dicha hinchazón) y así aumentar la sensibilidad y exactitud de las observaciones y medidas. En algunos casos, un tipo o tipos de células pueden explotar en respuesta a dicho hinchamiento, lo que permite observaciones y mediciones mejoradas del tipo o tipos de células restantes en la muestra.

La observación, medición y análisis de una muestra biológica por citometría puede incluir mediciones fotométricas, por ejemplo, mediante el uso de un fotodiodo, un fotomultiplicador, un diodo láser, un espectrofotómetro, un dispositivo de carga acoplada, una cámara, un microscopio u otros medios o dispositivos. La citometría puede incluir

la preparación y el análisis de imágenes de células en una muestra biológica (por ejemplo, imágenes bidimensionales), donde las células se marcan (por ejemplo, con etiquetas fluorescentes, quimioluminiscentes, enzimáticas u otras) y se colocan en placas (por ejemplo, se dejan sedimentar en un sustrato) y se obtienen imágenes mediante una cámara. La cámara puede incluir una lente y puede acoplarse o usarse junto con un microscopio. Las células pueden identificarse en las imágenes bidimensionales por sus etiquetas adjuntas (por ejemplo, a partir de la luz que emiten las etiquetas).

Una imagen de células preparada y analizada por un citómetro como se describe en la presente descripción puede no incluir células, una célula o múltiples células. Una célula en una imagen de un citómetro, como se describe en la presente descripción, se puede marcar, como se describió anteriormente. Una célula en una imagen de un citómetro, como se describe en la presente descripción, se puede marcar, como se describió anteriormente, de forma eficaz para identificar la imagen y el sujeto del que se tomó la muestra.

En algunas modalidades, el sistema de ensayo se configura para realizar ensayos de citometría. Los ensayos de citometría se usan típicamente para medir óptica, eléctrica o acústicamente las características de las células individuales. Para los fines de esta descripción, las "células" pueden abarcar muestras no celulares que generalmente tienen tamaños similares a las células individuales, incluidas, entre otras, vesículas (tal como liposomas), pequeños grupos de células, viriones, bacterias, protozoos, cristales, cuerpos formados por agregación de lípidos o proteínas, y sustancias unidas a pequeñas partículas tales como perlas o microesferas. Dichas características incluyen, entre otras, el tamaño; la forma; la granularidad; el patrón de dispersión de luz (o indicador óptico); si la membrana celular está intacta; la concentración, la morfología y la distribución espacio-temporal del contenido celular interno, incluidos, entre otros, el contenido de proteínas, las modificaciones de proteínas, el contenido de ácidos nucleicos, las modificaciones de ácidos nucleicos, el contenido de organelas, la estructura del núcleo, el contenido del núcleo, la estructura celular interna, el contenido de vesículas (incluido el pH), las concentraciones de iones y la presencia de otras moléculas pequeñas tales como esteroides o fármacos; y los marcadores de la superficie celular (tanto de la membrana celular como de la pared celular) que incluyen proteínas, lípidos, carbohidratos y modificaciones de los mismos. Mediante el uso de colorantes, tinciones u otras moléculas de marcado adecuadas, ya sea en forma pura, conjugadas con otras moléculas o inmovilizadas o unidas a nanopartículas o micropartículas, la citometría puede usarse para determinar la presencia, la cantidad o las modificaciones de proteínas específicas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos u otras moléculas. Las propiedades que pueden medirse mediante citometría también incluyen medidas de función o actividad celular, incluidas, entre otras, la fagocitosis, la presentación de antígenos, la secreción de citoquinas, los cambios en la expresión de moléculas internas y de superficie, la unión a otras moléculas o células o sustratos, el transporte activo de moléculas pequeñas, la mitosis o meiosis; la traducción de proteínas, la transcripción de genes, la replicación de ADN, la reparación de ADN, la secreción de proteínas, la apoptosis, la quimiotaxis, la movilidad, la adhesión, la actividad antioxidante, ARNi, la degradación de proteínas o ácidos nucleicos, las respuestas a fármacos, la infectividad y la actividad de vías o enzimas específicas. La citometría también se puede usar para determinar información sobre una población de células, incluidos, entre otros, recuentos de células, porcentaje de la población total y variación en la población de muestra para cualquiera de las características descritas anteriormente. Los ensayos que se describen en la presente descripción pueden usarse para medir una o más de las características anteriores para cada célula, lo que puede ser ventajoso para determinar correlaciones u otras relaciones entre diferentes características. Los ensayos que se describen en la presente descripción pueden usarse además para medir de forma independiente múltiples poblaciones de células, por ejemplo, marcando una población celular mixta con anticuerpos específicos para diferentes líneas celulares. Un módulo de microscopía puede permitir la realización de análisis histológicos, patológicos o morfológicos con el dispositivo, y también facilita la evaluación de objetos en base a las características físicas y químicas. Los tejidos se pueden homogeneizar, lavar, depositar en una cubeta o portaobjetos, secar, teñir (tal como con anticuerpos), incubar y luego obtener imágenes. Cuando se combinan con las tecnologías de transmisión de datos descritas en otra parte de la presente descripción, estas innovaciones facilitan la transmisión de imágenes desde un detector CMOS/CDD o similar a, por ejemplo, un patólogo autorizado para su revisión, lo que no es posible con los dispositivos tradicionales que solo realizan citometría de flujo. El citómetro puede medir antígenos de superficie así como también la morfología celular; los antígenos de superficie permiten pruebas más sensibles y específicas en comparación con los dispositivos de laboratorio de hematología tradicionales. La interpretación de los ensayos celulares puede automatizarse seleccionando una o más mediciones; los umbrales de selección pueden establecerse por un experto o aprenderse en base a métodos estadísticos a partir de datos de entrenamiento; las reglas de selección pueden ser específicas para sujetos individuales o poblaciones de sujetos.

En algunas modalidades, la incorporación de un módulo de citómetro en un dispositivo de punto de servicio proporciona la medición de atributos celulares medidos típicamente por dispositivos de laboratorio comunes y laboratorios para interpretación y revisión por parte de personal médico con capacitación clásica, mejorando la velocidad o la calidad de la toma de decisiones clínicas. Por lo tanto, un dispositivo de punto de servicio puede configurarse para análisis citométrico.

Ejemplo 1

Se obtuvo una muestra de células que contenían leucocitos en sangre, incluidas células asesinas naturales y neutrófilos. La muestra se trató con un aglutinante de identidad marcado con fluorescencia (aglutinante anti-CD16),

que se une tanto a las células asesinas naturales como a los neutrófilos. La muestra también se trató con un colorante nuclear (DRAQ5®). Se tomaron imágenes de la muestra mediante microscopía de fluorescencia y microscopía de campo oscuro. Se registró y analizó el nivel de fluorescencia y dispersión del lado de la luz de diferentes células en la muestra. Las imágenes segmentadas que contenían la señal del aglutinante anti-CD 16 proporcionaron información cuantitativa sobre la intensidad de fluorescencia de cada célula (correspondiente al nivel de expresión de CD16) y también sobre el tamaño de cada célula. La imagen de campo oscuro proporcionó información cuantitativa sobre las propiedades de dispersión de cada célula. Las imágenes que contenían la señal del colorante de ADN se segmentaron para determinar la intensidad fluorescente, el tamaño y la forma del núcleo.

Como se muestra en la Figura 1A, se identificaron dos grupos principales de células en base a la medición de la fluorescencia de CD16 y la dispersión de luz de las diferentes células. El grupo de células con señal de fluorescencia CD16 brillante/alta y alta dispersión (Figura 1A, círculo derecho) son los neutrófilos. El grupo de células con señal de fluorescencia CD16 intermedia y baja dispersión (Figura 1A, círculo izquierdo) son células asesinas naturales. Si bien la medición de la fluorescencia y la dispersión de la luz de las diferentes células proporciona suficiente información para clasificar la mayoría de las células en la muestra como células asesinas naturales o neutrófilos, para algunas células, la medición de estos atributos no proporciona suficiente información para clasificar las células con un alto grado de precisión. Por ejemplo, la medición de la fluorescencia y la dispersión de la luz de las células no proporciona suficiente información para clasificar con precisión el pequeño grupo de células en el círculo más pequeño de la Figura 1A (es decir, el círculo del medio). Para identificar si las células en el círculo más pequeño eran células asesinas naturales o neutrófilos, se examinaron imágenes de la tinción nuclear (DRAQ5®) y de células totales (anti-CD16) de estas. Se obtuvieron medidas cuantitativas del área del núcleo y del volumen celular total de las células, y se determinó la relación entre el área nuclear y el área celular total. Como se muestra en la Figura 1B, existe una clara diferencia en la relación entre el área nuclear y el área celular total entre las células asesinas naturales ("NK") y los neutrófilos ("Neu"). Por lo tanto, se usó microscopía cuantitativa para examinar múltiples atributos de las células en la muestra para permitir una clasificación inequívoca de las células. La Figura 1C muestra imágenes de células asesinas naturales del círculo más pequeño de la Figura 1A. Todas las imágenes tienen la misma escala de longitud. Las imágenes de la izquierda son células teñidas para el área celular total (anti-CD 16), y las imágenes de la derecha son las mismas células con solo tinción nuclear (DRAQ5®). Las imágenes de la fila superior e inferior son diferentes ejemplos de células asesinas naturales. La Figura 1D muestra imágenes de neutrófilos del círculo más pequeño de la Figura 1A. Todas las imágenes tienen la misma escala de longitud. Las imágenes de la izquierda son células teñidas para el área celular total, y las imágenes de la derecha son las mismas células con solo tinción nuclear. Las imágenes de la fila superior e inferior son diferentes ejemplos de células asesinas naturales.

Además, el núcleo de un neutrófilo tiene una forma distintiva de varios lóbulos, mientras que el núcleo de una célula asesina natural (y otros linfocitos) es redondo, parejo y liso. Los algoritmos de segmentación de imágenes se pueden usar para identificar y clasificar las células en base a la forma del propio núcleo. La segmentación de imágenes se describe más adelante en el Ejemplo 7.

Ejemplo 2

Se obtuvo una muestra que contenía plaquetas. Las plaquetas se marcaron con anticuerpos anti-CD41 y anti-CD61 conjugados con fluorescencia. También se añadieron a la muestra perlas que tenían un diámetro de 3 µm. Se tomaron imágenes de la muestra con aumentos de 10x y 20x (Figura 2A). Se midió la intensidad de la distribución de fluorescencia para plaquetas individuales (de ambos anticuerpos) y se determinó que tenían una forma gaussiana (Figura 2B). Se trazaron los valores medidos de fluorescencia de plaquetas individuales y se determinó un ajuste para la distribución de intensidad (Figura 2C). En la Figura 2C, la línea gris es la intensidad de fluorescencia medida en una plaqueta individual y la línea negra es el ajuste. Los parámetros del ajuste, tales como la media de la Gaussiana, la varianza, el volumen, el ancho y el área de la base, etc., pueden evaluarse como predictores del volumen plaquetario. Se ha determinado que el volumen de la Gaussiana y el ancho del ajuste se correlacionan estrechamente con el volumen medio de plaquetas.

Para las mediciones anteriores, las perlas de 3 µm sirvieron como referencias y fiduciales para controlar la varianza al determinar con precisión el mejor plano de enfoque y el efecto de esta varianza en la medición del volumen.

Además, el tamaño de las plaquetas estimado en base al ajuste de un modelo 2D se puede calibrar para que esté en el intervalo normal (Figura 3).

Ejemplo 3

Se obtuvo una muestra que contenía glóbulos rojos ("RBC"). Los glóbulos rojos se trataron con una concentración baja de un surfactante (DDAPS o SDS), lo que provocó que los glóbulos rojos asumieran una forma similar a una esfera. Se tomaron imágenes de los glóbulos rojos mediante microscopía de campo oscuro en dos cubetas diferentes: (A) una cubeta que solo permitía epi-iluminación pura (Figura 4A); y (B) una cubeta que permitía una mezcla de epi-iluminación y trans-iluminación (Figura 4B). Los glóbulos rojos eran mucho más visibles en la cubeta

que permitía una mezcla de epi-iluminación y trans-iluminación que en la cubeta que solo permitía una epi-iluminación pura (Figura 4).

Ejemplo 4

Se obtuvo una muestra que contenía neutrófilos. En los neutrófilos, la forma y la morfología de la cromatina del núcleo pueden indicar si se trata de un neutrófilo de "banda" inmaduro o de un neutrófilo maduro "segmentado". Los neutrófilos en banda son neutrófilos inmaduros que surgieron recientemente de la médula ósea. Un aumento en la proporción de neutrófilos en banda puede indicar una infección o inflamación en curso.

La muestra se mezcló con un anticuerpo anti-CD 16 marcado con fluorescencia, que reconoce CD16, un receptor de superficie celular en los neutrófilos. La muestra también se tiñó con un colorante nuclear fluorescente. Se tomaron imágenes de la muestra mediante microscopía de fluorescencia para obtener datos de tinción nuclear y de tinción de CD16 de las células. Los neutrófilos en banda generalmente tienen niveles de expresión de CD16 similares a los de los neutrófilos segmentados maduros y, por lo tanto, no se pueden distinguir en virtud de la intensidad de la fluorescencia de la tinción de CD16 solo.

El análisis de imágenes, incluida la segmentación de imágenes, se usa para reconocer la tinción nuclear y las morfologías de los neutrófilos en banda y los neutrófilos segmentados, lo que permite la clasificación de las células. Se examinan el tamaño, la forma y la intensidad de fluorescencia del núcleo de las células. Además, los núcleos se analizan para determinar el número de lóbulos (picos de intensidad dentro del área nuclear), la distancia entre los lóbulos del núcleo y los cambios en la curvatura (segunda derivada) del contorno nuclear. La Figura 5A muestra imágenes representativas de neutrófilos en banda. En estas imágenes, el núcleo aparece como un gris claro y el citoplasma celular aparece como un gris más oscuro. A medida que los neutrófilos se diferencian a través del linaje mielóide, desarrollan un núcleo en forma de "U" característico antes de alcanzar la madurez completa. La Figura 5B muestra imágenes representativas de neutrófilos segmentados. En estas imágenes, el núcleo aparece como un gris claro y el citoplasma celular aparece como un gris más oscuro. Los núcleos de los neutrófilos segmentados tienen múltiples segmentos/lóbulos (típicamente de aproximadamente 3-5). Por lo tanto, este análisis respalda la identificación y cuantificación de diferentes subpoblaciones de neutrófilos en la sangre. La segmentación de imágenes se describe más adelante en el Ejemplo 7.

Ejemplo 5

Se obtiene una muestra de células de un sujeto con leucemia linfocítica crónica (LLC). El objetivo es cuantificar el grado de expresión de CD5 en las células B del sujeto. Los anticuerpos anti-CD20 se seleccionan como aglutinantes para las células B. Los anticuerpos anti-CD20 marcados con un primer fluoróforo coloreado se mezclan con la muestra. Después de un tiempo de incubación adecuado, se lava la muestra y se eliminan los anticuerpos anti-CD20 no unidos. La muestra se expone a una fuente de luz capaz de excitar el primer fluoróforo y la señal fluorescente se mide mediante el uso de un espectrofotómetro. En base a la señal fluorescente, se determina la concentración aproximada de células B en la muestra. La concentración aproximada determinada de células B está, de hecho, dentro de 1,5 veces de la concentración real de células B en la muestra.

En base a la concentración aproximada de células B en la muestra, se añade a la muestra una cantidad adecuada de aglutinante anti-CD5 para mantener una relación proporcional entre la expresión de CD5 y la fluorescencia de CD5. El aglutinante anti-CD5 se acopla a un segundo fluoróforo, que tiene una longitud de onda máxima de excitación diferente a la del primer fluoróforo (unido al aglutinante anti-CD20). El anticuerpo anti-CD5 se agrega a la muestra y luego las células individuales de la muestra se exponen a una fuente de luz capaz de excitar el segundo fluoróforo y se mide la señal fluorescente de las células individuales. En base a la señal fluorescente de las células, se determina la cantidad promedio de CD5 en las células B de la muestra.

Aunque este ejemplo se describe en el contexto de CD5, debe entenderse que este concepto de obtener un recuento aproximado para guiar la adición de una cantidad deseada de material para su uso en una etapa posterior, no se limita a CD5 y no se excluye el uso de este concepto con otros tipos de células, analitos u objetos.

Ejemplo 6

Se pueden obtener imágenes de las células sanguíneas, identificarse y cuantificarse de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción. Por ejemplo, imágenes bidimensionales de células en una muestra biológica, donde las células se etiquetan (por ejemplo, con etiquetas fluorescentes, quimioluminiscentes, enzimáticas u otras) y se colocan en placa (por ejemplo, se les permite asentarse en un sustrato) y se obtienen imágenes de una cámara, pueden prepararse y analizarse como se describe en el presente ejemplo. La cámara puede incluir una lente y puede acoplarse o usarse junto con un microscopio. Las células pueden identificarse en las imágenes bidimensionales por sus etiquetas adjuntas (por ejemplo, a partir de la luz que emiten las etiquetas).

Se cargaron 80 microlitros de sangre total obtenida de una punción en un dedo en un recipiente de muestras tapado precargado con 2 mg/ml de EDTA. En este caso, se usó un recipiente de muestras cerrado (con una tapa extraíble o

perforable); se entenderá que se puede usar cualquier recipiente adecuado para contener una muestra de volumen tan pequeño, incluidos, entre otros, un recipiente con tapa o un recipiente sin tapa. El recipiente de muestras se centrifugó a 1200 xg durante 5 minutos para separar las células sanguíneas del plasma sanguíneo. La centrifugación del recipiente de muestras dio como resultado la separación de la muestra de sangre en el recipiente de muestras en dos componentes principales (desde la parte superior del recipiente de muestras hasta el fondo): 1) plasma sanguíneo y 2) células sanguíneas empaquetadas. Este proceso asegura que no queden gotas de sangre aisladas, sino que se fusionen con el cuerpo principal del líquido. Además, este proceso separa las células de los elementos del plasma, reduciendo así el metabolismo y permitiendo un almacenamiento más prolongado de la muestra.

El recipiente de muestras centrifugado se cargó en un cartucho que contenía múltiples reactivos aislados por fluido, puntas y una cubeta de citometría. El cartucho contenía todos los reactivos necesarios para el ensayo. El cartucho se cargó en un dispositivo equipado con al menos una centrífuga, una pipeta y una plataforma para cargar la cubeta. La pipeta en el dispositivo tiene una pluralidad de boquillas, algunas boquillas que son de un tamaño diferente a algunas otras boquillas.

En el interior del dispositivo, se bajó una boquilla de la pipeta sobre una herramienta portacubetas haciendo que acoplara en un orificio correspondiente en la herramienta portadora. Esta herramienta se movió posteriormente al cartucho y se bajó en la cubeta del citómetro. Luego, los pasadores de la herramienta pudieron acoplarse en los orificios correspondientes de la cubeta y recogerla. La cubeta se transfirió a una estación de carga en otra parte del dispositivo.

A continuación, dentro del dispositivo, se introdujo una boquilla más grande de la pipeta en el cartucho para acoplar una punta de pipeta almacenada en el cartucho. La pipeta y la punta juntas se usaron luego para mezclar las células y el plasma en el recipiente de muestras colocando la punta de la pipeta dentro de la muestra en el recipiente de muestras y aspirando repetidamente material y dispensando material desde la punta. Una vez que las células se resuspendieron en el plasma de modo que la muestra de sangre total se mezcló completamente, se aspiraron 5 microlitros de la sangre total mezclada para proporcionar una alícuota para medir las propiedades de la muestra de sangre. Esta alícuota de 5 microlitros se usó para mediciones dirigidas a los glóbulos rojos y plaquetas en la muestra. Como se describe a continuación, una porción de la muestra que quedaba después de la extracción de esta alícuota de 5 microlitros se usó para mediciones dirigidas a los glóbulos blancos de la muestra.

Los 5 microlitros de sangre total se dispensaron en un recipiente que contenía una mezcla de solución salina tamponada con fosfato y albúmina de suero bovino al 2% en peso, para diluir la sangre total veinte veces (dando como resultado 100 microlitros de muestra diluida). Después de mezclar vigorosamente, 5 microlitros de esta muestra se transfirieron a otro recipiente que contenía un coctel de reactivos de anticuerpos marcadores: anti-CD235a conjugado con Alexa Fluor® 647 (AF647), anti-CD41 y anti-CD61 conjugado con ficoeritrina (PE). La mezcla se incubó durante 5 minutos. Posteriormente, 10 microlitros de esta mezcla se mezclaron con 90 microlitros de un tampón que contenía un surfactante zwitteriónico a <0,1% en peso. Las moléculas de surfactante modifican las propiedades de flexión de la membrana de los glóbulos rojos de manera que todas las células asumen una forma esférica estable. Esta transformación es isovolumétrica ya que el tampón usado es isotónico con el citoplasma; por lo tanto, no puede ocurrir ningún intercambio de fluido impulsado osmóticamente a través de la membrana celular. Después de incubar esto durante otros 2 minutos, se mezclaron 30 microlitros de esta solución con una solución que contenía glutaraldehído, un fijador y perlas no fluorescentes de 10 micras (μm) de diámetro. La mezcla tenía una concentración final de glutaraldehído al 0,1 % y 1000 perlas por microlitro. El glutaraldehído fija rápidamente las células evitando así la lisis celular y otros procesos biológicos activos.

En este ejemplo no limitante, la pipeta acopló una punta en el cartucho, aspiró 7 μL de la mezcla anterior y cargó los 7 μL en un canal dentro de la cubeta colocada en una plataforma con la herramienta transportadora. Después de cargar la mezcla en la cubeta, la pipeta aspiró 10 μL de aceite mineral de un recipiente en el cartucho y colocó una gota de aceite mineral en ambos extremos abiertos del canal cargado de la cubeta. Se agregó hexadecano a los extremos del canal abierto para evitar la evaporación del líquido del canal de la cubeta cargada (también funcionaría el aceite mineral). A continuación, el aparato de manipulación de muestras a nivel del dispositivo acopló la combinación de portacubetas/cubetas y transportó la combinación de portacubetas/cubetas desde el módulo que contenía el cartucho hasta el módulo de citometría del dispositivo. En el módulo de citometría, el aparato de manipulación de muestras a nivel de dispositivo colocó la combinación de portacubetas/cubeta en la platina de microscopía del módulo de citometría. El tiempo necesario para estas operaciones, además de un tiempo de espera de 2 minutos, permitió que las células hinchadas se asentaran en el suelo de la cubeta antes de la formación de imágenes.

Después de colocar el portacubetas/cubeta en la platina de microscopía, la platina se movió a una ubicación predeterminada para que el sistema óptico del citómetro pudiera ver un extremo del canal que contenía la muestra. En esta ubicación, el sistema óptico transmitió imágenes de la muestra adquirida con iluminación de campo oscuro de una luz anular. Estas imágenes junto con la actuación del sistema óptico en un eje perpendicular al plano de la cubeta se usaron para encontrar el plano de mejor enfoque. Una vez enfocado, el sistema óptico se usó para adquirir imágenes de fluorescencia de la muestra a diferentes longitudes de onda, acordes con los fluoróforos que se estaban usando. Por ejemplo, para visualizar glóbulos rojos que se marcaron con anti-CD235 conjugado con Alexa

Fluor® 647, se usó una fuente de luz roja (longitud de onda de 630 nm) para excitar la muestra y longitudes de onda entre 650 nm y 700 nm para obtener imágenes de la muestra. Se usó una combinación de un espejo policromico y un filtro de emisión de paso de banda para filtrar las longitudes de onda no deseadas de la señal óptica. Dado que las células se asentaron en el suelo de la cubeta, las imágenes en un solo plano de enfoque fueron suficientes para

Los datos de las imágenes se procesaron mediante un controlador asociado con el dispositivo de procesamiento de muestras. Los algoritmos de procesamiento de imágenes que se emplearon en la presente descripción utilizaron imágenes de fluorescencia de las células para detectarlas mediante una combinación de umbrales adaptativos y detección de bordes. En base a la intensidad local y los gradientes de intensidad, se crearon regiones de interés (Rol) alrededor de cada célula. Mediante el uso de imágenes de campo oscuro, también se identificaron las perlas en la muestra y se crearon las regiones de interés alrededor de las perlas. Se enumeraron todas las regiones de interés en cada campo de visión y se calculó su intensidad en cada imagen de ese campo de visión. La información generada por el algoritmo de procesamiento de imágenes consistió en mediciones de forma o morfológicas e intensidades de fluorescencia y campo oscuro para cada Rol. Esta información se analizó mediante el uso de métodos estadísticos para clasificar cada objeto como un glóbulo rojo (positivo para CD235a, pero negativo para CD41/CD61), una plaqueta (positivo para CD41/CD61 y negativo para CD235a) o una perla. Los descriptores de forma tales como el perímetro, el diámetro y la circularidad se usaron para calcular el volumen de cada glóbulo rojo y plaqueta. Dado que las perlas se añadieron a una concentración conocida, se usó la relación promedio de perlas a células en todo el canal para calcular la concentración celular en términos de células/microlitro. En base a las etapas que se realizaron para procesar la muestra, esta concentración se corrigió por dilución para llegar a la concentración de células en la muestra de sangre total original. Se calcularon las siguientes cantidades a partir de una muestra: 1) número de glóbulos rojos en la cubeta; 2) volumen promedio de glóbulos rojos en la cubeta; 3) ancho de distribución de glóbulos rojos (RDW) de glóbulos rojos en la cubeta; 4) número de plaquetas en la cubeta; y 5) volumen promedio de plaquetas en la cubeta. En base a estos cálculos, se calculó lo siguiente para la muestra de sangre original.

Valor Medido	Resultado	Intervalo Ilustrativo
Concentración de glóbulos rojos (millones de células por microlitro)	4,8	4-6
Volumen medio de glóbulos rojos, femtolitro	88	80-100
Ancho de distribución de glóbulos rojos (RDW), (%)	12	11-14,6
Concentración de plaquetas (mil células por microlitro)	254	150-400
Volumen medio de plaquetas, femtolitro	10,4	7,5-11,5

Después de retirar la alícuota de 5 microlitros usada para el análisis de la información de glóbulos rojos y plaquetas, los 75 microlitros restantes de la muestra se usaron para analizar la población de glóbulos blancos de la muestra de sangre total. Los 75 microlitros restantes de sangre total también se mezclaron aspirando y dispensando repetidamente la muestra dentro del mismo recipiente con la pipeta. Aproximadamente 40 microlitros de los 75 microlitros restantes de sangre total mezclada se aspiraron con la punta de una pipeta y la pipeta los transfirió a un tubo de centrifuga en el cartucho. La pipeta acopló el tubo de centrifuga que contenía la muestra de sangre, y lo transfirió y depositó en un cubo oscilante en una centrífuga dentro del módulo. La centrífuga se hizo girar para proporcionar 1200 xg durante 3 minutos, separando la sangre en plasma que contenía EDTA como sobrenadante y células empaquetadas en el sedimento.

Después de la centrifugación, el tubo de centrífuga se retiró de la centrífuga y se devolvió al cartucho. El sobrenadante de plasma se eliminó con la pipeta y se transfirió a un recipiente de reacción separado en el cartucho. De un recipiente de reactivo en el cartucho, se aspiraron con la pipeta 16 microlitros de tampón de resuspensión y se añadieron al sedimento celular en el tubo de centrífuga. Luego, la pipeta resuspendió el sedimento celular en el tampón de resuspensión aspirando y dispensando repetidamente la mezcla en el tubo de centrífuga. A continuación, la pipeta aspiró 21 microlitros de la sangre total resuspendida y la añadió a otro recipiente que contenía 2 microlitros de anti CD14-Pacific Blue™ y DRAQ5®, se mezcló y se incubó durante 2 minutos. A continuación, se añadieron veinte microlitros de esta mezcla a 80 microlitros de un tampón de lisis. El tampón de lisis era una solución que incluía saponina (un surfactante suave; otros surfactantes que pueden usarse incluyen compuestos surfactantes aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos y no iónicos, por ejemplo, como se describió anteriormente) y paraformaldehído (un fijador; otros fijadores que pueden usarse incluyen formaldehído, glutaraldehído y otros agentes de reticulación). El detergente provoca la formación de un gran número de agujeros en las membranas de las células. Los glóbulos rojos, debido a sus propiedades únicas de membrana, son particularmente susceptibles a la formación de este agujero y se lisan por completo, y su contenido se filtra al líquido que los rodea. La presencia del fijador evita la lisis involuntaria de los glóbulos blancos. Las plaquetas también permanecen sin lisar. El propósito de esta etapa es eliminar los glóbulos rojos intactos de la mezcla, ya que superan en número a los glóbulos blancos en aproximadamente 1000:1. Las plaquetas no interfieren con la formación de imágenes y, por lo tanto, son irrelevantes para este proceso. El tampón de lisis también contenía 10 µM de perlas no fluorescentes a una concentración conocida.

Después de una incubación de 5 minutos, el recipiente se volvió a girar a 1200 xg durante 3 minutos. El sobrenadante se aspiró con la punta de una pipeta, eliminando los restos de glóbulos rojos y otros desechos, y se

depositó en un área de desechos en el cartucho. Aproximadamente 15 microlitros de líquido con glóbulos blancos empaquetados estaban presentes en el sedimento celular.

5 Para determinar una aproximación del número de glóbulos blancos presentes en el sedimento celular, la pipeta primero resuspendió los glóbulos blancos en el recipiente y luego aspiró el líquido para transportarlo e inspeccionarlo con un espectrofotómetro. La suspensión de glóbulos blancos se iluminó con luz a una longitud de onda de 632 nm, que es la longitud de onda de excitación para el colorante Alexa Fluor® 647 y DRAQ5®. La luz emitida por la suspensión celular se filtró mediante un filtro de paso largo de 650 nm y se midió en el espectrofotómetro. Esta medida se correlacionó con la curva de calibración que se generó previamente para estimar una concentración aproximada de glóbulos blancos en la suspensión celular. Típicamente, las concentraciones de células oscilaban entre aproximadamente 1000 células por microlitro y aproximadamente 100 000 células por microlitro. Esta estimación se usó para calcular un factor de dilución apropiado para garantizar que la concentración de células en la cubeta estuviera restringida dentro de un intervalo doble alrededor de una concentración objetivo predefinida. El propósito de esta etapa era asegurar que las células no estuvieran presentes con una densidad demasiado alta o demasiado baja en la cubeta. Si la densidad de células es demasiado alta, la precisión de los algoritmos de procesamiento de imágenes se ve comprometida, y si la densidad de células es demasiado baja, se muestrea un número insuficiente de células.

20 En base al factor de dilución calculado en la etapa anterior, se añadió a la suspensión celular un diluyente que contenía anticuerpos marcados contra CD45 (marcador panleucocitario), CD16 (marcador de neutrófilos) y CD123 (marcador de basófilos) y se mezcló.

25 Una vez que la cubeta en conjunto con el portacubetas se colocó en el bloque del portacubetas, se cargaron 10 microlitros de la mezcla de glóbulos blancos resuspendidos en tampón de citometría en cada uno de los dos canales de la cubeta. Después de cargar la mezcla en los canales de la cubeta, la pipeta aspiró 10 µl de hexadecano de un recipiente en el cartucho y colocó una gota de aceite mineral en ambos extremos abiertos de ambos canales en la cubeta cargada con glóbulos blancos.

30 A continuación, el aparato de manipulación de muestras a nivel del dispositivo acopló la combinación de portacubetas/cubetas y transportó la combinación de portacubetas/cubetas desde el módulo que contenía el cartucho hasta el módulo de citometría del dispositivo. En el módulo de citometría, el aparato de manipulación de muestras a nivel de dispositivo colocó la combinación de portacubetas/cubeta en la platina de microscopía del módulo de citometría. Después de colocar el portacubetas/cubeta en la platina de microscopía, se tomaron imágenes de los dos canales de la cubeta que contenía glóbulos blancos como se describió anteriormente para la mezcla de glóbulos rojos/plaquetas.

35 Se usaron imágenes de campo oscuro de los glóbulos blancos para contar el número de células en un campo (como se muestra en la Figura 9A). Se usaron marcadores de superficie celular para determinar el tipo de célula de glóbulos blancos individuales en una imagen; por ejemplo, CD14 marca monocitos; CD123 marca basófilos; CD16 marca neutrófilos; y CD45-AF647 para marcar todos los leucocitos (Figuras 9B-9E). Se usó la tinción nuclear DRAQ5® para marcar los núcleos de las células y así diferenciar las células nucleadas (tal como los glóbulos blancos) de los glóbulos rojos maduros, que no tienen núcleo (Figura 9F).

45 Los algoritmos de procesamiento de imágenes que se emplearon en la presente descripción utilizaron imágenes de fluorescencia de las células para detectarlas mediante el uso de una combinación de umbrales adaptativos y detección de bordes. En base a la intensidad local y los gradientes de intensidad, se crearon los límites de las regiones de interés (RoI) alrededor de cada célula. Mediante el uso de imágenes de campo oscuro, también se identificaron las perlas en la muestra y se crearon los límites de las regiones de interés alrededor de las perlas. Se enumeraron todas las regiones de interés en cada campo de visión y se calculó su intensidad en cada imagen de ese campo de visión. La información generada por el algoritmo de procesamiento de imágenes consistió en mediciones de forma o morfométricas e intensidades de fluorescencia y campo oscuro para cada RoI. Esta información se analizó mediante el uso de métodos estadísticos para clasificar cada objeto como linfocito, monocitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos o perlas. En base a la enumeración de células de diferentes tipos, el recuento de perlas correspondiente y la relación de dilución implementada durante el procesamiento de la muestra, se calculó una concentración absoluta de células por microlitro de sangre total original. Esto se calculó para todos los glóbulos blancos y cada subtipo, y se informó como concentración absoluta (células por microlitro) y proporción (%).

50 En las Figuras 9, 10 y 11 se presentan ejemplos de imágenes y gráficos de resultados de dichas mediciones.

60 La Figura 9 muestra imágenes representativas de células sanguíneas de una muestra de sangre total; estas imágenes se tomaron mediante el uso de diferentes técnicas de imagen y colorantes. La imagen que se muestra en la Figura 9A se tomó de células de sangre total mediante el uso de iluminación de campo oscuro. La imagen que se muestra en la Figura 9B se tomó de células de sangre total que mostraban fluorescencia de anticuerpos anti-CD 14 marcados con colorante Pacific Blue; las células fluorescentes son monocitos. La imagen que se muestra en la Figura 9C se tomó de células de sangre total que mostraban fluorescencia de anticuerpos anti-CD123 marcados con

colorante PECy5; las células fluorescentes son basófilos. La imagen que se muestra en la Figura 9D se tomó de células de sangre total que mostraban fluorescencia de anticuerpos anti-CD16 marcados con colorante PE; las células fluorescentes son los neutrófilos. La imagen que se muestra en la Figura 9E se tomó de células de sangre total que mostraban fluorescencia de anticuerpos anti-CD45 marcados con colorante AF647; todos los leucocitos emiten fluorescencia en estas condiciones. La imagen que se muestra en la Figura 9F se tomó de células de sangre total teñidas con DRAQ5® para teñir los núcleos celulares. Por lo tanto, los leucocitos y las plaquetas se tiñen y emiten fluorescencia en estas condiciones, pero los glóbulos rojos (que carecen de núcleo) no se tiñen ni emiten fluorescencia.

La Figura 10 muestra una imagen compuesta representativa de tipos de células en sangre total a partir de imágenes adquiridas de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción. Imágenes de un monocito (marcado y visto en el cuadrante superior izquierdo de la figura, con un centro rojizo rodeado por un anillo azul-púrpura), un linfocito (marcado y visto en el centro de la figura, con un centro rojo brillante rodeado por un anillo rojo más tenue), un eosinófilo (marcado y visto en el cuadrante inferior izquierdo de la figura, con un centro verde rodeado por un borde rojo) y un neutrófilo (marcado y visto en el cuadrante inferior derecho de la figura, con un centro verde rodeado por un borde amarillo y verde) se muestran en la figura.

Es de interés identificar y cuantificar varios tipos de células que se encuentran en dichas muestras de sangre. Puede haber múltiples formas de abordar dicho proceso de clasificación, que, en algunas modalidades, puede considerarse como un problema estadístico para la clasificación multidimensional. Se entenderá que se dispone de una amplia variedad de métodos en el campo para resolver este tipo de problemas de clasificación. A continuación se proporciona una modalidad particular de dicho análisis.

La Figura 11 muestra gráficos de varios tipos de células identificados y cuantificados mediante los ensayos citométricos descritos en este ejemplo. La Figura 11A muestra un gráfico de puntos (células) por intensidad del marcador FL-17 (anticuerpo anti-CD 14 marcado con colorante azul pacífico) frente a la intensidad de FL-9 (señal de dispersión de campo oscuro) para identificar monocitos. La Figura 11B muestra un gráfico de puntos (células) por intensidad del marcador FL-19 (anticuerpo anti-CD 123 marcado con colorante PE-CY5) frente a la intensidad del marcador FL-15 (anti-CD16 marcado con colorante PE) para identificar basófilos. La Figura 11C muestra un gráfico de puntos (células) por intensidad del marcador FL-15 (anti-CD16 marcado con colorante PE) frente a la intensidad del marcador FL-11 (anticuerpo anti-CD45 marcado con colorante AF647) para identificar linfocitos. La Figura 11D muestra un gráfico de puntos (células) por intensidad del marcador FL-15 (anti-CD 16 marcado con colorante PE) frente a la intensidad de FL-9 (señal de dispersión de campo oscuro) para identificar neutrófilos y eosinófilos.

La identificación inicial de monocitos (9,6 %, como se muestra en la Figura 11A) se usa para guiar la identificación posterior de basófilos (0,68 %, como se muestra en la Figura 11B). La identificación de monocitos y basófilos como se muestra en las Figuras 11A y 11B se usa para guiar la posterior identificación de neutrófilos y eosinófilos (68 % de neutrófilos, 3,2 % de eosinófilos, de los glóbulos blancos que se muestran en la Figura 11D). Finalmente, los linfocitos se identifican como se muestra en la Figura 11C (el 93 % de los glóbulos blancos que se representan en la Figura 11C, que corresponde al 18 % de las células de la muestra original).

Los presentes métodos se correlacionan bien con otros métodos. Se realizaron recuentos de glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas con muestras de sangre total anticoagulada con EDTA. Los glóbulos blancos se contaron además para determinar el número de neutrófilos, monocitos y linfocitos en la muestra. En las mediciones que se muestran en la Figura 12, las muestras de sangre total anticoagulada con EDTA se dividieron en dos, y una parte de las muestras se procesó en el sistema descrito en la presente descripción, mediante el uso de los métodos que se describen en la presente descripción. La otra parte de las muestras se analizó en un sistema Abbott CELL-DYN Ruby System (Abbott Diagnostics, Lake Forest, IL, EE. UU.), un analizador de hematología automatizado multiparámetro comercial. En la Figura 12 se muestra una comparación de los resultados que se obtuvieron con ambos métodos.

Como se muestra en las Figuras 12A-12C, los números de glóbulos blancos ("WBC", Figura 12A), glóbulos rojos ("RBC", Figura 12B) y plaquetas (Fig. 12C) medidos por los presentes métodos se correlacionan bien con los números de WBC, RBC y plaquetas medidos por otros métodos en alícuotas correspondientes de las mismas muestras que se analizaron por los presentes métodos. Como se muestra en las Figuras 12D-12F, los números de neutrófilos, monocitos y linfocitos medidos por cualquier método fueron muy similares y se correlacionaron bien entre sí. En modalidades de los métodos descritos en la presente descripción, las muestras de sangre se pueden diluir para reducir o eliminar la superposición de glóbulos rojos. Por ejemplo, las muestras en las que se obtuvieron recuentos de glóbulos rojos normalmente se diluyeron entre aproximadamente 400 veces y aproximadamente 1000 veces para que los glóbulos rojos estuvieran lo suficientemente separados para un recuento preciso. Cuando era ventajoso o necesario, dichas diluciones se realizaban por dilución secuencial (por ejemplo, cuando una muestra o porción de la misma se diluía por primera vez para proporcionar una primera muestra diluida, y esa primera muestra diluida (o porción de la misma) se diluía una, dos, o más veces, según fuera necesario para proporcionar la dilución deseada). Como se describió anteriormente, las perlas pueden incorporarse a dichas muestras diluidas para proporcionar una medida independiente de la dilución: dado que se conoce el número de perlas añadidas, se puede usar un recuento del número o concentración de perlas en la muestra final (diluida) para calcular la cantidad real de dilución que se obtuvo. Típicamente, una relación de aproximadamente de 5-7 glóbulos rojos por perla proporciona

una relación conveniente de glóbulos rojos por perla. Opcionalmente, la solución también puede tener un componente que evite que las perlas se adhieran entre sí. En un ejemplo no limitante, el uso de una cantidad o concentración conocida de cuerpos de referencia, tales como perlas u otras estructuras, puede ser particularmente útil cuando se agregan a la muestra sin diluir antes de la etapa de dilución, especialmente en las etapas de dilución en serie que se usan para crear diluciones de 200 o más veces. Siempre que la muestra y las perlas se mezclen bien antes de cada etapa de aspiración, esto reduce el impacto de las imprecisiones en las etapas de dilución y hace que el método sea insensible a los errores de dosificación en estas etapas de dilución múltiple. Opcionalmente, alguna modalidad puede agregar los cuerpos de referencia después de la primera etapa de dilución de un proceso de dilución de múltiple etapas. Opcionalmente, alguna modalidad puede agregar los cuerpos de referencia después de la segunda etapa de dilución de un proceso de dilución de múltiple etapas.

En aspectos del término como se usa en la presente descripción, el término "citometría" se refiere a observaciones, análisis, métodos y resultados con respecto a las células de una muestra biológica, donde las células están sustancialmente en reposo en un fluido o en un sustrato. Las células que se detectan y analizan por citometría pueden detectarse y medirse por cualquier detector óptico, eléctrico o acústico. La citometría puede incluir preparar y analizar imágenes de células en o a partir de una muestra biológica (por ejemplo, imágenes bidimensionales). Las células se pueden marcar (por ejemplo, con marcas fluorescentes, quimioluminiscentes, enzimáticas u otras) y colocarlas en placas (por ejemplo, dejar que se asienten sobre un sustrato) y, típicamente, obtener imágenes con una cámara. Se puede usar un microscopio para obtener imágenes de células en citometría; por ejemplo, se puede obtener imágenes de células por una cámara y un microscopio, por ejemplo, por una cámara que forma una imagen mediante el uso de un microscopio. Una imagen que se forma y usa para la citometría típicamente incluye más de una célula.

Ejemplo 7

Este ejemplo presenta un método y resultados de segmentación secuencial de imágenes de glóbulos blancos de muestras de sangre. Otros métodos adecuados incluyen la suma de imágenes, incluido proporcionar promedios ponderados de múltiples imágenes, para proporcionar imágenes para su uso en la determinación de los límites de las células. Se pueden usar colorantes de tinción nuclear y otros colorantes, incluidos anticuerpos marcados para unirse a marcadores celulares específicos, ya sea juntos o por separado, para obtener imágenes para el análisis. Por ejemplo, las estimaciones del tamaño de célula y de los límites de célula pueden obtenerse mediante el uso de imágenes que se obtienen con cada colorante o marcador por separado, o algunas o todas las imágenes pueden combinarse para el análisis. Los presentes métodos proporcionan métodos relacionados y mejorados para estimar el tamaño de célula y para determinar los límites de las células de las que se forman imágenes mediante dispositivos y sistemas como se describe en la presente descripción. Se entenderá que estos métodos también son útiles para el análisis de células con imágenes de otros dispositivos y sistemas.

La segmentación es útil para determinar contornos de imágenes, por ejemplo, para determinar contornos (por ejemplo, límites, tal como los contornos óptimos) de imágenes de objetos dentro de una imagen más grande que contiene uno o más objetos y (típicamente) también fondo u otras características. La segmentación secuencial es un proceso iterativo que, cuando se aplica a imágenes de células en una muestra biológica, puede usarse para proporcionar contornos celulares progresivamente mejores mediante el uso de procedimientos sucesivos que dan como resultado un resultado final óptimo (o suficientemente preciso). Los resultados que se presentan en el presente ejemplo demuestran el uso de la segmentación secuencial de imágenes de fluorescencia de glóbulos blancos individuales mediante el uso de tinciones nucleares para proporcionar regiones de interés dentro de las células (por ejemplo, para proporcionar imágenes de núcleos celulares) que se usan como semilla sobre la cual para basar el proceso de segmentación secuencial para determinar los límites exteriores de las células que contienen esos núcleos.

Los colorantes y tinciones útiles para dichas imágenes y el análisis de los mismos incluyen los colorantes y marcadores descritos en la presente descripción, tales como, por ejemplo, DAPI, DRAQ5[®], yoduro de propidio u otro colorante de tinción de ADN; PE, Pacific Blue[™], alofocianina (APC), Alexza Fluor[®] y otros colorantes.

La segmentación se aplicó a las imágenes de WBC que se obtuvieron mediante el uso de imágenes de microscopía de fluorescencia para encontrar contornos (por ejemplo, contornos celulares óptimos) para cada célula que las separaba del fondo de la imagen. Se definió una región de interés (ROI) de célula como la región interior del contorno, y se usó para calcular métricas de forma y tamaño, tales como el área, el volumen y la circularidad, así como también medidas de intensidad, tales como la media, la mediana, el mínimo y el máximo de intensidad. En la Figura 15B, se muestran ejemplos de células (brillantes), fondo (oscuro) y contornos (rojo). Los contornos que se muestran en la Figura 15B se determinaron mediante segmentación secuencial como se describe en este ejemplo.

Para cada campo de visión (FoV), se adquirieron múltiples imágenes de fluorescencia con diferentes filtros, cada uno enfatizando diferentes tipos de glóbulos blancos. Se pueden ver ejemplos de diferentes tipos de imágenes fluorescentes en la Figura 13A-E; la Figura 13A es una imagen de campo oscuro, la Figura 13B es de anticuerpos anti-CD45 marcados, la Figura 13C es una imagen con tinción nuclear DRAQ5[®], la Figura 13D es de anticuerpos anti-CD16 marcados y la Figura 13E es de anticuerpos anti-CD123 marcados.

La Figura 13 muestra imágenes de glóbulos blancos (WBC) que se obtienen mediante el uso de microscopía, para su uso en la realización de análisis de segmentación secuencial para determinar los contornos de cada célula y así diferenciar las imágenes de células de las imágenes de fondo. La Figura 13A es una imagen de campo oscuro; la Figura 13B es una imagen de fluorescencia que muestra el marcaje de células por anticuerpos anti-CD45; la Figura 13C es una imagen de fluorescencia del marcaje de células mediante la tinción nuclear DRAQ5[®]; la Figura 13D es una imagen de fluorescencia que muestra el marcaje de células por anticuerpos anti-CD 16; y la Figura 13E es una imagen de fluorescencia que muestra el marcaje de células por anticuerpos anti-CD123.

La suposición del método de segmentación era que el contorno celular deseado para un núcleo dado se podía encontrar en la imagen en la que el área celular era la más grande. El método constó de las siguientes etapas:

1) Segmentación de núcleos celulares mediante el uso de la imagen teñida con DRAQ5[®].

2) Para cada imagen adquirida: haga crecer las regiones celulares mediante el uso de la segmentación de cuencas hidrográficas, inicializadas con los núcleos celulares segmentados.

3) Para cada núcleo: encontrar el ROI de célula con el área más grande en todas las imágenes y registrarlo como la segmentación final para esa célula.

Los núcleos celulares se detectaron mediante el uso de la imagen teñida con DRAQ5[®]. Los ROI se encontraron mediante el uso del umbral adaptativo, donde la intensidad de un píxel se estableció como primer plano si su intensidad era una cierta cantidad más alta que la intensidad media en la vecindad del píxel. La intensidad de los píxeles varió entre las imágenes; por ejemplo, la intensidad de los píxeles disminuyó con la distancia desde los valores de intensidad máxima locales. La velocidad de cambio en dicha disminución de la intensidad de los píxeles (al aumentar la distancia desde los máximos locales) se usó para determinar los límites, o bordes, de las imágenes de los objetos. A continuación, se calcularon los tamaños de las imágenes de los objetos (por ejemplo, núcleos celulares cuando se usó DRAQ[®] u otra tinción nuclear) mediante el uso de los límites. Un ROI se clasificó como núcleo si estaba dentro de un intervalo de tamaño permitido. La Figura 14C muestra una imagen teñida con DRAQ5[®], que muestra los contornos de los núcleos identificados de esta manera en azul.

Se asumió que cada ROI de núcleo estaba en el interior de un ROI celular. La segmentación celular en una imagen se realizó haciendo crecer las regiones alrededor de los ROI del núcleo ya segmentados. Los criterios de parada pueden basarse en la magnitud del gradiente, la información de intensidad u otros factores o una combinación de factores. Ejemplos de técnicas de segmentación que se pueden usar son los contornos activos, los contornos activos geodésicos y cuencas hidrográficas. Se usó el algoritmo de cuenca hidrográfica y el crecimiento de la ROI se detuvo cuando alcanzó un máximo en la magnitud del gradiente de intensidad, una disminución significativa de la intensidad o cuando encontró una ROI vecina.

La segmentación de cuencas hidrográficas se realizó en cada imagen adquirida para el FoV y se almacenaron los ROI de las células. Para cada núcleo en la imagen, las áreas de ROI de la célula se compararon en todas las imágenes, y el ROI con el área más grande se registró como el ROI de la célula final para ese núcleo. Todos los ROI de células con área máxima se combinaron luego en una segmentación final de WBC. En la Figura 15B se muestra un ejemplo de una segmentación secuencial final de leucocitos. Este método determina regiones celulares con mayor precisión que otros métodos, por ejemplo, encuentra regiones celulares con mayor precisión que una segmentación de un solo paso de un promedio ponderado de imágenes de fluorescencia. Los contornos que se muestran en la Figura 15A se determinaron mediante la segmentación de cuencas hidrográficas realizada una vez en las imágenes de células compuestas, mientras que los contornos que se muestran en la Figura 15B se determinaron mediante la segmentación secuencial de WBC como se describe en la presente descripción.

La Figura 14 muestra las imágenes de la Figura 13 con resultados de segmentación. Los ROI de núcleo se trazan mediante el uso de contornos azules y los ROI de célula tienen contornos rojos. La Figura 14A es una imagen de campo oscuro con los ROI de los núcleos superpuestos en azul y la segmentación celular generada en rojo, la Figura 14B es de anticuerpos anti-CD45 marcados con los ROI de los núcleos superpuestos en azul y la segmentación celular resultante en rojo, la Figura 14C es una imagen con tinción nuclear DRAQ5[®] con ROI de núcleos segmentados en azul, la Figura 14D es de anticuerpos anti-CD16 marcados con ROI de núcleos en azul y la segmentación celular resultante en rojo, y la Figura 14E es de anticuerpos anti-CD123 marcados con ROI de núcleos superpuesto en azul y la segmentación celular resultante en rojo.

La Figura 14 muestra glóbulos blancos (WBC) en imágenes que se obtienen mediante microscopía, como en la Figura 13, para realizar análisis de segmentación secuencial para determinar los contornos externos (por ejemplo, membrana celular) e internos (por ejemplo, núcleo) para cada célula y así identificar el núcleo de la célula, así como también para diferenciar las regiones de interés de la célula de las regiones de fondo. Las líneas dentro de las imágenes de las células identifican los límites del núcleo WBC para cada célula según lo determinado por el análisis de segmentación secuencial. La Figura 14A es una imagen de campo oscuro; la Figura 14B es una imagen de fluorescencia que muestra el marcaje de células por anticuerpos anti-CD45; la Figura 14C es una imagen de fluorescencia del marcaje de células mediante la tinción nuclear DRAQ5[®]; la Figura 14D es una imagen de

fluorescencia que muestra el marcaje de células por anticuerpos anti-CD16; y la Figura 14E es una imagen de fluorescencia que muestra el marcaje de células por anticuerpos anti-CD123.

Otro enfoque para la segmentación de WBC fue realizar un promedio ponderado de todas las imágenes fluorescentes y de campo oscuro y realizar una segmentación de cuencas hidrográficas una vez en esa imagen compuesta. Este método puede crear un sesgo hacia las células que tenían más tinción en las imágenes. La Figura 15A muestra una imagen compuesta. Las ROI de la segmentación de cuencas hidrográficas realizada una vez en la imagen compuesta se muestran en contornos rojos. La Figura 15B muestra una imagen compuesta con la segmentación WBC secuencial descrita trazada con contornos rojos. Los principales contribuyentes a la segmentación final fueron de la Figura 14B y la Figura 14D en este caso.

La Figura 15 muestra imágenes compuestas de glóbulos blancos (WBC) que se muestran en las Figuras 13 y 14. La Figura 15A es una imagen compuesta de las células que se muestran en las Figuras 13 y 14, con contornos de células que se obtienen por segmentación de cuencas hidrográficas realizada una vez. La Figura 15B es el resultado de la segmentación secuencial como se describe en la presente descripción aplicada a la imagen compuesta de las células que se muestran en las Figuras 13 y 14, que muestran los contornos de las células que se obtienen por ese análisis. El análisis de segmentación secuencial que se ilustra en la Figura 15B parece identificar mejor los contornos de las células que la segmentación de cuencas hidrográficas realizada una vez como se muestra en la Figura 15A.

Sistemas Ópticos

Con referencia ahora a las Figuras 6A y 6B, ahora se describirán modalidades de un sistema óptico adecuado para su uso en la presente descripción. Aunque estas modalidades del sistema se describen en el contexto de poder realizar citometría, también debe entenderse que las modalidades del sistema también pueden tener usos y capacidades más allá de la citometría. A modo de ejemplo y no de limitación, las capacidades de formación de imágenes y procesamiento de imágenes de los sistemas descritos en la presente descripción pueden usarse para muchas aplicaciones, incluidas aplicaciones fuera de la citometría. Dado que se capturan imágenes de la muestra que se analiza, y la información de la imagen típicamente se vincula o asocia en el sistema con mediciones cuantitativas, se pueden analizar más las imágenes asociadas con la información cuantitativa para recopilar información clínica en las imágenes que de otro modo no se informaría.

Una muestra a analizar, por ejemplo, por citometría u otros medios ópticos o de formación de imágenes, puede mantenerse en un portamuestras para su análisis. Por ejemplo, una cubeta puede servir como portamuestras. La modalidad que se muestra en la Figura 6A muestra una vista en perspectiva de una cubeta 600 que tiene una pluralidad de aberturas 602 para recibir una muestra o porción de la misma para su análisis. Por ejemplo, se puede usar una abertura 602 como puerto de entrada para proporcionar una muestra, tal como una muestra de fluido, a un canal, conducto o cámara (por ejemplo, una cámara de muestra) para su análisis. La forma de la sección transversal horizontal de la modalidad de la Figura 6A es una forma de sección transversal horizontal rectangular. Aunque el sistema se describe en el contexto de una cubeta, debe entenderse que también se pueden usar otros dispositivos de sujeción de muestras en lugar de o en combinación con la cubeta 600.

Como se ve en la modalidad de la Figura 6A, las aberturas 602 pueden permitir que un sistema de manipulación de muestras (no se muestra) u otro sistema de entrega deposite la muestra en la abertura 602 que puede conectarse y puede conducir a un área de análisis 608 en la cubeta donde se puede analizar la muestra. En un ejemplo no limitante, un área de análisis 608 puede ser una cámara. En otro ejemplo no limitante, un área de análisis 608 puede ser un canal. En modalidades, un área de análisis 608 que se configura como un canal puede conectar dos puertos de entrada 602. En aun otro ejemplo no limitante, un área de análisis 608 puede ser un canal en donde la muestra se mantiene sin fluir. En cualquiera de las modalidades de la presente descripción, el sistema puede contener las muestras sin que fluyan durante el análisis. Opcionalmente, algunas modalidades alternativas pueden configurarse para permitir el flujo de muestra a través del área de análisis antes, durante o después del análisis. En algunas modalidades, después del análisis, la muestra se extrae de la cubeta 600 y luego se entrega a otra estación (en un sistema que tiene múltiples estaciones) para su posterior procesamiento o análisis. Algunas modalidades pueden usar puerta(s) en el sistema para controlar el flujo de muestra.

La Figura 6A muestra que, en algunas modalidades de una cubeta 600, una cubeta 600 puede tener una pluralidad de aberturas 602. La muestra se puede agregar al portamuestras a través de los puertos de entrada 602. Una abertura 602 puede conectarse operativamente con (por ejemplo, en continuidad fluida con) un área de análisis 608. Un área de análisis 608 puede conectarse operativamente con (por ejemplo, en continuidad fluida con) una pluralidad de aberturas 602. Se entenderá que algunas modalidades pueden tener más o menos aberturas 602 en la cubeta 600. Algunas modalidades pueden vincular ciertas aberturas 602 de manera que pares seleccionados u otros conjuntos de aberturas 602 puedan acceder al mismo canal (por ejemplo, el área de análisis 608 que se configura como un canal). A modo de ejemplo no limitante, puede haber una abertura 602 en cada extremo de un área de análisis 608. Opcionalmente, más de una abertura 602 puede estar en un extremo de un área de análisis 608.

Las modalidades de una cubeta 600 pueden tener estructuras 610 que permitan que un sistema de manipulación de muestras se acople y transporte la cubeta 600. Una cubeta 600, como se ilustra en la Figura 6A y la Figura 6B, puede acoplarse por un sistema de manipulación de muestras a través de un elemento 610, de modo que la cubeta 600 pueda transportarse de un lugar a otro. También se puede usar un elemento 610 para asegurar una cubeta 600 en una ubicación deseada, por ejemplo, antes o después del transporte a una ubicación (tal como sobre un detector para análisis y obtención de imágenes ópticas), una cubeta 600 se puede mantener en posición mediante un elemento 610 o por una herramienta o dispositivo que usa un elemento 610 para mantener una cubeta 60 en posición. En un ejemplo no limitante, las estructuras 610 pueden ser aberturas en la cubeta 600 que permiten que una pipeta u otro miembro alargado se acople a la cubeta 600 y la transporte a la ubicación deseada. Opcionalmente, en lugar de o en combinación con dicha(s) abertura(s), las estructuras 610 pueden ser, o pueden incluir, una protuberancia, un gancho, un imán, un elemento magnetizable, un elemento metálico u otra característica que pueda usarse para acoplar un dispositivo de transporte de cubetas. En modalidades, se puede aplicar fuerza (por ejemplo, compresión u otra fuerza) a una cubeta 600; por ejemplo, se puede aplicar compresión a una cubeta 600 para presionar una cubeta 600 sobre un sustrato o superficie (por ejemplo, una superficie de un soporte base 620), eficaz para colocar la cubeta 600 en contacto óptico efectivo con la superficie. En modalidades, dicha fuerza (por ejemplo, compresión) puede ayudar a proporcionar las propiedades ópticas deseadas, tal como proporcionar un buen contacto entre una cubeta 600 y un soporte base 620, efectivo para permitir el paso de la luz sin una distorsión significativa en la interfaz, o sin una reflexión significativa en la interfaz, u otra propiedad óptica deseada. En modalidades, dicha fuerza (por ejemplo, compresión) se puede aplicar, al menos en parte, a través de una estructura 610 o a través de múltiples estructuras 610.

Como se muestra en la Figura 6B (en vista en perspectiva), una cubeta 600 puede tener una forma de sección transversal horizontal circular. Una abertura 602 (o múltiples aberturas 602, que pueden estar presentes en modalidades similares, que no se muestran en la figura) pueden permitir que un sistema de manejo de muestras u otro sistema de entrega deposite una muestra en la abertura 602 que luego puede conducir a un área de análisis 608 en la cubeta donde se puede analizar la muestra. Los ejemplos no limitantes de áreas de análisis adecuadas 608 incluyen un área de análisis 608 que comprende una cámara y un área de análisis que comprende un canal. En modalidades, dicha área de análisis 608 puede ubicarse dentro de una estructura anular tal como la estructura anular 604 que se muestra en la Figura 6B. En modalidades, una abertura 602 puede conectarse con un área de análisis 608. En modalidades, un área de análisis 608 dentro de una estructura 604 puede formar una cámara continua en forma de anillo, conectando con una abertura 608 eficaz para permitir el flujo dentro de la cámara en cualquiera de las dos direcciones alejándose de una abertura 602. En modalidades, un área de análisis 608 dentro de una estructura 604 puede formar un canal o cámara en forma de anillo, con un extremo conectado con una abertura 608, y otro extremo separado o bloqueado de la abertura 602, efectivo para permitir el flujo dentro de la cámara en sólo una dirección lejos de una abertura 602. En modalidades, dicho canal o cámara unidireccional en forma de anillo puede tener un respiradero u otra abertura en una ubicación distal a una abertura 602. Todavía en otro ejemplo no limitante, el área de análisis puede ser o incluir un canal en donde la muestra se mantiene sin fluir; una muestra puede mantenerse sin fluir en un área de análisis 608 que comprende un canal en forma de anillo, ya sea si el canal en forma de anillo se conecta a una abertura 602 desde dos direcciones, o si el canal en forma de anillo se conecta a una abertura 602 desde una única dirección. En cualquiera de las modalidades de la presente descripción, el sistema puede contener las muestras sin que fluyan durante el análisis. Opcionalmente, algunas modalidades alternativas pueden configurarse para permitir el flujo de muestra a través del área de análisis antes, durante o después del análisis. En algunas modalidades, después del análisis, la muestra se extrae de la cubeta 600 y luego se entrega a otra estación (en un sistema que tiene múltiples estaciones) para su posterior procesamiento o análisis. Algunas modalidades pueden usar puerta(s) en el sistema para controlar el flujo de muestra.

La Figura 6B muestra solo una única estructura anular 604; sin embargo, se entenderá que, en modalidades adicionales de una cubeta 600 con la forma que se ilustra en la Figura 6B, una cubeta 600 puede tener una pluralidad de estructuras anulares 604. Por ejemplo, una cubeta 600 que tiene una pluralidad de estructuras anulares 604 puede tener estructuras anulares concéntricas 604, de diferentes tamaños, con una estructura anular externa 604 que rodea una o más estructuras anulares internas 604. Dichas estructuras anulares 604 pueden incluir áreas de análisis 608 dentro de cada estructura anular 604. La Figura 6B muestra solo una única abertura 602; sin embargo, se entenderá que, en modalidades adicionales de una cubeta 600 con la forma que se ilustra en la Figura 6B, una cubeta 600 puede tener una pluralidad de aberturas 602. Por ejemplo, una cubeta 600 que tiene una pluralidad de estructuras anulares 604 (por ejemplo, que tiene una pluralidad de estructuras anulares concéntricas 604) puede tener una pluralidad de aberturas 602 (por ejemplo, cada estructura anular 604 puede tener al menos una abertura 602). Se entenderá que algunas modalidades pueden tener más o menos aberturas 602 en una cubeta 600. Algunas modalidades pueden vincular ciertas aberturas 602 de manera que pares seleccionados u otros conjuntos de aberturas 602 puedan acceder al mismo canal o cámara. A modo de ejemplo no limitante, puede haber una abertura 602 en cada extremo de un área de análisis. Opcionalmente, más de una abertura 602 puede estar en un extremo de un área de análisis 608.

Algunas modalidades de cubetas, como se ilustra en las Figuras 6A y 6B, pueden proporcionar estructuras 604 sobre áreas seleccionadas de una cubeta 600. En una modalidad, las estructuras 604 son nervaduras que proporcionan soporte estructural para áreas de la cubeta que se seleccionan para tener un grosor controlado (por ejemplo, áreas 613). Por ejemplo, el grosor se puede seleccionar para proporcionar las propiedades ópticas

deseadas, incluidas las trayectorias deseadas que debe seguir la luz antes y después de la reflexión dentro de la cubeta 600. Dicha reflexión puede ser una reflexión interna parcial (PIR) o una reflexión interna total (TIR). Que dicha reflexión ocurra depende de muchos factores, incluida la longitud de onda de la luz; el ángulo de incidencia de la luz que alcanza una superficie; la composición del material (del área 613 y de un ambiente o material fuera del límite de un área 613); y otros factores. En las modalidades que se muestran en la Figura 6A, las estructuras 604 son de forma rectangular y tienen una sección transversal rectangular. En las modalidades que se muestran en la figura 6B, las estructuras 604 tienen forma anular y pueden tener una sección transversal rectangular, una sección transversal trapezoidal u otra sección transversal con forma. Dichas estructuras pueden tener cualquier forma de sección transversal adecuada. Como se ilustra en la Figura 8B, dichas estructuras 604 pueden tener una sección transversal triangular (por ejemplo, formando una sección transversal en forma de diente de sierra cuando hay múltiples nervaduras presentes). Se entenderá que dichas estructuras 604 también pueden tener otras formas y secciones transversales (por ejemplo, semicircular, elíptica, irregular u otra forma) y que, en las modalidades, puede haber más de una forma presente en el mismo sistema (por ejemplo, una cubeta puede incluir estructuras rectangulares, triangulares o de otra forma). Las estructuras 604 se pueden usar cuando las áreas de grosor controlado 613 tienen un grosor reducido en relación con ciertas áreas de la cubeta y, por lo tanto, podrían beneficiarse del soporte mecánico que proporcionan las estructuras 604.

Además de proporcionar soporte estructural, las estructuras 604 pueden ser útiles para proporcionar material y trayectorias para la reflexión interna de la luz dentro de una cubeta 600. Como se muestra en las Figuras 8A-8D, la luz que se refleja dentro de una cubeta 600 puede incluir trayectorias para la luz que se refleja dentro de una estructura 604 (por ejemplo, una nervadura o una estructura que tiene una sección transversal triangular, como se muestra en las figuras, o cualquier otra forma, tal como una sección transversal circular o semicircular, u otra forma de sección transversal). Las estructuras 604 pueden así proporcionar características convexas que se extiendan hacia fuera desde una superficie 614 de una cubeta 600; o puede proporcionar características cóncavas que se extiendan hacia adentro desde una superficie 614 de una cubeta 600; o puede proporcionar características tanto cóncavas como convexas en una superficie 614 de una cubeta 600. Por lo tanto, las estructuras 604 pueden proporcionar soporte mecánico a una cubeta 600, pueden proporcionar las propiedades ópticas deseadas, incluidas las trayectorias ópticas, a una cubeta 600 y pueden proporcionar otras características y capacidades conveniente y útiles a una cubeta 600 como se describe en la presente descripción.

Las estructuras de soporte 604, por lo tanto, pueden ser útiles para proporcionar soporte estructural, incluido, por ejemplo, rigidez, a una cubeta 600. Las propiedades ópticas de una cubeta 600 pueden ser importantes para su uso en formación de imágenes ópticas y otras mediciones ópticas de muestras en un área de análisis 608 y de células, partículas y otros componentes de dichas muestras. El mantenimiento de la planitud adecuada de una superficie de una cubeta 600, incluido el mantenimiento de la planitud de una porción de base 606, o una superficie 614 o 618; el mantenimiento de la orientación y configuración apropiadas de una cubeta 600 (por ejemplo, sin torsión, flexión u otra distorsión); y el mantenimiento del posicionamiento adecuado de una cubeta 600 (por ejemplo, en un soporte de base 620 o dentro de una configuración óptica) puede ser importante para la integridad de las mediciones ópticas y las imágenes que se obtienen mediante el uso de la cubeta 600. Así, por ejemplo, el diseño y la construcción de las estructuras de soporte 604 y la porción de la base 606 pueden ser factores importantes para proporcionar y mantener las propiedades ópticas adecuadas de una cubeta 600. El mantenimiento de las dimensiones adecuadas de un área de análisis 608, incluido el mantenimiento de las distancias adecuadas y los ángulos relativos de las superficies superior e inferior (o de las paredes laterales) de un área de análisis 608 puede ser importante para proporcionar una iluminación correcta y constante de una muestra dentro de un área de análisis 608. El mantenimiento de las dimensiones adecuadas de un área de análisis 608 también puede ser importante para garantizar que el volumen de un área de análisis 608 y, por lo tanto, el volumen de muestra dentro del área de análisis 608 sea correcto. Como se describe en la presente descripción, se puede aplicar fuerza (por ejemplo, compresión) a una cubeta 600 para garantizar aún más la planitud adecuada, o para disminuir la torsión o distorsión, o de cualquier otra manera para garantizar la forma, el tamaño y la orientación adecuados de una cubeta durante el uso. Se entenderá que puede no ser necesaria la compresión para asegurar dicha planitud y forma, tamaño y orientación adecuados de una cubeta durante el uso. Por ejemplo, en las modalidades, las estructuras 604 por sí solas pueden ser suficientes para ayudar o garantizar que una cubeta 600 tenga la planitud adecuada y la forma, el tamaño y la orientación adecuados durante el uso. Además, se entenderá que, en las modalidades, la compresión por sí sola puede ser suficiente para ayudar o asegurar dicha planitud adecuada y forma, tamaño y orientación adecuados de una cubeta 600 durante el uso. Se entenderá que, en las modalidades, la combinación de estructuras 604 y compresión puede ayudar o asegurar el mantenimiento de la planitud adecuada y la forma, el tamaño y la orientación adecuados de una cubeta durante el uso.

Una cubeta 600, que incluye una estructura de soporte 606 y una porción de cubierta 612, puede hacerse de cualquier material que tenga propiedades ópticas adecuadas. En modalidades, una cubeta 600, que incluye una estructura de soporte 606 y una porción de cubierta 612, puede hacerse de vidrio (por ejemplo, cuarzo o vidrio de borosilicato, o vidrio de aluminosilicato, o vidrio de silicato de sodio u otro vidrio). En modalidades, una porción de cubierta 612 o un soporte de base 620 pueden hacerse de un polímero acrílico o transparente (por ejemplo, una cicloolefina, un policarbonato, un poliestireno, un polietileno, un poliuretano, un cloruro de polivinilo u otro polímero o copolímero), u otro material transparente. Además de las propiedades ópticas de dichos materiales, las propiedades físicas (por ejemplo, dureza, rigidez, punto de fusión, capacidad de mecanización y otras propiedades), la

compatibilidad con otros materiales, el costo y otros factores pueden afectar la elección del material usado para fabricar una cubeta 600. Como se describió anteriormente, la presencia de estructuras 604, la disponibilidad de compresión (por ejemplo, como se puede aplicar a través de una estructura 610, o directamente a al menos una porción de una estructura de soporte 606 y la porción de cubierta 612), y otros factores, pueden permitir el uso de materiales que pueden ser menos rígidos que el cuarzo, por ejemplo, pero que aún pueden proporcionar las propiedades ópticas y mecánicas requeridas para su uso en los sistemas y métodos que se describen en la presente descripción. Además, la presencia de estructuras 604, la disponibilidad de compresión y otros factores pueden permitir el uso de técnicas de fabricación y tolerancias que de otro modo no serían posibles (por ejemplo, debido a la posibilidad de deformación u otros factores) en ausencia de dicha estructura, compresión y otros factores. Además, la presencia de estructuras 604, la disponibilidad de compresión y otros factores, pueden permitir el uso de materiales, incluidos materiales menos costosos, que de otro modo podrían usarse en ausencia de dicha estructura, compresión y otros factores.

Por lo tanto, el diseño, la construcción y los materiales apropiados para las estructuras de soporte 604 y las porciones de base 606 son importantes para las cubetas 600 y su uso.

En algunas modalidades, estas áreas de grosor controlado 613 (ver, por ejemplo, las Figuras 8A, 8B y 8D) se seleccionan para colocarse sobre las áreas de análisis 608. En algunas modalidades, estas áreas de grosor controlado 613 pueden impartir ciertas propiedades ópticas sobre o cerca de las áreas de análisis. Algunas modalidades pueden configurar las estructuras 604 para impartir también propiedades ópticas a la luz que pasa a través de la cubeta 600. Opcionalmente, en algunas modalidades, las estructuras 604 pueden configurarse para que no afecten las cualidades ópticas de la cubeta 600. En dicha modalidad, las estructuras 604 pueden configurarse para tener una o más superficies ópticamente absorbentes. Por ejemplo, y sin limitación, ciertas superficies pueden ser negras. Opcionalmente, algunas modalidades pueden tener estructuras 604 que se forman a partir de un material para absorber la luz. Opcionalmente, las estructuras 604 se pueden colocar para proporcionar soporte mecánico pero no interactúan con las propiedades ópticas de la cubeta 600 cerca de las áreas de análisis.

Por ejemplo, ciertas superficies, que incluyen una superficie 614 de un área de grosor controlado 613, y una superficie 618 de una estructura 604, pueden revestirse con un recubrimiento negro o de otro color. Dicho recubrimiento puede incluir una capa, y puede incluir múltiples capas. Por ejemplo, los recubrimientos adecuados de una superficie 614 o 618 pueden incluir 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más capas. En modalidades, por ejemplo, una superficie de una estructura 604 (por ejemplo, una superficie 618) o una superficie 614 puede cubrirse por 3 o 5 capas de revestimiento. Dicho recubrimiento puede incluir un colorante, una tinta, una pintura, un tratamiento de superficie, una cinta coloreada u otro revestimiento o tratamiento de superficie. En modalidades, se puede usar un marcador negro o de otro color (por ejemplo, Paper Mate[®], o Sharpie[®], o Magic Marker[®], u otro marcador) para recubrir una superficie 614 de un área de grosor controlado 613 o una superficie 618 de una estructura 604. Por ejemplo, se puede usar un marcador negro extragrande para aplicar múltiples capas de tinta negra a una superficie 614 o a la superficie exterior 618 de una estructura 604 para proporcionar una superficie ópticamente absorbente y así mejorar las cualidades ópticas de una cubeta 600. En modalidades, una superficie 614 o 618 puede recubrirse o tratarse para afectar o reducir la reflectancia (ya sea PIR o TIR) en la superficie. Una reducción en la reflectancia en una superficie puede afectar (por ejemplo, reducir) la iluminación de fondo de una superficie.

En modalidades, ciertas superficies, que incluyen una superficie 614 de un área de grosor controlado 613 y una superficie 618 de una estructura 604, pueden recubrirse o cubrirse con un material que mejora la reflectancia en la superficie. La reflectancia en una superficie se puede aumentar, por ejemplo, recubriendo una superficie o uniendo un material a una superficie; los materiales adecuados para aumentar la reflectancia incluyen aluminio, plata, oro y materiales dieléctricos (por ejemplo, fluoruro de magnesio, fluoruro de calcio u otra sal u óxido metálico u otro material reflectante o dieléctrico). Dicho recubrimiento o revestimiento puede incluir una capa o múltiples capas. Por ejemplo, los recubrimientos adecuados y los revestimientos de una superficie 614 o 618 pueden incluir 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más capas. Un aumento en la reflectancia en una superficie puede afectar (por ejemplo, aumentar) la transmisión de una superficie. Un aumento en la reflectancia en una superficie puede ayudar o mejorar la formación de imágenes de una muestra dentro de un área de análisis 608, o puede ayudar o mejorar el análisis óptico de una muestra dentro de un área de análisis 608.

Debe entenderse que la cubeta 600 se forma típicamente a partir de un material ópticamente transparente u ópticamente transmisor. Opcionalmente, solo porciones seleccionadas de la cubeta 600 (tal como, por ejemplo, las áreas de análisis o áreas asociadas con las áreas de análisis) son ópticamente transparentes u ópticamente transmisivas. Opcionalmente, las capas o áreas seleccionadas en la cubeta 600 también se pueden configurar para que no transmitan la luz. Una porción o área de una cubeta se puede cubrir o recubrir para que absorba la luz; por ejemplo, una superficie (o porción de la misma) se puede recubrir con un colorante o tinta oscura o absorbente de luz. En otro ejemplo, una superficie (o porción de la misma) puede cubrirse con un recubrimiento oscuro o que absorba la luz, tal como un material oscuro o que absorba la luz, por ejemplo, cinta, tela, papel, goma o plástico.

Las Figuras 6A, 6B y 8A - 8D ilustran modalidades en las que la cubeta 600 descansa sobre un soporte base 620 en donde parte o todo el soporte base 620 se forma por un material ópticamente transparente o transmisor. En algunas modalidades, las porciones ópticamente transmisivas o transparentes se configuran para alinearse con las áreas de

análisis de la cubeta 600 para permitir la interrogación óptica de la muestra en el área de análisis. En un ejemplo no limitante, el soporte base 620 se puede mover en los ejes X, Y o Z para mover la cubeta 600 a una posición deseada para la formación de imágenes. En algunas modalidades, el soporte base 620 comprende una plataforma o platina que se mueve solo en dos de los ejes. Opcionalmente, algunas estructuras de soporte pueden moverse solo en un solo eje. La cubeta 600 puede configurarse para acoplarse operativamente a la estructura de soporte 600 mediante fricción, acoplamiento mecánico o mediante miembros de retención que se montan en uno o ambos componentes. En modalidades, se puede aplicar compresión u otra fuerza a una cubeta 600 o a un soporte de base 620, o a ambos, para garantizar un contacto adecuado y un ajuste adecuado entre una cubeta 600 y un soporte de base 620. En modalidades, dicha compresión puede ayudar a asegurar que una superficie transmisiva ópticamente de una cubeta 600, o de un soporte base 620, o dichas superficies de ambos, sea ópticamente plana y sustancialmente libre de distorsión. Por ejemplo, en modalidades, una cubeta 600 puede presionarse contra un soporte de base 620 para reducir u obviar cualquier posible distorsión óptica que podría producirse por imperfecciones o anomalías en una superficie óptica de una cubeta 600. En modalidades, dicha fuerza (por ejemplo, compresión) puede ayudar a proporcionar las propiedades ópticas deseadas, efectivas para permitir el paso de la luz con distorsión en la interfaz que de cualquier otra manera podría producirse. En modalidades, dicha fuerza (por ejemplo, compresión) se puede aplicar, al menos en parte, a través de una estructura 610 o a través de múltiples estructuras 610.

Las Figuras 6A, 6B, 8A, 8B, 8C y 8D muestran además modalidades en las que la iluminación para la observación de campo oscuro o de campo claro puede proporcionarse mediante una fuente de iluminación 650 (tal como, entre otros, una luz anular como se muestra) que se coloca debajo del soporte base 620 para ubicar el equipo de iluminación por debajo del nivel de la cubeta 600. Esta configuración deja las áreas superiores de la cubeta 600 disponibles para pipetas, equipo de manejo de muestras u otro equipo para tener acceso sin obstáculos a las aberturas u otras características en la superficie superior de la cubeta 600. Opcionalmente, algunas modalidades pueden ubicar una fuente de iluminación 660 (se muestra en línea imaginaria) sobre la cubeta 600 para usarse en lugar de, en combinación única o múltiple con iluminación inferior (por ejemplo, una fuente de iluminación inferior 650 como se muestra). Se puede colocar un objetivo 670 como se muestra, o en otras configuraciones, para observar la muestra que se ilumina. Debe entenderse que se puede usar el movimiento relativo entre la cubeta 600 y las porciones ópticas 650 y 670 para permitir que el sistema visualice diferentes áreas de análisis en la cubeta 600. Opcionalmente, solo uno de dichos componentes se pone en movimiento para interrogar diferentes áreas de la cubeta 600.

Con referencia ahora a la Figura 7A, ahora se describirá con más detalle una modalidad de un sistema de formación de imágenes adecuado. La Figura 7A muestra una vista en sección transversal esquemática de varios componentes que se colocan debajo del soporte base 620. La sección transversal es a lo largo del área indicada por las flechas dobladas 7 en la Figura 6A.

La Figura 7A muestra una modalidad en la que la cubeta 600 comprende una porción de base 606 y áreas de análisis 608 definidas por una porción de cubierta 612. Opcionalmente, las áreas de análisis 608 pueden definirse dentro de una sola pieza. Opcionalmente, las áreas de análisis 608 pueden definirse mediante el uso de más de dos piezas, tal como, entre otras, una pieza de cubierta discreta para cada una de las áreas de análisis 608. En una modalidad, la capa 606 comprende plástico ópticamente transparente tal como, entre otros, termoplástico de polímero de cicloolefina que ofrece aplicaciones y componentes ópticos superiores. En algunas modalidades, se pueden formar una o más capas o componentes de vidrio, acrílico, polímero transparente u otro material transparente. La cubeta 600 que se ilustra en la Figura 7A incluye cinco áreas de análisis separadas 608; estas áreas se muestran en sección transversal en la figura; las áreas de análisis 608 que tienen dicha sección transversal pueden ser rectangulares, cuadradas o de otra forma. Por ejemplo, las áreas de análisis 608 pueden comprender canales alargados que proporcionan cámaras poco profundas con cantidades relativamente grandes de área superficial a través de las cuales se pueden observar las muestras. En modalidades, las áreas de análisis 608 pueden tener formas curvas, poligonales o irregulares, y pueden estar separadas o pueden estar conectadas mediante canales de conexión. Se entenderá que una cubeta 600 puede incluir un área de análisis única 608; o puede incluir dos áreas de análisis 608; o puede incluir tres áreas de análisis 608; o puede incluir cuatro áreas de análisis 608; o puede incluir cinco (como se muestra en la Figura 7A) o más áreas de análisis 608.

En modalidades, un canal en una cubeta 600, tal como un área de análisis 608, puede tener una forma irregular de modo que la dimensión de la sección transversal difiera a lo largo del canal; por ejemplo, un canal en una cubeta 600 puede tener una porción de extremo estrecha y una porción central más ancha. En las modalidades, un canal en una cubeta 600, tal como un área de análisis 608, puede tener forma de U u otra forma en la que una primera porción alargada de un área de análisis única se disponga cerca de una segunda porción alargada de la misma área de análisis 608 o junto a ella. Por ejemplo, en dicha modalidad, el rectángulo indicado por la línea principal etiquetada como "608" en la Figura 7A puede ser una porción de la misma área de análisis que se ilustra por el rectángulo inmediatamente a la izquierda del rectángulo indicado por la línea principal etiquetada como "608".

En modalidades, una muestra a interrogarse se puede mantener en su totalidad o en parte en un área de análisis 608. En modalidades, más de una porción de una muestra, o más de una muestra, o porciones de más de una muestra, pueden mantenerse en un área de análisis 608. En modalidades, porciones de una muestra, o porciones

de diferentes muestras, dentro de un canal de una cubeta también, por ejemplo, dentro de un área de análisis 608, pueden estar separadas por una burbuja de aire, o por una gota de aceite, o por otro material o materiales.

5 En modalidades, el análisis de una muestra contenida en un área de análisis 608 puede comprender observación óptica, medición o formación de imágenes de al menos una porción de un área de análisis 608. En modalidades, la observación óptica, la medición o la formación de imágenes de al menos una porción de un área de análisis 608 puede comprender la observación, la medición o la formación de imágenes ópticas de un área de análisis completa 608. En modalidades, el análisis de una muestra contenida en un área de análisis 608 puede comprender la observación óptica, la medición o la formación de imágenes de solo una porción de un área de análisis 608. En modalidades, el análisis de una muestra contenida en un área de análisis 608 puede comprender la observación óptica, la medición o la formación de imágenes de una región de interés (ROI) dentro de al menos una porción de un área de análisis 608. En modalidades, el análisis de una muestra contenida en un área de análisis 608 puede comprender la observación óptica, la medición o la formación de imágenes de múltiples ROI dentro de un área de análisis 608. Por ejemplo, cuando un canal en una cubeta 600 tiene una porción de extremo estrecha y una porción media más ancha, se pueden observar, medir o generar imágenes de múltiples ROI en la porción media más ancha, mientras que, por ejemplo, solo una ROI única (o ninguna ROI) se puede observar, medir o visualizar en la porción de extremo más estrecha.

20 A modo de ejemplo no limitante, la óptica debajo del soporte base 620 puede incluir una luz anular 650 que comprende un reflector toroidal 652 y una fuente de luz 654. Pueden usarse otros componentes de iluminación adecuados para iluminación de campo oscuro; por tanto, la óptica puede incluir otras fuentes de iluminación, solas o en combinación con dicha luz anular. Algunas modalidades pueden usar un espejo. Algunas modalidades pueden usar una superficie reflectante revestida. Algunas modalidades pueden usar un reflector diferente a los que se muestran en la figura (por ejemplo, pueden no usar reflexión toroidal al iluminar una muestra). Algunas modalidades pueden usar un reflector parabólico. Algunas modalidades pueden usar un reflector parabólico en forma de paraboloides elíptico. Algunas modalidades pueden usar una pluralidad de piezas reflectoras individuales. Algunas modalidades pueden no usar ningún reflector. Algunas modalidades obtienen iluminación oblicua mediante el uso de fuentes de luz en ángulo que se posicionan para dirigir la luz con o sin asistencia adicional de uno o más reflectores externos.

30 Múltiples longitudes de onda de luz pueden emitirse por una fuente de luz o fuentes de luz, ya sea simultánea o secuencialmente. La modalidad que se ilustra en la Figura 7A muestra las fuentes de energía de excitación 680, 682 y 684 tales como, entre otros, diodos láser en longitudes de onda específicas que se montan para dirigir la luz hacia la muestra en el área de análisis 608. En un ejemplo no limitante para facilitar el empaquetado compacto, las fuentes de energía 680, 682 y 684 pueden dirigir la luz a un elemento dicróico 690 (por ejemplo, un espejo dicróico o un divisor de haz) que luego dirige las longitudes de onda de excitación al área de análisis 608. Las longitudes de onda de excitación hacen que los fluoróforos emitan longitudes de onda de fluorescencia en los marcadores, colorantes u otros materiales de la muestra. Las longitudes de onda de fluorescencia emitidas se canalizan a través del objetivo 670, a través del elemento dicróico 690, a través de una rueda de filtro opcional 692 y hacia un detector 700 tal como, entre otros, un sistema de cámara. A modo de ejemplo no limitante, el elemento dicróico 690 se configura para reflejar longitudes de onda de excitación pero dejar pasar longitudes de onda de fluorescencia y cualquier longitud de onda conveniente para la observación óptica.

45 Se pueden adquirir múltiples longitudes de onda de luz de forma simultánea o secuencial. En una modalidad, todas las longitudes de onda de excitación de fluorescencia iluminan la muestra en el área de análisis 608 simultáneamente. Por ejemplo, un detector 700 puede acoplarse a un procesador programable 710 que puede tomar la señal o imagen capturada y deconstruir las longitudes de onda que se asocian con los fluoróforos que son fluorescentes. En algunas modalidades, las fuentes de excitación pueden iluminar la muestra secuencialmente o en subconjuntos del número total de fuentes de excitación. Por supuesto, debe entenderse que el sistema no se limita a la excitación que se basa en la fluorescencia de fluoróforos en una muestra, y que pueden usarse otras técnicas de detección y técnicas de excitación en lugar de, o en combinación simple o múltiple con fluorescencia. Por ejemplo, algunas modalidades también pueden recopilar información de dispersión de iluminación de campo oscuro de manera simultánea o secuencial en combinación con la detección de fluorescencia.

55 En una modalidad adicional, la iluminación de una muestra se logra durante un período de tiempo al escanear un punto o puntos de luz sobre la muestra (por ejemplo, dentro de un área de análisis 608 o dentro de un ROI dentro, o que comprende, un área de análisis 608). Dicho punto o puntos pueden comprender puntos de luz, o pueden comprender líneas de luz, o pueden comprender otras formas, o pueden comprender combinaciones de las mismas. Dicho escaneo puede ser, por ejemplo, un escaneo de trama (por ejemplo, donde las regiones iluminadas forman una serie de líneas adyacentes (punteadas o discontinuas)), un escaneo rectangular (por ejemplo, donde las regiones iluminadas forman formas cuadradas o rectangulares anidadas delimitadas por líneas (punteadas o discontinuas)), un escaneo en espiral (por ejemplo, donde las regiones iluminadas forman un patrón de línea en espiral (punteada o discontinua)), u otro escaneo de forma o patrón.

65 De manera similar, el examen de una muestra se puede realizar de una vez, o se puede realizar durante un período de tiempo midiendo la luz de un punto o puntos de luz sobre la muestra (por ejemplo, dentro de un área de análisis

- 608 o dentro de una ROI, o que comprende, un área de análisis 608). Dichas mediciones pueden registrarse. Dicho punto o puntos pueden comprender puntos de luz, o pueden comprender líneas de luz, o pueden comprender otras formas, o pueden comprender combinaciones de las mismas. Dicho escaneo puede ser, por ejemplo, un escaneo de trama (por ejemplo, donde las regiones iluminadas forman una serie de líneas adyacentes (punteadas o discontinuas)), un escaneo rectangular (por ejemplo, donde las regiones iluminadas forman formas cuadradas o rectangulares anidadas delimitadas por líneas (punteadas o discontinuas), un escaneo en espiral (por ejemplo, donde las regiones iluminadas forman un patrón de línea en espiral (punteada o discontinua)), u otro escaneo de forma o patrón.
- 5
- 10 Dicho escaneo (ya sea para iluminación, medición o ambos) puede lograrse, por ejemplo, mediante el uso de elementos piezoeléctricos, electromecánicos, hidráulicos u otros conectados operativamente a, por ejemplo, el elemento óptico 690, un espejo o espejos (por ejemplo, un espejo que se asocia con las fuentes de energía de excitación 680, 682 o 684), o con otros reflectores, rejillas, prismas u otros elementos ópticos.
- 15 La luz dispersada por un objeto en una muestra dentro de un portamuestras (por ejemplo, una célula, una perla o un cristal) se dispersará en una pluralidad de ángulos de dispersión, donde un ángulo de dispersión se puede medir con respecto a un rayo de luz incidente que pasa de una fuente de luz al objeto. Dicha pluralidad de ángulos de dispersión comprende una gama de ángulos de dispersión. Dicho portamuestras puede tener características como las que se describen en la presente descripción, y puede configurarse para proporcionar trayectorias para las reflexiones de la luz interna. Una lente de objetivo que se configura para obtener una imagen del objeto reunirá y enfocará la luz dispersada, donde la luz puede pasar a un detector. Dicha luz enfocada por una lente objetivo y enfocada en un detector puede formar un punto de luz en el detector. En modalidades, la luz que pasa desde la lente objetivo al detector puede enfocarse una lente adicional; dicho enfoque puede reducir el tamaño del punto de luz que se forma en el detector. La luz que se enfoca en un detector, pase o no a través de una lente adicional, comprenderá luz que se dispersa en una pluralidad de ángulos de dispersión desde el objeto dentro del portamuestras.
- 20
- 25 Los solicitantes describen en la presente descripción métodos, sistemas y dispositivos (por ejemplo, portamuestras) que permiten la detección de un intervalo más pequeño de ángulos de dispersión de lo que sería posible, proporcionando de esta manera una mayor resolución y una mejor imagen de las muestras y de los objetos dentro de una muestra. Los solicitantes describen en la presente descripción características de diseño para cubetas que pueden usarse para controlar los ángulos y las intensidades de los rayos de luz que inciden sobre la muestra, por ejemplo, a través de PIR y TIR, eficaces para controlar los ángulos en los que se mide la luz dispersa.
- 30
- 35 Debido a las limitaciones que impone la óptica sin imágenes de muchos sistemas (por ejemplo, etendue, o la extensión de la dispersión de la luz que pasa a través del sistema), los ángulos de dispersión de la luz que llega a un detector pueden ser más amplios de lo deseado. Por ejemplo, en algunas combinaciones de cubeta de luz anular que usan LED como fuentes de luz, los rayos de luz que inciden en la muestra pueden dispersarse hasta al menos 20 grados alrededor del ángulo principal. En otras palabras, si el rayo principal incide sobre la muestra a 60 grados, los otros rayos del haz de rayos de luz pueden incidir en la muestra con ángulos de dispersión de aproximadamente 50 grados a aproximadamente 70 grados. Se entenderá que la dispersión del cono de ángulos de dispersión de la luz recopilada por un objetivo depende de la abertura numérica de la lente. En tal caso, la luz recopilada por la lente del objetivo (por ejemplo, que tiene una abertura numérica de 40 grados) estaría en un cono de aproximadamente 30-70 grados. En consecuencia, la luz que se dispersa en una amplia gama de ángulos de dispersión llegará al detector; por ejemplo, dicho sistema medirá toda la luz que dispersa la muestra en un gran cono centrado alrededor de 60 grados +/- 40 grados. Sin embargo, como se describe en la presente descripción, algunas aplicaciones requieren la detección de luz dentro de un intervalo más estrecho de ángulos de dispersión, por ejemplo, dentro de un intervalo muy estrecho de ángulos (por ejemplo 60 +/- 5 grados). Los solicitantes describen en la presente descripción que, para proporcionar mediciones de luz dentro de este intervalo más estrecho, se puede colocar una abertura en el Fourier (o plano focal posterior) de la lente del objetivo (o cualquier plano conjugado con este plano). En el plano de Fourier, la información del ángulo se codifica espacialmente. Por lo tanto, en dependencia de la forma y el tamaño de esta abertura, se puede evitar que la luz proveniente de la muestra en ángulos específicos llegue al detector (por ejemplo, se bloquea o se filtra). Una abertura anular bloqueará o filtrará los ángulos internos (por ejemplo 60 +/- 30 grados). Por lo tanto, la medición resultante se puede adaptar a los ángulos deseados.
- 40
- 45
- 50 En modalidades, se puede proporcionar una abertura a través de la cual pasa la luz de una lente objetivo antes de contactar con un detector. En modalidades, se puede proporcionar una abertura a través de la cual pasa la luz de una lente adicional (después de pasar a través de una lente objetivo) antes de contactar con un detector. Cuando dicha abertura se configura para limitar la luz que pasa a través del detector, la luz que pasa a través se reducirá a luz desde menos ángulos de dispersión, y a luz desde un intervalo más pequeño de ángulos de dispersión, que la luz que pasa a través en la ausencia de dicha abertura. En modalidades, dicha abertura puede comprender un solo orificio, tal como un orificio circular. En modalidades, dicha abertura puede comprender un solo anillo, tal como un anillo circular a través del cual puede pasar la luz, y que tiene un área central (por ejemplo, un área circular) a través de la cual no pasa la luz. En modalidades, dicha abertura puede comprender dos, tres o más anillos concéntricos a través de los cuales puede pasar la luz, y puede incluir un área central (por ejemplo, un área circular) a través de la
- 55
- 60
- 65

cual no pasa la luz. En modalidades, dicha abertura puede comprender una forma distinta de una forma circular o anular.

5 Dicha abertura que se dispone entre un objetivo y un detector, por ejemplo, que se dispone entre una lente adicional y un detector (donde la luz pasa a través de una lente objetivo antes de pasar a través de la lente adicional), proporciona la ventaja de una discriminación más nítida de la luz que se dispersa desde la muestra, mejorando la resolución de las imágenes de dispersión de luz (por ejemplo, imágenes de campo oscuro) que se obtienen de la muestra. En modalidades en las que la intensidad de la luz puede ser un factor, la intensidad de la luz que se aplica (por ejemplo, desde una fuente de luz o desde múltiples fuentes de luz) puede aumentarse en configuraciones que tienen una abertura como se describe en la presente descripción, en comparación con configuraciones que carecen de una abertura como se describe en la presente descripción.

15 Un sistema puede incluir un portamuestras que tenga características como se describen en la presente descripción, y fuentes de luz, espejos dicróicos y otros elementos como se muestra en la Figura 7A. Como se ilustra en la Figura 7B, los sistemas que tienen características similares (por ejemplo, similares a los que se muestran en la Figura 7A y otras figuras de la presente descripción) pueden incluir un portamuestras 600, una fuente de luz 650 (por ejemplo, fuentes de luz 654 o una fuente de excitación 680, o ambos), una lente de objetivo 670, una abertura 694, otra lente 696 y una lente de Fourier 698. Una abertura 694 puede tener un solo paso para permitir que la luz pase a través de un detector 700. Un detector 700 puede vincularse operativamente a un procesador (por ejemplo, un procesador programable) 710. En modalidades, una abertura 694 puede comprender dos pasajes para permitir que la luz pase a través de un detector 700. En modalidades, una abertura 694 puede comprender tres pasajes para permitir que la luz pase a través de un detector 700. En modalidades, una abertura 694 puede comprender cuatro o más pasajes para permitir que la luz pase a través de un detector 700. En modalidades, un pasaje en una abertura 694 puede comprender un orificio circular que permite que la luz pase a través de un detector 700. En modalidades, un pasaje en una abertura 694 puede comprender dos, tres o cuatro o más orificios circulares que permiten que la luz pase a través de un detector 700. En modalidades, un pasaje en una abertura 694 puede comprender un anillo que se configura para permitir que la luz pase a través de un detector 700, y puede incluir una porción central que no permite que la luz pase a través de un detector 700. En modalidades, un pasaje en una abertura 694 puede comprender dos o más anillos (por ejemplo, en modalidades, anillos concéntricos) cada uno de los cuales se configura para permitir que la luz pase a través de un detector 700; y dicha abertura 694 puede incluir una porción central que no permite que la luz pase a través de un detector 700. Dicho anillo, y dichos anillos, pueden tener una forma circular, elíptica o anular.

35 En consecuencia, los solicitantes describen sistemas para obtener imágenes de una muestra, que comprenden: un portamuestras, una fuente de luz para iluminar un objeto contenido dentro de dicho portamuestras, una lente objetivo que se configura para recopilar y enfocar la luz que se dispersa en un objeto contenido dentro de dicho portamuestras, en donde dicha luz dispersada comprende luz que se dispersa en una pluralidad de ángulos de dispersión, una abertura óptica para el paso de la luz desde dicha lente objetivo, y una lente adicional que se configura para enfocar la luz desde dicha lente objetivo hacia dicha abertura óptica, en donde dicha abertura óptica se configura para permitir que solo pase una porción de luz enfocada por dicha lente objetivo a través de la abertura, de manera que dicha porción de luz que se permite pasar a través de dicha abertura consiste en luz que se dispersa en solo una porción de dicha pluralidad de ángulos de dispersión.

45 Como se usa en la presente descripción, los términos "epi" y "epi-iluminación" se refieren a la iluminación de una muestra por luz que viaja en una dirección que generalmente se aleja de un objetivo u otro elemento óptico usado para observar o generar imágenes de la muestra. Por lo tanto, en ausencia de fluorescencia, se forma una imagen de una muestra iluminada por epi-iluminación con la luz que refleja o dispersa la muestra (la luz viaja desde la fuente de luz a la muestra y se refleja o dispersa por la muestra de regreso a los elementos ópticos para observación, formación de imágenes o medición). Como se usa en la presente descripción, los términos "trans" y "trans-iluminación" se refieren a la iluminación de una muestra por la luz que viaja en una dirección que generalmente es hacia un objetivo u otro elemento óptico que se usa para observar o visualizar el objeto (la luz viaja desde la fuente de luz hacia y a través de la muestra, y continúa hacia los elementos ópticos para observación, formación de imágenes o medición). Por lo tanto, en ausencia de fluorescencia, se forma una imagen de una muestra iluminada por trans-iluminación con luz que pasa a través de la muestra o se dispersa por ella.

55 Cuando una fuente de luz se dispone en el mismo lado de una muestra que el objetivo u otros elementos ópticos usados para observar o generar imágenes de una muestra, la luz de la fuente de luz viaja directamente a la muestra y, por lo tanto, la muestra típicamente se observa o se visualiza mediante epi-iluminación. Sin embargo, incluso cuando se coloca una única fuente de luz en el mismo lado de una muestra que el objetivo o los elementos ópticos, un portamuestras como se describe en la presente descripción puede proporcionar trans-iluminación de una muestra además de epi-iluminación. Por lo tanto, se habilitan ambas direcciones de iluminación sin necesidad de colocar fuentes de luz en ambos lados de una muestra. Dicha configuración es compacta, ahorra recursos y, dado que la fuente de luz y otros elementos ópticos se disponen en un solo lado del portamuestras, la configuración permite un acceso sin obstáculos al lado del portamuestras sin interferencia de los elementos ópticos. Por lo tanto, dicha configuración proporciona la ventaja de permitir la carga, mezcla y extracción de una muestra y reactivos en el

portamuestras sin interferencia con las imágenes o mediciones ópticas, o el aparato y los elementos usados para las imágenes o mediciones ópticas.

5 Como ilustran las imágenes que se muestran en las Figuras 4A y 4B, agregar trans-iluminación a las imágenes de campo oscuro mejora en gran medida la imagen y mejora en gran medida la información disponible de la imagen. Los métodos y sistemas que se describen en la presente descripción proporcionan imágenes muy mejoradas mediante la combinación de epi-iluminación y trans-iluminación, mediante el uso de iluminación desde una sola dirección y, en modalidades, desde una sola fuente de luz.

10 Como se describe en la presente descripción, un portamuestras tal como una cubeta 600 (por ejemplo, como se ilustra en las Figuras 8A - 8D) se configura para permitir la reflexión interna de la luz de una fuente de luz (ya sea PIR o TIR), de modo que una muestra contenida en un área de análisis 608 de una cubeta 600 se ilumine con luz directa (epi-iluminación; por ejemplo, luz que viaja a lo largo de la trayectoria 830) y también se ilumine con luz reflejada indirecta (trans-iluminación; por ejemplo, luz que viaja a lo largo de una trayectoria 820 u 825). Como se describe en la presente descripción, la luz procedente de una fuente de luz que se dispone en el mismo lado de una cubeta 600 que los elementos ópticos 670, 690, 700, etc., puede proporcionar tanto epi-iluminación como trans-iluminación de una muestra.

20 Con referencia ahora a las Figuras 8A - 8D, ahora se describirá otra modalidad más. Las Figuras 8A - 8D muestran un esquema de una sección transversal de una porción de una cubeta 600 y la fuente de iluminación de dispersión de campo oscuro tal como, entre otras, la luz anular 650 que se muestra en las Figuras 6A y 6B. El soporte base 620 también se muestra en las Figuras 8A - 8D. Las Figuras 8A - 8D incluyen corchetes y flechas para indicar estructuras o porciones de estructuras; por ejemplo, el corchete etiquetado como 600 indica la cubeta 600 completa que se muestra en la figura; el corchete etiquetado como 612 indica la porción de cubierta 612 de la cubeta 600. Las flechas 25 621 a 626 en la Figura 8A indican las dimensiones de las porciones indicadas de la porción de cubierta 612. Se entenderá que estas dimensiones pueden variar en diferentes modalidades de una cubeta 600, y que dichas variaciones pueden depender del tamaño, la aplicación, los materiales, las longitudes de onda ópticas, las muestras y otros elementos y factores que se relacionan con la construcción y el uso de una cubeta. 600. Por ejemplo, en modalidades, la distancia 621 entre las estructuras de soporte 604 puede estar entre aproximadamente 0,1 milímetro (mm) a aproximadamente 1 centímetro (cm), y en modalidades puede estar entre aproximadamente 1 mm a aproximadamente 100 mm, o entre aproximadamente 1,5 mm a aproximadamente 50 mm, o entre aproximadamente 2 mm a aproximadamente 20 mm. En modalidades adicionales, la distancia 621 entre las estructuras de soporte 604 puede estar entre aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 10 mm, o entre aproximadamente 1 mm a aproximadamente 5 mm. En modalidades, la altura 622 de una estructura de soporte 604 puede estar entre aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 100 mm, o entre aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 50 mm, o entre aproximadamente 1 mm a aproximadamente 25 mm. En modalidades adicionales, la altura 622 de una estructura de soporte 604 puede estar entre aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 10 mm, o entre aproximadamente 1 mm a aproximadamente 5 mm. De manera similar, en modalidades, la altura 623 de un área de grosor controlado 613 puede estar entre aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 100 mm, o entre aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 50 mm, o entre aproximadamente 1 mm a aproximadamente 25 mm. En modalidades adicionales, la altura 623 de un área de grosor controlado 613 puede estar entre aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 10 mm, o entre aproximadamente 1 mm a aproximadamente 5 mm. En modalidades, el grosor 624 de una capa 800 puede estar entre aproximadamente 0,01 mm a aproximadamente 10 mm, o entre aproximadamente 0,05 mm a aproximadamente 1 mm, o entre alrededor de 0,1 mm y alrededor de 0,5 mm. En modalidades, el ancho 625 de un área de análisis 608 puede estar entre aproximadamente 0,05 mm a aproximadamente 100 mm, o entre aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 50 mm, o entre aproximadamente 1 mm a aproximadamente 25 mm. En modalidades adicionales, el ancho 625 de un área de análisis 608 puede estar entre aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 10 mm, o entre aproximadamente 1 mm a aproximadamente 5 mm. En modalidades, el ancho 626 de una estructura de soporte 604 puede estar entre aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 100 mm, o entre aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 50 mm, o entre aproximadamente 1 mm a aproximadamente 25 mm. En modalidades adicionales, el ancho 626 de una estructura de soporte 604 puede estar entre aproximadamente 0,05 mm a aproximadamente 10 mm, o entre aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 5 mm.

55 Se entenderá que los componentes ópticos y las disposiciones para la iluminación, la excitación, la observación de la emisión y similares, como se ilustra en cualquiera de las figuras de la presente descripción, pueden sugerir componentes y disposiciones que pueden aplicarse en modalidades de otras figuras, incluso si dichos componentes o disposiciones particulares no se muestran explícitamente en cada figura. Por ejemplo, aunque una luz anular 650 u otra fuente de iluminación 650 no se incluye en la Figura 8D, en cualquiera de las modalidades que se muestran, y en otras modalidades, una luz anular 650 u otra fuente de iluminación 650 (ver, por ejemplo, las Figuras 8A, 8B, y 8C) puede usarse para iluminar el área de análisis 608 (el área de análisis 608 se muestra en las Figuras 8A y 8B). Como ejemplos de componentes ópticos que son adecuados para su uso con una cubeta 600, los componentes de luz anular 652 y 654 se muestran en las Figuras 8A, 8B y 8D; en modalidades, se pueden usar otros, u otros números de, componentes de iluminación. Por ejemplo, la fuente de luz 654 puede ser luz blanca o fuentes de luz tales como, entre otros, diodos emisores de luz (LED) o diodos láser con salida de longitud de onda específica o intervalos de salida. Opcionalmente, el anillo de fuente de luz 654 podría ser un cable de fibra óptica que se

configura para proporcionar una luz anular (por ejemplo, con muchos empalmes). Opcionalmente, la fuente de luz 654 puede ser un LED que tiene un ángulo de divergencia estrecho específico controlado por el reflector. Puede ser conveniente controlar el ángulo de divergencia de una luz anular mediante la selección de la fuente de luz o mediante el diseño del reflector.

5 A modo de ejemplo no limitante, una fuente de luz 654 puede usar iluminación láser para proporcionar un patrón de luz estrecho, lo que da como resultado un fondo de trans-iluminación más bajo en la configuración de iluminación de estilo epi actual (donde los componentes de iluminación están todos en un lado de la muestra) porque la fuente de luz: proporciona un punto estrecho de luz (dirigido dentro del área de análisis de muestra 608); proporciona luz de ancho espectral estrecho (por ejemplo, luz de longitudes de onda dentro de un intervalo estrecho que se centra alrededor de una longitud de onda principal particular); y es una fuente coherente. Opcionalmente, el uso de un LED como fuente de iluminación 654 también puede proporcionar un tamaño de punto pequeño (por ejemplo, un tamaño de punto pequeño dentro de un área de análisis 608) y así proporcionar algunas de las propiedades beneficiosas que logra una fuente de luz láser. Por estas y otras razones, una fuente de luz láser (o un LED que proporciona un tamaño de punto pequeño) es eficaz para reducir los niveles de señal de fondo en comparación con otras configuraciones de iluminación. La iluminación láser puede reducir la luz que se dispersa en comparación con lo que típicamente ocurre con fuentes de luz más difusas y, por lo tanto, puede reducir el fondo en un canal (por ejemplo, dentro de una primera área de análisis 608) al reducir la luz que se dispersa en ese canal desde un canal adyacente (por ejemplo, desde una segunda área de análisis adyacente 608). Por lo tanto, la iluminación láser puede dar como resultado menos fondo de trans-iluminación de lo que se esperaría de la iluminación por fuentes de luz más difusas. Por supuesto, es conveniente que la disminución de la trans-iluminación sea menor que la disminución del fondo, donde la caída más significativa del fondo da como resultado una señal más distinguible. Opcionalmente, el uso de un LED como fuente de iluminación 654 proporciona un patrón de luz difuso, con mayor fondo y mayor trans-iluminación. Por supuesto, es conveniente que el aumento de la trans-iluminación sea mayor que el aumento del fondo.

Algunas modalidades de cubetas pueden incluir cubetas que se forman a partir de una pluralidad de capas individuales que se adhieren entre sí, con la cubeta que se moldea a partir de uno o más materiales, o con capas reflectantes que se añaden a la cubeta en diferentes superficies para mejorar las reflexiones internas únicas o múltiples (por ejemplo, para mejorar la TIR o PIR).

En modalidades, los sistemas, cubetas y elementos ópticos que se describen en la presente descripción pueden funcionar en combinación con fluorescencia, puede ser conveniente que la iluminación de campo oscuro usada con dichos sistemas y cubetas no sea iluminación de luz blanca. Sin embargo, algunas modalidades pueden usar solo luz blanca, por ejemplo, si la detección de fluorescencia no se usa en combinación con microscopía de campo oscuro o de campo claro.

Las Figuras 8A y 8B muestran que, en algunas modalidades, el dispositivo puede tener capas en la cubeta 600 que son ópticamente no transmisivas, tal como la capa 800. Esto puede ser útil en modalidades donde la fuente de luz 654 es difusa y la luz no se dirige a ubicaciones específicas. La capa 800 puede bloquear la luz que no entra en la cubeta 600 en los ángulos o lugares deseados. La capa 800 se puede configurar para que se posicione para evitar la iluminación, excepto a través del área debajo de las áreas de análisis 608. Algunos pueden tener solo áreas específicas que están oscuras cerca de las áreas de análisis 608. Algunas modalidades pueden tener material oscurecido o no transmisor en más de una capa. Algunos pueden tener material oscurecido o no transmisor en diferentes orientaciones, tales como, entre otros, uno horizontal y otro vertical o no horizontal.

Se entenderá que, en las modalidades, una capa 800 puede ser ópticamente transmisiva. Por ejemplo, la Figura 8D presenta una modalidad en la que una capa 800 es ópticamente transmisiva. En algunas modalidades, una capa 800 puede comprender un material ópticamente transmisor que tiene un índice de refracción que es diferente al índice de refracción de un área de grosor controlado 613, o de un soporte base 620, o de ambos. En algunas modalidades, una capa 800 puede comprender un material ópticamente transmisor que tiene un índice de refracción que es el mismo que el índice de refracción de un área de grosor controlado 613, o de un soporte base 620, o de ambos.

En las Figuras 8A, 8B y 8C, se muestra una fuente de luz que se ubica debajo de una cubeta 600 (cerca de las ópticas 652 y 654) y proporciona luz que se dirige desde debajo de la porción de la base 606. Dicha fuente de luz puede entenderse que está en su lugar también en el ejemplo que se ilustra en la figura 8D. Como se muestra en estas figuras, una fuente de luz 650 puede incluir una luz anular 654 y un reflector toroidal 652. Pueden incluirse otros elementos, incluidos, sin limitación, lentes, filtros, rejillas, espejos y otras superficies reflectantes, fibras ópticas, prismas y otros elementos. En modalidades, una fuente de luz puede comprender un láser, un LED u otra fuente de luz; y puede comprender una fibra óptica que transporta la luz desde dicha fuente a otro lugar, o que dirige la luz hacia un elemento óptico. Un criterio de diseño para los sistemas ópticos es la divergencia, o ángulo de divergencia, de la luz desde la fuente de luz; un haz de luz de ancho D con baja divergencia proporciona un punto más pequeño a una distancia dada de la fuente que un haz de luz de ancho D con alta divergencia. En general, se prefiere una fuente de luz 650 que proporcione luz con baja divergencia. Dichos elementos ópticos y configuraciones pueden diseñarse para proporcionar luz que está sustancialmente colimada, por ejemplo, la mayor parte o toda la luz se

dirige a lo largo de trayectorias sustancialmente paralelas hacia la muestra (por ejemplo, hacia un área de análisis 608). Sin embargo, en las modalidades en las que se prefiere la luz difusa o dispersada, se puede usar una fuente de luz 650 con alta divergencia.

5 Como se muestra en la Figura 8C, una modalidad de un sistema óptico adecuado como parte del dispositivo o sistema como se describe en la presente descripción puede incluir elementos ópticos (por ejemplo, una fuente de luz 650, por ejemplo, como se muestra en la Figura 8C como una luz anular 654, y un objetivo 670), una cubeta 600 y un soporte base 620 que se configura para sujetar y posicionar una cubeta para formación de imágenes. En las modalidades que se muestran en la Figura 8C, un soporte de base 620 puede incluir características ópticas 802 que se configuran para refractar (o difractar, o de otro modo alterar la trayectoria de) la luz de una fuente de luz 650. Como se ilustra en la figura 8C, las características ópticas 802 pueden comprender una serie de lentes. Se entenderá que las características ópticas 802 pueden comprender cualquier característica óptica adecuada. En modalidades, las características ópticas 802 pueden comprender lentes, rejillas de difracción, lentes de Fresnel, convexidades, concavidades u otras formas y características que pueden refractar, difractar o de cualquier otra manera alterar la luz, o combinaciones de las mismas. En modalidades, dichas características ópticas 802 pueden comprender un material diferente al del soporte base 620 y pueden tener un índice de refracción diferente al del soporte base 620. Por ejemplo, la luz afectada por las características ópticas 802 puede dirigirse hacia un área de análisis 608, ya sea directamente o indirectamente a través de la reflexión (por ejemplo, reflexión interna) adecuada para su uso en los métodos que se describen en la presente descripción, por ejemplo, para proporcionar epi-iluminación y trans-iluminación de una muestra en un área de análisis 608. Como se ilustra en la modalidad que se muestra en la Figura 8C, dichas modalidades también pueden incluir una trayectoria de luz que pasa por alto las características ópticas 802. Una trayectoria de luz de este tipo puede ser más adecuada para obtener imágenes de una muestra dentro de un área de análisis 608 que las trayectorias que requerirían imágenes a través de una característica óptica 802. En las modalidades, ambos tipos de trayectorias de luz (es decir, sin pasar por las características ópticas 802 y pasando a través de las características ópticas 802) se pueden proporcionar al mismo tiempo, proporcionando así una óptica adecuada para el análisis de imágenes de una muestra iluminada tanto por epi-iluminación como por trans-iluminación de una fuente de luz que se ubica en el mismo lado de una cubeta 600 que una fuente de luz 650.

30 La cubeta 600 incluye características que afectan la trayectoria de la luz que ilumina la cubeta y la muestra dentro de la cubeta. Dicha trans-iluminación puede efectuarse mediante luz que se refleja dentro de una cubeta 600, por ejemplo, por reflexión interna, incluyendo o principalmente por reflexión interna parcial (PIR) o reflexión interna total (TIR) desde, por ejemplo, una superficie 612, una superficie 604, u otras superficies o combinaciones de superficies. Otros ejemplos de trayectorias de luz que se someten a TIR se muestran, por ejemplo, en las Figuras 8A, 8B y 8D.

35 Como se ilustra en la Figura 8D, en modalidades, una cubeta 600 de un sistema óptico de un dispositivo o sistema como se describe en la presente descripción, y adecuado para su uso en los métodos que se describen en la presente descripción, puede incluir características que afectan la trayectoria de la luz que ilumina las porciones internas de la cubeta 600, tal como la luz que ilumina un área de análisis 608, y la muestra dentro de un área de análisis 608 de una cubeta 600. Como se muestra en la Figura 8D, una capa 800 puede incluir características que refractan, difractan o afectan o alteran de otro modo la trayectoria de la luz que ingresa al área de análisis 608. Dicha alteración de las trayectorias de la luz puede afectar y puede mejorar la iluminación de la muestra dentro de un área de análisis 608. En el ejemplo que se muestra en la figura 8D, la luz entra en la capa 800 desde una dirección transversal; las trayectorias de luz se alteran por la forma (y las propiedades del material) de la capa 800 y se dirigen según se desee al área de análisis 608. Por ejemplo, una superficie externa de una capa 800 puede ser plana (por ejemplo, la superficie externa 674) o puede ser curva (por ejemplo, la superficie externa 676). Por ejemplo, una superficie interna de una capa 800 puede ser plana (no se muestra en la Figura 8D; ver, sin embargo, dichas superficies en las Figuras 8A y 8B (aunque las capas 800 en las Figuras 8A y 8B no son transmisivas ópticamente, estas superficies se muestran como planas)) o puede ser curva (por ejemplo, la superficie interna 678 que se muestra en la Figura 8D). En las modalidades, dicha alteración de las trayectorias de la luz es eficaz para proporcionar tanto la epi-iluminación como la trans-iluminación de las muestras en un área de análisis 608.

Las Figuras 8A, 8B, 8C y 8D ilustran las trayectorias de luz dentro de un portamuestras que proporcionan ejemplos de TIR y PIR dentro de una porción de cubierta 612 en una superficie superior 614 o en la superficie 618 en una estructura de soporte 604. Un portamuestras, tal como una cubeta 600, puede tener una superficie ópticamente transmisiva a través de la cual puede pasar la luz; en modalidades, dicha superficie ópticamente transmisiva puede permitir que la luz pase sin una distorsión o disminución significativa en la intensidad de la luz. Un portamuestras, tal como una cubeta 600, puede hacerse de material ópticamente transmisivo, efectivo para que la luz pueda pasar dentro del portamuestras. En modalidades en las que un portamuestras se hace al menos parcialmente de material ópticamente transmisivo, la luz puede pasar a través de una superficie ópticamente transmisiva de un portamuestras y puede viajar dentro del portamuestras. En modalidades, la luz que viaja dentro de un portamuestras puede reflejarse en una o más superficies y viajar a lo largo de una trayectoria de reflexión dentro de un portamuestras. Cuando la luz de una fuente de luz que se dispone fuera de un portamuestras ingresa a un portamuestras a través de una superficie ópticamente transmisiva de un portamuestras, dicha luz puede viajar dentro del portamuestras alejándose de la fuente de luz y puede reflejarse en una superficie del portamuestras, de modo que la luz reflejada

pueda viajar en una dirección hacia la fuente de luz después de reflejarse. Dichas reflexiones pueden ser por PIR o TIR.

Es decir, la luz que pasa dentro de una cubeta 600 puede reflejarse en una superficie (por ejemplo, una superficie 614 o una superficie 618 como se muestra en las Figuras 8A y 8B). Dichas reflexiones internas pueden ser efectivas para iluminar una muestra dentro de un área de análisis 608 con luz indirecta; en combinación con la iluminación directa (donde la luz no se refleja antes de incidir en una muestra), la muestra puede recibir así epi-iluminación (iluminación desde el mismo lado que los elementos de detección óptica) y trans-iluminación (iluminación desde el lado opuesto a los elementos de detección óptica). Cuando una superficie 614, o una superficie 618, o ambas, se configuran para absorber luz (por ejemplo, se pintan o recubren de negro), se puede usar una fuente de epi-iluminación sola para proporcionar imágenes de campo oscuro. Cuando una superficie 614 o una superficie 618, o ambas, se configuran para dispersar la luz (por ejemplo, no están pulidas o tienen superficies rugosas), se puede usar una fuente de epi-iluminación sola para proporcionar dicha luz dispersa adecuada para obtener imágenes de campo brillante.

Se entenderá que las longitudes de onda de la luz, el material, las superficies y las configuraciones que promueven o mejoran la PIR pueden no ser adecuados o efectivos para promover o mejorar la TIR. Se entenderá que las longitudes de onda de la luz, el material, las superficies y las configuraciones que promueven o mejoran la TIR pueden no ser adecuados o efectivos para promover o mejorar la PIR. Así, existen diseños y construcciones donde se puede promover uno u otro de PIR y TIR, en ausencia del otro. En modalidades, hay diseños y construcciones en los que se pueden promover tanto PIR como TIR. En modalidades, hay diseños y construcciones en los que no se promueven ni PIR ni TIR.

Como se ilustra en la Figura 8A, las estructuras de soporte 604 pueden tener secciones transversales rectangulares o cuadradas. Se entenderá que una estructura de soporte 604 puede tener una forma de sección transversal que no sea cuadrada o rectangular; por ejemplo, como se muestra en la Figura 8B, una estructura de soporte 604 puede tener una forma de sección transversal triangular; otras formas de sección transversal (por ejemplo, redondeadas o semicirculares, dentadas o irregulares) también pueden ser adecuadas para su uso con los sistemas y cubetas que se describen en la presente descripción. PIR y TIR son características ajustables que se pueden seleccionar en base al material usado para la cubeta 600, cualquier recubrimiento, o revestimiento aplicado, y la geometría o grosor del área de grosor controlado 613 de la cubeta 600. En modalidades, se puede preferir PIR, y se pueden seleccionar la luz, los materiales y las configuraciones para mejorar PIR.

En modalidades, se puede preferir TIR. En modalidades, la longitud de onda o las longitudes de onda de la luz de una fuente de luz 650 pueden seleccionarse para mejorar la TIR. En modalidades, el material, el grosor, la configuración de la superficie y otras características de una cubeta 600 pueden seleccionarse para mejorar la TIR. Por ejemplo, la altura (medida desde la base de la porción de cubierta 612 en contacto con la capa 800) del área de grosor controlado 613 afectará el ángulo y la intensidad de la luz reflejada por TIR que llega al área de análisis 608. Es conveniente la configuración de una cubeta 600 para permitir TIR de luz dentro de la cubeta que permite la iluminación de ángulo oblicuo de una muestra (iluminación procedente de encima de la muestra), particularmente para microscopía de campo oscuro. En algunas modalidades, es conveniente maximizar la TIR desde arriba de la muestra. Opcionalmente, en algunas modalidades, una cubeta 600 puede configurarse para proporcionar TIR solo desde superficies sobre las áreas de análisis 608. Opcionalmente, algunas modalidades pueden configurarse para proporcionar TIR solo desde superficies sobre el área de grosor controlado 613 (por ejemplo, en las modalidades que se muestran en las Figuras 8A y 8B, generalmente sobre el área de análisis 608). Opcionalmente, en algunas modalidades, una cubeta 600 puede configurarse para proporcionar TIR de luz desde otras superficies en la cubeta 600; por ejemplo, se puede proporcionar TIR de luz de otras superficies en la cubeta 600 para dispersar la luz en ángulos oblicuos, de forma que la luz se dirija de nuevo al área de análisis 608.

El diseño y los materiales usados para construir una cubeta 600 pueden seleccionarse y configurarse para proporcionar TIR de luz. Por ejemplo, en algunas modalidades, las configuraciones que proporcionan TIR, o que proporcionan cantidades aumentadas o mejoradas de TIR, incluyen, sin limitación: configuraciones en las que las dimensiones del área de grosor controlado 613 son compatibles con, o promueven, TIR; configuraciones en las que el ángulo o ángulos de una superficie 614 o una superficie 618 (por ejemplo, con respecto a la luz incidente) son compatibles con, o que promueven, TIR; configuraciones en las que la forma, la textura o el recubrimiento de una superficie 614 o una superficie 618 es compatible con, o promueve, TIR; configuraciones en las que la diferencia entre el índice de refracción del material que forma un área de grosor controlado 613 y el del material o espacio en contacto con una superficie 614 que forma un límite de un área de grosor controlado 613 es compatible con, o que promueve, TIR; configuraciones en las que la diferencia entre el índice de refracción del material que forma una estructura de soporte 604 y el del material o espacio en contacto con una superficie 618 que forma un límite de una estructura de soporte 604 es compatible con, o que promueve, TIR; y otras configuraciones y diseños. Para mejorar la TIR, el primer material, dentro del cual la luz se va a reflejar (internamente), debe tener un índice más alto que el del segundo material al que pasaría la luz si no se reflejara internamente; dado que este segundo material suele ser aire, con un índice de refracción cercano a 1, esto no suele ser difícil de asegurar. El ángulo de incidencia debe ser mayor que el ángulo crítico para proporcionar TIR. Por ejemplo, con referencia a las modalidades que se muestran en la Figura 8, los materiales que componen el área de grosor controlado 613 y las estructuras 604 (por ejemplo, las

regiones fuera de las superficies 614 y 618) deben tener un índice de refracción mayor que el del aire. En las modalidades donde es conveniente TIR dentro de una capa 800, el material de la capa 800 debe tener un índice de refracción más bajo que el del área de grosor controlado 613 para garantizar que se produzca TIR en las paredes que se ilustran en las Figuras 8A, 8B y 8D. En modalidades alternativas, el material de una capa 800 puede tener un índice de refracción mayor que el índice de refracción del material del área de grosor controlado 613, lo que creará TIR en ese límite (entre una capa 800 y un área de grosor controlado 613) de manera que los ángulos y materiales pueden ajustarse para optimizar el componente de trans-iluminación de la luz que se dirige a una muestra en un área de análisis 608.

En modalidades, una superficie 614 o 618 puede recubrirse o tratarse para afectar o reducir la reflectancia (ya sea PIR o TIR) en la superficie. En modalidades, una superficie 614 o 618 puede recubrirse o tratarse para reducir la fuga de luz fuera de la superficie. Por ejemplo, incluso cuando una superficie 614 o 618 es compatible con, o mejora la cantidad de TIR, parte de la luz también puede transmitirse o refractarse fuera de la superficie 614 o 618. Se puede colocar o aplicar un recubrimiento o material absorbente de luz a dicha superficie 614 o 618, o a una porción o porciones de la misma, para reducir la cantidad de luz parásita que se escapa de una cubeta 600. Dicho recubrimiento absorbente de luz puede ser, por ejemplo, un colorante, una tinta, una pintura, un tratamiento de superficie, una cinta negra o de color u otro recubrimiento o tratamiento de superficie. En modalidades, un material sólido absorbente de luz negro u otro puede colocarse contra una superficie 614 o 618 o junto a ella para proporcionar una superficie ópticamente absorbente.

Opcionalmente, en algunas modalidades, una cubeta 600 puede configurarse para no proporcionar TIR de luz (o para proporcionar solo cantidades insignificantes de TIR), o para no proporcionar PIR (o solo cantidades insignificantes de PIR), de una porción, o porciones, de la cubeta. Por ejemplo, en algunas modalidades, una cubeta 600 puede configurarse para no proporcionar TIR o PIR de luz (o para proporcionar solo cantidades insignificantes de TIR o PIR) desde las estructuras de soporte 604. Opcionalmente, en algunas modalidades, una cubeta 600 puede configurarse para no proporcionar TIR o PIR de luz (o para proporcionar solo cantidades insignificantes de TIR o PIR) desde una superficie 618. Las configuraciones que no proporcionan TIR o PIR, o que solo proporcionan cantidades insignificantes de TIR o PIR, incluyen, sin limitación: configuraciones en las que las dimensiones del área de grosor controlado 613 son incompatibles con, o no promueven, TIR o PIR; configuraciones en las que el ángulo o ángulos de una superficie 614 o una superficie 618 (por ejemplo, con respecto a la luz incidente) son incompatibles con, o no promueven, TIR o PIR; configuraciones en las que la forma, textura o recubrimiento de una superficie 614 o una superficie 618 es incompatible con, o no promueve, TIR o PIR; configuraciones en las que la diferencia entre el índice de refracción del material que forma un área de grosor controlado 613 y el del material o espacio en contacto con una superficie 614 que forma un límite de un área de grosor controlado 613 es incompatible con, o no promueve, TIR o PIR; configuraciones en las que la diferencia entre el índice de refracción del material que forma una estructura de soporte 604 y el del material o espacio en contacto con una superficie 618 que forma un límite de una estructura de soporte 604 es incompatible con, o no promueve, TIR o PIR; y otras configuraciones y diseños.

Opcionalmente, en algunas modalidades, se puede colocar o unir un material reflectante a una superficie 614 o una superficie 618. Dicho material reflectante puede ser, por ejemplo, un metal tal como plata, oro o aluminio; puede ser un dieléctrico, tal como magnesio o fluoruro de calcio, u otra sal u óxido metálico; u otro material reflectante. Típicamente, un recubrimiento reflectante de este tipo puede ser muy delgado (por ejemplo, puede tener menos de aproximadamente 0,1 micras o puede tener un grosor de hasta aproximadamente 100 micras). Opcionalmente, un material reflectante (por ejemplo, un recubrimiento reflectante) puede colocarse o unirse a la superficie 614 solamente. Opcionalmente, se puede colocar un material reflectante en, o unirse a, solo la superficie 618. Opcionalmente, la superficie 618 se puede tratar para que sea negra para que absorba la luz. En otras modalidades, una superficie 614 se puede tratar para que sea negra para que absorba la luz. Algunas modalidades pueden seleccionar el ancho del área de grosor controlado 613 para que sea más ancho que el área de análisis 608. Para algunas modalidades que usan iluminación láser, la capa 800 puede eliminarse o transmitir luz ya que la iluminación láser se enfoca lo suficientemente para no requerir oscurecimiento entre las áreas de análisis 608.

A modo de ejemplo y no de limitación, el uso de PIR, TIR, o ambos, también puede permitir que la luz que viaja a lo largo de la trayectoria 820 desde áreas adyacentes se dirija al área de análisis 608. Como se muestra en las Figuras 8A, 8B y 8D, la luz que viaja a lo largo de la trayectoria 820 se refleja hacia el área de análisis 608, y la luz que viaja a lo largo de la trayectoria 825 experimenta múltiples reflexiones mientras viaja dentro de la cubeta 600 y finalmente al área de análisis 608. Como se muestra, la luz que viaja a lo largo de la trayectoria 820 en la Figura 8B experimenta múltiples reflexiones mientras viaja dentro de la cubeta 600 y finalmente al área de análisis 608. Como se ilustra en la Figura 8B, dichas reflexiones pueden ser PIR o TIR. Según la terminología tradicional, la iluminación que se muestra en la Figura 8A por la luz que viaja a lo largo de las trayectorias 820 y 825, y la iluminación que se muestra en la Figura 8B por la luz que viaja a lo largo de la trayectoria 820, es trans-iluminación. La iluminación que se muestra en las Figuras 8A y 8B por la luz que viaja a lo largo de las trayectorias 830 muestra la luz que proviene directamente de la luz anular y no en forma de TIR: esto es epi-iluminación. La combinación de ambos tipos de componentes de luz de una fuente de luz que se ubica debajo de la muestra (o solo un lado de la muestra) permite un rendimiento mejorado en comparación con las fuentes que solo pueden proporcionar uno de esos componentes de iluminación. Esto es particularmente útil para la microscopía de campo oscuro.

Un ejemplo no limitante del uso de las modalidades que se muestran en las Figuras 8A-8D es la iluminación de campo oscuro para medir las propiedades de dispersión de las células en la muestra. La microscopía de campo oscuro es un método establecido que se ha usado principalmente como técnica de mejora del contraste. En la microscopía de campo oscuro, el fondo de la imagen es completamente oscuro ya que solo se obtiene la imagen de la luz dispersada o reflejada por la muestra. La microscopía de campo oscuro cuantitativa no se ha usado para medir las propiedades de dispersión de las células de una manera comparable al uso del parámetro tradicional de "dispersión lateral" en los citómetros de flujo.

Desde la perspectiva del hardware, se desea que la iluminación para la microscopía de campo oscuro sea oblicua, es decir, ningún rayo de luz de la fuente de luz de iluminación debería poder entrar en el objetivo sin hacer contacto primero con la muestra. A modo de ejemplo y no de limitación, la iluminación debe ser a una longitud de onda que no excite ningún otro fluoróforo ya presente en la muestra. Opcionalmente, esta iluminación permite el uso de lentes de alta abertura numérica (NA) para obtener imágenes. A modo de ejemplo y no de limitación, para tamaños de lentes tradicionales asociados con microscopios ópticos, la NA puede ser al menos de aproximadamente 0,3. Opcionalmente, la NA es al menos 0,4. Opcionalmente, la NA es al menos 0,5. Opcionalmente, algunas modalidades pueden usar lentes de objetivo de inmersión en aceite para obtener una AN deseada, particularmente cuando el tamaño de la lente se limita por debajo de un cierto nivel.

Los métodos tradicionales para la iluminación de campo oscuro han usado la trans-iluminación, donde la muestra se encuentra entre la lente de imagen y la fuente de luz de campo oscuro. Así, en esta disposición tradicional, los componentes de detección e iluminación no están en el mismo lado de la muestra. Los métodos tradicionales de epi-iluminación (donde la lente/objetivo de imagen y la fuente de luz están en el mismo lado de la muestra) requieren el uso de objetivos fabricados especialmente y, típicamente, no permiten el uso de objetivos de AN alto, lo que limita las capacidades de todo el sistema

Por el contrario, al menos algunas modalidades de los sistemas de iluminación de campo oscuro que se describen en la presente descripción tienen los siguientes atributos. En términos de hardware, el esquema de las modalidades de las Figuras 8A - 8D es "epi" en el sentido de que la luz anular usada para la iluminación de campo oscuro está en el mismo lado de la muestra que el objetivo. Esto puede ser conveniente desde la perspectiva del sistema, aunque se pueden usar modalidades alternativas con fuentes de luz en el otro lado solas o en combinación con las modalidades que se describen en la presente descripción. En un ejemplo no limitante, la luz anular se diseña de manera que los LED o láseres de la fuente de luz 654 están todos en el mismo plano y tienen la misma orientación (fuentes de luz en el mismo plano horizontal y que dirigen la luz hacia arriba). Algunas modalidades pueden tener luz en el plano de la muestra pero que dirigen la luz de una manera no paralela, tal como, pero sin limitarse a, una forma de cono. Algunas modalidades pueden tener luz en diferentes planos pero que dirigen la luz en la misma orientación. Algunas modalidades pueden tener luz en diferentes planos pero que dirigen la luz de una manera no paralela, tal como, pero sin limitarse a, una forma de cono. En algunas modalidades, la luz se refleja en un espejo toroidal 652 para lograr una iluminación oblicua de la muestra.

Además de las propiedades ópticas de la luz anular y el reflector toroidal, las propiedades ópticas de la cubeta 600 que se muestra en las modalidades de las Figuras 8A-8D también afectan significativamente la iluminación de campo oscuro. En esta modalidad, la cubeta de citometría 600 se diseña de tal manera que la luz proveniente de la luz anular 650 cae directamente sobre la muestra; pero además de esto, la luz también se "refleja" en la muestra desde las características de la cubeta para emular la iluminación "trans". Esta reflexión puede ser a modo de TIR o reflexión verdadera.

Debe señalarse que cualquier esquema de trans-iluminación permite medir la luz que se dispersa hacia adelante de una muestra, mientras que un esquema epi permite medir solo la luz que se dispersa hacia atrás de la muestra. La luz que se dispersa hacia adelante es generalmente dos órdenes de magnitud mayor en intensidad que la luz que se dispersa hacia atrás. Por lo tanto, el uso de la trans-iluminación permite el uso de intensidades de iluminación mucho más bajas y reduce los efectos secundarios dañinos en la muestra.

Como se ve en la modalidad de la Figura 8A, la luz anular 650 (u otra fuente de iluminación) y la cubeta 600 proporcionan un sistema que se puede ajustar de modo que las intensidades de la trans-iluminación y epi-iluminación se ajusten para mejorar el rendimiento con respecto a la epi-iluminación tradicional. De manera similar, la luz anular 650 (u otra fuente de iluminación) y la cubeta 600 proporcionan un sistema en la modalidad de la Figura 8B que se puede ajustar de manera que las intensidades de la trans-iluminación y la epi-iluminación se ajusten para mejorar el rendimiento sobre la epi-iluminación tradicional. Este ajuste se puede lograr en virtud de los materiales que se eligen (por ejemplo, por sus propiedades ópticas) y el diseño de la geometría de la cubeta para controlar los ángulos y la extensión de la reflexión interna total.

Como se muestra en la Figura 8C, las características 802 pueden alterar la trayectoria de la luz incidente y, por tanto, usarse para mejorar tanto la trans-iluminación como la epi-iluminación. Como se muestra en la Figura 8D, la forma y configuración de las superficies 674, 676 y 678 pueden alterar la trayectoria de la luz incidente (por ejemplo, iluminación transversal) y, por lo tanto, usarse para proporcionar o mejorar la trans-iluminación, la epi-iluminación o ambas.

La Figura 8E proporciona una representación esquemática del transporte de una cubeta 600 desde una ubicación de preparación de muestras hasta una ubicación de observación de muestras cerca de un detector óptico D. Como se indica en la figura, un portamuestras 600 se puede mover de una ubicación a una ubicación adyacente a, o en, un detector D. Un detector D puede incluir una platina que se configura para recibir, sostener y posicionar una cubeta 600. La muestra se puede agregar al portamuestras a través de los puertos de entrada 602 (por ejemplo, se muestran seis puertos de entrada 602 en el ejemplo que se muestra en la Figura 8E), y luego puede estar en una posición para observación óptica y medición dentro de un área de análisis 608 (no se muestra, como interior de las superficies (por ejemplo, de una estructura de soporte 604)) de la cubeta 600 que se muestra en la Figura 8E. La muestra contenida dentro de un área de análisis 608 puede iluminarse y puede ser detectada por un detector D. En modalidades, un detector D puede configurarse para realizar observaciones o imágenes cualitativas, y en modalidades, un detector D puede configurarse para realizar observaciones cuantitativas o imágenes.

Un detector D como se muestra en la Figura 8E puede comprender, o ser parte de, una unidad de citometría o un módulo de citometría. Dicha unidad de citometría o módulo de citometría puede comprender una unidad o módulo independiente para el análisis de muestras. En modalidades, otras capacidades y dispositivos de análisis pueden incluirse en un detector D, o pueden alojarse junto con, o pueden configurarse para su uso junto con, un detector D. En modalidades, los sistemas para el análisis de muestras como se describe en la presente descripción pueden comprender una unidad de citometría o módulo de citometría de este tipo, por ejemplo, que comprende un detector D usado para analizar una muestra en una cubeta 600. En modalidades, los sistemas para el análisis de muestras como se describe en la presente descripción pueden comprender una unidad de citometría o un módulo de citometría de este tipo y otras unidades o módulos que proporcionan otras capacidades y dispositivos de análisis además del detector D usado para analizar una muestra en una cubeta 600. En dichos sistemas, dichas otras unidades o módulos pueden alojarse junto con, o pueden configurarse para su uso junto con, un detector D. Dichas otras capacidades y dispositivos de análisis pueden aplicarse a una muestra; por ejemplo, dichas capacidades y dispositivos de análisis pueden usarse para analizar la muestra o una porción de una muestra que está presente en una cubeta 600. En modalidades, dichas capacidades y dispositivos de análisis pueden usarse para analizar una porción diferente de la muestra presente en una cubeta 600 (por ejemplo, una muestra puede dividirse en dos o más alícuotas, donde una alícuota se coloca en una cubeta 600 para el análisis citométrico, y una o más alícuotas se analizan por otros dispositivos que se alojan en, o cerca de, o funcionan en conjunto con, una unidad de citometría o módulo de citometría). Así, por ejemplo, independientemente del análisis realizado por dicho módulo de citometría, una muestra (o porción de la misma) puede medirse o analizarse en una unidad de análisis químico, o en una unidad de análisis de ácidos nucleicos, o en una unidad de análisis de proteínas (por ejemplo, una unidad que usa anticuerpos u otras moléculas de unión específica para analizar una muestra), u otra unidad o combinación de unidades y capacidades. Dicho análisis puede incluir el análisis de moléculas y elementos pequeños presentes en una muestra (por ejemplo, por una unidad de química general); el análisis de moléculas de ácido nucleico presentes en una muestra (por ejemplo, por una unidad de ácido nucleico); el análisis de proteínas o antígenos reactivos con anticuerpos presentes en una muestra (por ejemplo, mediante una unidad de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)); o combinaciones de estos. Además, los sistemas que se ilustran en la Figura 8E y que se describen en la presente pueden incluir un controlador para controlar y programar operaciones en una o más de las unidades o módulos.

La Figura 8F proporciona una representación esquemática detallada adicional de un sistema que incluye un mecanismo de transporte para transportar una cubeta desde una ubicación de preparación de muestras hasta una ubicación de observación de muestras cerca de un detector óptico D. Un sistema tal como el sistema de la modalidad que se muestra en la Figura 8F puede incluir múltiples módulos de análisis de muestras, que pueden configurarse para trabajar de forma independiente o, en modalidades, pueden configurarse para trabajar juntos. El sistema que se muestra en la Figura 8F incluye una sola unidad de citometría 707, con un detector D; en modalidades, las muestras (o porciones de las mismas) que se analizan en cualquiera o todos los módulos de análisis 701, 702, 703, 704, 705 y 706 pueden transportarse al módulo de citometría 707, para observación y medición por el detector D. Independientemente del análisis que realiza el módulo de citometría 707, una muestra (o porción de la misma) puede medirse o analizarse en una unidad de análisis químico 715. Dicho análisis en una unidad de análisis químico 715 puede incluir el análisis de moléculas y elementos pequeños presentes en una muestra (por ejemplo, por una unidad de química general); el análisis de moléculas de ácido nucleico presentes en una muestra (por ejemplo, por una unidad de ácido nucleico); el análisis de proteínas o antígenos reactivos con anticuerpos presentes en una muestra (por ejemplo, mediante una unidad de ensayo ELISA); o combinaciones de estos.

Los sistemas que se ilustran en la Figura 8F pueden incluir un controlador para controlar y programar operaciones en uno o más de los módulos 701-707. Las muestras se pueden cargar en portamuestras u otros elementos para su análisis en sistemas como se ilustra en el ejemplo que se muestra en la Figura 8E. Dichos sistemas y módulos de dichos sistemas incluyen, por ejemplo, sistemas de manipulación de muestras 708; pipetas para obtener, mover y alicuotar muestras, incluidas las pipetas de succión 711 y las pipetas de desplazamiento positivo 712; centrifugas 713; espectrofotómetros 714; unidades de análisis químico 715; tubos fotomultiplicadores (PMT) 716; cartuchos 717 para contener suministros y herramientas desechables, tales como, por ejemplo, puntas de pipeta y otras puntas; y otros elementos. Los módulos y otros elementos pueden estar soportados por un bastidor 709 u otra estructura de soporte. Las muestras, los desechables, las herramientas y otros elementos pueden transportarse dentro de un

módulo y pueden transportarse entre módulos (por ejemplo, entre un módulo 701-706 y un módulo de citometría 707).

Las Figuras 8E y 8F muestran que el portamuestras, tal como la cubeta 600, puede transportarse desde una ubicación (tal como donde puede ocurrir la preparación de la muestra) y luego a otra ubicación (tal como el detector D como se ve en las Figuras 8E y 8F). La cubeta 600 no libera fluidos en o sobre el detector D, sino que es una unidad autónoma que mantiene toda la muestra en su interior. Puede haber una o más, dos o más, o tres o más ubicaciones en o cerca del detector D en las que hay una superficie transparente en la que la cubeta 600 u otro portamuestras puede acoplarse para proporcionar una interfaz transparente para que ocurra la detección de la señal de muestra. Los elementos de la Figura 8F y descripción adicional sobre dichos elementos y sus usos se pueden encontrar en la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 13/769,779.

Campo oscuro

Al menos algunas modalidades de la presente descripción incluyen una fuente de iluminación de campo oscuro y una cubeta. Las características relevantes de la cubeta 600 se relacionan con el diseño de las dimensiones de la cubeta y los materiales ópticos y la geometría de la cubeta. La cubeta aumenta la extensión de la iluminación de campo oscuro a través de la reflexión (por ejemplo, a través de TIR, PIR o ambos). En una modalidad, el sistema puede usar simultáneamente iluminación de campo oscuro trans y de campo oscuro epi de una muestra.

En algunas modalidades que se describen en la presente descripción, la cubeta 600 combinada con la fuente de luz 650 permite la trans-iluminación y la epi-iluminación mediante el uso de un sistema físico en la configuración epi (es decir, con la fuente de luz y el objetivo en el mismo lado de la muestra). La cubeta básica se diseña para contener la muestra biológica y presentarla para su visualización. En modalidades, la porción de cubierta 612 puede tener un diseño específico. Se sabe que diferentes materiales pueden tener diferentes índices de refracción; el material que tiene un índice de refracción deseado se puede seleccionar para su uso en la fabricación de una porción de cubierta 612, o un soporte de base 620, u otros elementos y componentes de una cubeta 600 y elementos y componentes asociados. Por ejemplo, en algunas modalidades, una porción de cubierta 612 o un soporte de base 620 pueden hacerse de vidrio. Por ejemplo, en algunas modalidades, una porción de cubierta 612 o un soporte de base 620 pueden hacerse de cuarzo. Por ejemplo, en algunas modalidades, una porción de cubierta 612 o un soporte de base 620 pueden hacerse de un polímero acrílico o transparente (por ejemplo, una cicloolefina, un policarbonato, un poliestireno, un polietileno, un poliuretano, un cloruro de polivinilo, u otro polímero o copolímero), u otro material transparente.

Se puede diseñar el material de la porción de cubierta superior 612 para facilitar la iluminación y la recopilación de imágenes. En modalidades, para iluminar una muestra, la fuente de luz 650 puede ser una luz anular 650 (es decir, puede ser circular), puede tener fuentes de luz 654 que se colocan en un patrón discreto o continuo, y puede usar un reflector curvo 652 para dirigir la luz a la muestra.

En la microscopía de campo oscuro, la muestra se ilumina con rayos oblicuos. En la microscopía de campo oscuro, la luz que ingresa a la óptica del microscopio es luz dispersada por la muestra, lo que permite medir las propiedades de dispersión de células, partículas y otros objetos y estructuras en la muestra. Si no hay células, partículas, estructuras u otros objetos en la muestra, entonces la imagen de campo oscuro es negra.

En el presente ejemplo no limitante, el reflector 652 y el LED 654 de la luz anular 650 se diseñan para reflejar la luz de modo que una fracción mínima de luz regrese directamente al objetivo como fondo no específico. El sistema se diseña para dirigir la luz mediante TIR en las superficies de las cubetas de regreso al área de análisis 608. La luz que se refleja desde una superficie, ya sea por TIR u otra reflexión, se dirige así para iluminar una muestra en el área de análisis 608. Las células, partículas y estructuras de la muestra en el área de análisis 608 reciben luz directamente de la luz anular debajo de la célula (es decir, mediante epi-iluminación). Además, como se describe en la presente descripción, la luz procedente de las superficies superiores (reflejada) también se dirige al área de análisis 608 (es decir, mediante trans-iluminación).

Por lo tanto, de acuerdo con los sistemas y métodos que se describen en la presente descripción, con la luz anular 650 en la misma posición, la luz puede dirigirse para iluminar el área de análisis 608 desde dos direcciones (tanto epi-iluminación como trans-iluminación) desde una única fuente de luz anular. En modalidades, esta iluminación es toda iluminación oblicua. Se puede controlar las fuerzas relativas de los dos componentes ligeros mediante el diseño de la cubeta y el material usado para la cubeta.

Esta iluminación de campo oscuro es diferente del campo oscuro convencional. Por ejemplo, en las modalidades que se describen en la presente descripción, la iluminación de campo oscuro se proporciona mediante la luz que se refleja en la superficie de una cubeta mediante TIR. A modo de ejemplo no limitante, en modalidades, un sistema como el que se describe en la presente descripción puede usar una capa reflectante en la parte posterior de ciertas superficies de la porción de cubierta 612 para reflejar toda la luz. A modo de ejemplo no limitante, en modalidades, un sistema como el que se describe en la presente descripción puede usar una capa reflectante en la parte posterior

de ciertas superficies de una cubeta 600 para reflejar toda la luz. Algunas modalidades pueden usar un fondo reflectante completo o selectivo.

5 Por ejemplo, en modalidades, es conveniente dirigir la luz en un ángulo oblicuo, lo que mantiene el campo oscuro de iluminación. En algunas modalidades, las fuentes de luz 654 pueden dirigir la luz en ángulo y, por lo tanto, pueden no requerir o no usar el reflector 652. El reflector 652 puede mejorar la capacidad de fabricación de la fuente de luz 654 ya que todas las luces están en el mismo plano, se dirigen en la misma dirección. Opcionalmente, las fuentes de luz en ángulo 654 también se pueden usar en lugar de un reflector o en combinación con él.

10 Debe entenderse que aunque la intensidad de la luz de un componente de iluminación de trans-iluminación puede ser, por ejemplo, 10 veces más débil que un componente de epi-iluminación correspondiente, la intensidad de la luz que se dispersa desde las células u otros objetos en la muestra debido a la trans-iluminación puede ser 200 veces más fuerte. Es decir, cuando la dispersión de una cantidad de epi-iluminación se compara con la dispersión de la misma cantidad de trans-iluminación, la intensidad de la luz que se dispersa debido a la trans-iluminación puede ser
15 200 veces mayor que la luz que se dispersa por la epi-iluminación de las células u otros objetos en la muestra. Por lo tanto, una pequeña cantidad de trans-iluminación puede mejorar significativamente la dispersión de la luz de las células.

20 Solo con epi-iluminación, la luz recolectada por un objetivo es solo la luz que refleja una muestra. Sin embargo, la difracción es un componente sustancial de la dispersión y el uso de la trans-iluminación proporciona cierta cantidad de difracción (por ejemplo, luz difractada por la muestra). Sin embargo, la luz recolectada de la epi-iluminación no incluye la luz difractada por la muestra (sin reflexión de la luz hacia la fuente de luz luego de la difracción). Por lo tanto, cuando se usa trans-iluminación y epi-iluminación, hay componentes reflectantes, refractivos y difractivos en la luz captada por un objetivo. Los métodos tradicionales usan toda la iluminación de campo oscuro trans, lo que
25 requiere una cantidad significativa de espacio para configurar, debido a la ubicación de los componentes ópticos en ambos lados de la muestra. Por el contrario, los sistemas y métodos que se describen en la presente descripción proporcionan tanto epi-iluminación como trans-iluminación mediante el uso de elementos ópticos que se configuran solo para epi-iluminación. Las modalidades que se describen en la presente descripción pueden obtener el ahorro de espacio de una configuración de epi-iluminación al mismo tiempo que proporcionan los beneficios de la epi-
30 iluminación y trans-iluminación de la muestra.

El diseño conjunto del portamuestras y la fuente de luz puede permitir una configuración de epi-iluminación para aumentar la cantidad de trans-iluminación de la muestra y, en particular, puede proporcionar una trans-iluminación uniforme. Algunas modalidades pueden usar superficies espejadas. Algunas modalidades usan TIR, que se puede
35 ajustar para crear la trans-iluminación deseada, incluida la trans-iluminación que es uniforme y en ángulos oblicuos en el área de análisis 608 para la iluminación de campo oscuro de la muestra. Una cubeta 600 puede configurarse para proporcionar trans-iluminación de un área de análisis 608 únicamente desde una fuente de luz en una configuración de epi-iluminación mediante el uso de reflexión, por ejemplo, mediante el uso de TIR o PIR, o ambos. En un ejemplo no limitante, una porción de cubierta más gruesa 612 permite que la luz que se somete a TIR (o PIR, o ambos) se refleje en el área objetivo 608. Además, los sistemas y métodos que se describen en la presente descripción no solo proporcionan luz que, debido a TIR (o PIR, o ambos), regresa a un área de análisis 608, sino luz que regresa a un área de análisis 608 uniformemente. Las modalidades de las Figuras 8A, 8B y 8D tienen ciertas superficies en ciertos ángulos, tienen ciertas superficies negras y ciertas superficies reflectantes para que la luz regrese uniformemente a un área de análisis 608 para proporcionar de esta manera una trans-iluminación uniforme
45 de una muestra en un área de análisis 608. Opcionalmente, se podría colocar una superficie totalmente reflectante en la parte superior (tal como, entre otros, una porción de cubierta plana 612 como se muestra en las Figuras 7A y 7B, y opcionalmente sobre áreas seleccionadas de la parte superior de un área 613 de las Figuras 8A, 8B y 8C). Por el contrario, la luz que viaja dentro del hardware tradicional puede sufrir alguna reflexión, incluido posiblemente algo de TIR (o PIR, o ambos), pero es posible que la luz no regrese al área 608.
50

A modo de ejemplo no limitante, las modalidades que se describen en la presente descripción toman una plataforma que se basa en imágenes y en lugar de usar un sistema de alto costo y alta complicación que puede tener, por ejemplo, 16 fuentes de luz láser, la presente modalidad hace uso de un sistema de detección más integrado para poder obtener imágenes e identificar los diferenciales de células y tipos en una muestra.
55

En un ejemplo no limitante, la combinación de todos estos diferentes tipos de información es útil y eficaz para lograr los objetivos deseados del análisis. Esto puede incluir mediciones cuantitativas o mediciones cualitativas vinculadas a mediciones cuantitativas, o imágenes vinculadas a mediciones cuantitativas. Los métodos y sistemas descritos en la presente descripción proporcionan diferentes canales de fluorescencia en los que cada canal puede tener como
60 objetivo uno o más marcadores moleculares específicos (es decir, información cuantitativa). Los métodos y sistemas que se describen en la presente descripción pueden incluir y pueden usarse con microscopía, las modalidades en la presente descripción pueden proporcionar la capacidad de observar y medir el fondo que se forma la tinción dentro de la célula (por ejemplo, si está en el citoplasma, si está concentrado en el superficie, en el núcleo o en cualquier otro lugar) que puede vincular la imagen o la información cualitativa que se genera con las mediciones cuantitativas que se generan. De esta manera, el vínculo de las imágenes originales que crearon los resultados cuantitativos está disponible para un análisis posterior si resulta que las mediciones cuantitativas activan alarmas o alcanzan los
65

umbrales que sugieren que se desea un análisis adicional. Las modalidades de la presente descripción pueden interrogar imágenes de fondo e información que la tinción crea en una célula en una muestra dentro de un área de análisis 608. Dichas imágenes e información permiten determinar si la tinción está o no en la célula, por ejemplo, en el citoplasma, en el núcleo, en la membrana u otra organela o ubicación celular.

5 En algunas modalidades de los métodos y sistemas que se describen en la presente descripción, se pueden observar y medir combinaciones de las propiedades de dispersión cuantitativa de la célula, la forma de la célula o el tamaño de la célula, y usarse para identificar o caracterizar una muestra. En algunas modalidades de los métodos y sistemas que se describen en la presente descripción, las propiedades físicas, las propiedades ópticas y las propiedades bioquímicas de una muestra o porción de la misma pueden observarse y medirse todas en el mismo dispositivo al mismo tiempo. Todas estas mediciones y observaciones se pueden combinar en un procesador programable u otro sistema de procesamiento para vincular los diversos tipos de información para lograr los objetivos de los ensayos (por ejemplo, para lograr un objetivo clínico de los ensayos).

15 Aunque los dispositivos tradicionales pueden ser adecuados para uno u otro tipo de observación o medición, no lo son tanto para la epi-iluminación como para la trans-iluminación de una sola fuente de luz; tampoco existe ningún vínculo entre estos diferentes tipos de información. Por ejemplo, en algunas modalidades que se describen en la presente descripción, donde la información de imagen que generó las mediciones cuantitativas es recuperable, los sistemas y el método pueden usarse para mediciones de morfología de tejido. Opcionalmente, el sistema se puede aplicar a la prueba de Papanicolaou, que es más similar a la citología tradicional. Se puede extender a cualquier cosa que se haga mediante el uso de microscopía tradicional. En la orina, al menos algunas de las presentes modalidades pueden observar y analizar cristales y no solo células. Se pueden observar cristales de sales inorgánicas y sustancias químicas de muestras de orina que generaron ciertas lecturas cuantitativas en una porción de un gráfico. Además, se pueden observar y analizar células y partículas presentes en la sangre, incluido el análisis de diferentes tipos y poblaciones de células sanguíneas, tal como, entre otros, lo que se puede ver en la Figura 1A, donde se circulan diferentes regiones de datos. La información de la imagen para ciertas regiones de datos se puede recuperar para analizar más a fondo las imágenes de las células subyacentes que crearon las medidas trazadas en el gráfico o cuadro.

30 Algunas modalidades en la presente descripción combinan las características de formación de imágenes con las características de patología. Por ejemplo, la preparación de tejido puede ocurrir dentro de un dispositivo o sistema que se configura para incluir los elementos ópticos que se describen en la presente descripción (un sistema puede ser, o incluir, por ejemplo, un módulo o múltiples módulos que se configuran para el análisis óptico y de otro tipo de una muestra), y dicho material preparado se puede visualizar en esta plataforma. Luego, la imagen o el análisis pueden enviarse a servidores para realizar análisis de imágenes, diagnósticos o realizar una patología digital efectiva para ayudar o permitir que un patólogo analice una muestra.

Las modalidades de métodos, sistemas y dispositivos como se describe en la presente descripción, incluyendo, por ejemplo, sistemas y dispositivos que se ilustran en las Figuras 8C y 8D, proporcionan una amplia gama de capacidades de citometría que pueden aplicarse juntas para analizar una muestra. Dichas capacidades de citometría incluyen la formación de imágenes citométricas, tal como las que típicamente se limitan a la microscopía; dicha formación de imágenes microscópicas y análisis de imágenes de muestras biológicas se proporciona mediante los dispositivos, sistemas y métodos que se describen en la presente descripción. Además, los sistemas y dispositivos que se describen en la presente descripción se configuran para proporcionar análisis espectrofotométricos de muestras biológicas. Dicho análisis de imágenes incluye campo oscuro, campo claro y otros análisis de imágenes. Se describen métodos novedosos y mejorados para aplicar epi-iluminación y trans-iluminación desde una única fuente de luz, que permiten imágenes y análisis de muestras de sangre más sensibles y precisos. Junto con los métodos que se describen en la presente descripción, se pueden obtener mediciones separadas con respecto a RBC, WBC y subcategorías de estos. El análisis de imagen y espectrofotométrico como se describe en la presente descripción puede usarse para identificar y cuantificar diferentes poblaciones de WBC útiles para la caracterización de una muestra de sangre y para el diagnóstico de muchas condiciones clínicas. Los dispositivos y sistemas que se describen en la presente descripción se pueden usar para proporcionar informes clínicos que incluyen información de análisis químico general, información de análisis que se basa en ácidos nucleicos, información de análisis que se basa en anticuerpos (o proteínas o epítomos), información de análisis espectrofotométrico y, además, proporcionan imágenes de las células y muestras analizadas. Se cree que la capacidad de producir dicha información y proporcionar dichos informes, incluidas imágenes así como también otra información clínica, proporciona capacidades y resultados novedosos e inesperados.

Además, esta información y estos informes pueden producirse en un período de tiempo corto (por ejemplo, en menos de una hora, o menos de 50 minutos, o menos de 40 minutos, o menos de 30 minutos, o en otro período de tiempo corto). Además, esta información y estos informes pueden producirse a partir de pequeñas muestras, por ejemplo, pequeñas muestras de sangre u orina. Tales pequeñas muestras pueden tener tamaños de no más de aproximadamente 500 μ l, o menor que aproximadamente 250 μ l, o menor que aproximadamente 150 μ l, o menor que aproximadamente 100 μ l, o menor que aproximadamente 75 μ l, o menor que aproximadamente 50 μ l, o menor que aproximadamente 40 μ l, o menor que aproximadamente 20 μ l, o menor que aproximadamente 10 μ l, u otro volumen pequeño. En modalidades donde una muestra es una muestra de sangre, dicha pequeña muestra se puede

recolectar de una punción en el dedo. Típicamente, solo se extrae una pequeña cantidad de sangre de una punción en el dedo (por ejemplo, la cantidad de sangre puede ser de aproximadamente 250 µl o menos, o de aproximadamente 200 µl o menos, o de aproximadamente 150 µl o menos, o de aproximadamente 100 µl o menos, o de aproximadamente 50 µL o menos, o de aproximadamente 25 µL o menos, u otra pequeña cantidad).

5 Los informes clínicos que incluyen información e imágenes citométricas, como se describe en la presente descripción (incluidas imágenes, diagramas de dispersión y otra información óptica y de imágenes), y que también incluyen información general de análisis químico, información de análisis que se basa en ácidos nucleicos, información de análisis que se basa en anticuerpos (o proteínas o epítomos), e información de análisis espectrofotométrico, se cree que proporcionan información amplia y clínicamente rica útil para el diagnóstico y caracterización de muchas condiciones clínicas, y para proporcionar ventajas sobre la técnica. Dichos informes se pueden preparar rápidamente en una ubicación de punto de servicio (o punto de atención), y se pueden comunicar rápidamente (por ejemplo, electrónicamente por conexión inalámbrica, por teléfono fijo, fibra óptica u otro enlace de comunicación) a un patólogo u otro experto clínico para el análisis y la interpretación. Dicho análisis e interpretación de expertos pueden, a su vez, comunicarse rápidamente (por ejemplo, electrónicamente por conexión inalámbrica, por teléfono fijo, fibra óptica u otro enlace de comunicación) a un médico que atiende al sujeto, o de vuelta a la ubicación de punto de servicio (o punto de atención), o ambos, para una retroalimentación rápida. Dicha retroalimentación rápida permite el tratamiento oportuno, si es necesario, o evita el tratamiento innecesario, al proporcionar información y análisis que se basa en muestras que pueden adquirirse, pueden analizarse, o ambos, en un punto de servicio o ubicación de punto de atención. Dichos análisis, informes y retroalimentación rápidos proporcionan ventajas sobre los métodos que consumen mucho tiempo y, al permitir el tratamiento oportuno y evitar el tratamiento innecesario, pueden proporcionar servicios y tratamientos clínicos más efectivos, más eficientes y menos costosos. Dichos métodos que consumen más tiempo y que pueden evitarse mediante los dispositivos, sistemas y métodos que se describen en la presente descripción incluyen, entre otros: retrasos e inconvenientes debido a que un sujeto debe viajar a un laboratorio o clínica lejos de su hogar, y alejado del clínico encargado del cuidado del sujeto; retrasos y posible degradación de la muestra debido al transporte de una muestra desde una ubicación de recolección a un ubicación donde la muestra puede analizarse; demoras debido a la transmisión de los resultados de dicho análisis a un patólogo u otro experto; retrasos debido a la transmisión de una opinión experta al médico del sujeto; retrasos en la transmisión del diagnóstico clínico y el tratamiento del sujeto después de la transmisión de una opinión experta al médico. Estos retrasos, inconvenientes y posible degradación de la muestra pueden reducirse o eliminarse mediante el uso de los métodos, dispositivos y sistemas que se describen en la presente descripción.

35 Las modalidades de sistemas y dispositivos como se ilustran en las Figuras 6A, 6B, 7, 8A, 8B, 8C y 8D, y otras figuras y como se describen en la presente descripción, proporcionan capacidades de citometría en un formato compacto, incluido en formatos compactos para su uso con uno o más de otras capacidades de análisis de muestras. Los solicitantes describen en la presente descripción nuevos dispositivos y sistemas que incluyen las nuevas capacidades de citometría como se describen en la presente descripción en dispositivos y sistemas junto con otras capacidades de análisis de muestras. Por ejemplo, los solicitantes describen en la presente descripción dispositivos y sistemas que proporcionan nuevas capacidades de citometría como se describe en la presente descripción junto con dispositivos y sistemas para el análisis de muestras mediante una unidad de química general; junto con dispositivos y sistemas para el análisis de muestras mediante una unidad de análisis de ácidos nucleicos; junto con dispositivos y sistemas para el análisis de muestras que usan la unidad de ensayos de anticuerpos (por ejemplo, ELISA); y combinaciones de estos. Por lo tanto, puede configurarse un dispositivo de procesamiento de muestras como se describe en la presente descripción para realizar una pluralidad de ensayos en una muestra. Dicha muestra puede ser una muestra pequeña.

50 En modalidades, todas las acciones o etapas de ensayos de muestras se realizan en una sola muestra. En modalidades, todas las acciones o etapas de ensayos de muestras se realizan mediante un dispositivo único o sistema y pueden realizarse dentro de una carcasa de un dispositivo único. Dichos sistemas y dispositivos que incluyen citometría, particularmente citometría que proporciona análisis de imágenes así como también análisis espectrofotométrico u otro análisis óptico en una sola unidad, se cree que son nuevos e inesperados. Se cree que proporcionar sistemas y dispositivos que incluyen citometría, particularmente citometría que proporciona análisis de imágenes así como también análisis espectrofotométrico u otro análisis óptico en una sola unidad, proporciona ventajas que antes no estaban disponibles en la técnica.

60 Las modalidades de sistemas y dispositivos como se ilustran en las Figuras 6A, 6B, 7, 8A, 8B, 8C y 8D, y otras figuras y como se describen en la presente descripción, proporcionan capacidades de citometría en un formato portátil, donde dichos dispositivos y sistemas pueden alojarse en recintos lo suficientemente pequeños para facilitar el transporte de un lugar a otro. Por ejemplo, dichos dispositivos y sistemas pueden transportarse fácilmente para su uso en un lugar de atención (por ejemplo, un consultorio médico, una clínica, un hospital, un laboratorio clínico u otro lugar). Por ejemplo, dichos dispositivos y sistemas pueden transportarse fácilmente para su uso en un punto de ubicación de servicio (además de dichos puntos de ubicación de atención que se describieron anteriormente, por ejemplo, una farmacia, un supermercado u otra ubicación de venta al por menor o de servicio). Una ubicación de punto de servicio puede incluir, por ejemplo, cualquier ubicación donde un sujeto pueda recibir un servicio (por ejemplo, pruebas, monitorización, tratamiento, diagnóstico, orientación, recolección de muestras, verificación de

identidad, servicios médicos, servicios no médicos, etc.). Las ubicaciones de los puntos de servicio incluyen, sin limitación, el hogar de un sujeto, el negocio de un sujeto, la ubicación de un proveedor de atención médica (por ejemplo, un médico), hospitales, salas de emergencia, quirófanos, clínicas, oficinas de profesionales de la salud, laboratorios, minoristas [por ejemplo, farmacias (por ejemplo, farmacia minorista, farmacia clínica, farmacia hospitalaria), droguerías, supermercados, tiendas de comestibles, etc.], vehículos de transporte (por ejemplo, automóvil, barco, camión, autobús, avión, motocicleta, ambulancia, unidad móvil, camión de bomberos, vehículo de emergencia, vehículo policial, coche de policía u otro vehículo que se configura para transportar a un sujeto de un punto a otro, etc.), unidades de atención médica itinerante, unidades móviles, escuelas, guarderías, lugares de control de seguridad, lugares de combate, residencias de vida asistida por salud, oficinas gubernamentales, edificios de oficinas, tiendas de campaña, sitios de adquisición de muestras de fluidos corporales (por ejemplo, centros de recolección de sangre), sitios en o cerca de una entrada a una ubicación a la que un sujeto puede desear acceder, sitios en o cerca de un dispositivo al que un sujeto puede desear acceder (por ejemplo, la ubicación de una computadora si el sujeto desea acceder a la computadora), una ubicación donde un dispositivo de procesamiento de muestras recibe una muestra, o cualquier otro punto de ubicación de servicio descrito en otra parte de la presente descripción.

Marcadores de Citometría Esotérica y Citometría Especializada

Muchos ensayos citométricos avanzados o esotéricos tradicionales requieren un sistema tradicional para medir una gran cantidad de marcadores en las células; típicamente, estos marcadores se miden simultáneamente. El enfoque general en el campo se ha relacionado con instrumentos de alta capacidad que incluyen, por ejemplo, seis o más láseres y 18 tubos PMT diferentes para medir todos estos marcadores simultáneamente. Sin embargo, en muchos entornos clínicos, no se requieren mediciones simultáneas de múltiples marcadores. En muchos requisitos clínicos, por ejemplo, es interesante ver cuántas células son positivas para un marcador, o cuántas son positivas para una combinación de dos o tres marcadores, u otra combinación similar de unos pocos marcadores. Algunas modalidades en la presente descripción proporcionan múltiples combinaciones de esquemas de tinción donde se puede tener un conjunto de, por ejemplo, 10 marcadores, donde pueden combinarse en conjuntos de 3-4 o 5-6 marcadores donde pueden combinarse de manera que incluso si se combinan dos marcadores del mismo color, algunas modalidades del presente sistema pueden deconvolucionar las imágenes y la información para determinar qué señal proviene de qué marcador. Esto permite que algunas modalidades del presente sistema reduzcan los requisitos de hardware en términos del número de fuentes de luz, el número de canales usados para el análisis de muestras y otras simplificaciones y eficiencias. Por lo tanto, el uso de subconjuntos de varios marcadores, o el uso o la medición de marcadores de manera no simultánea en un emparejamiento predeterminado puede ser útil para permitir la citometría esotérica. Por ejemplo, se puede considerar que algunos marcadores son marcadores de "selección"; dichos marcadores se miden primero, y si los resultados de dichas mediciones iniciales son negativos (por ejemplo, los marcadores no están presentes, o están presentes solo en cantidades bajas, en una muestra), es posible que no se necesiten mediciones con otros marcadores de seguimiento. En modalidades, dichos métodos y sistemas no simultáneos pueden reducir el volumen de muestra que se requiere para el análisis y pueden reducir las cantidades de marcadores necesarios para el análisis (por ejemplo, si un marcador de seguimiento se usa típicamente solo en una pequeña fracción de las muestras analizadas).

Debe entenderse que el uso de imágenes para análisis citométricos de muestras, tales como muestras de sangre u orina, permite obtener un recuento celular real y, por lo tanto, puede ser más preciso que los métodos de citometría tradicionales que no incluyen dichas mediciones. La obtención de imágenes de muestras, incluida la obtención de imágenes de células (y partículas o estructuras) en una muestra, en realidad puede ser más precisa que otros métodos, tal como la citometría de flujo tradicional. Por ejemplo, la selección de citometría de flujo tradicional no permite recuentos reales. La selección de la citometría de flujo es subjetiva y, por lo tanto, puede variar de un sistema a otro. Además, la citometría de flujo tradicional no proporciona imágenes de las células de una muestra.

Algunas modalidades de la presente descripción también pueden seleccionarse, pero la selección se basa algorítmicamente en varios factores que incluyen, entre otros, la salud del paciente. Los medios de clasificación se entrenan sobre una población de pacientes sabiendo si están sanos o enfermos. Algunas modalidades aquí pueden marcar a un paciente que es anormal y marcarlo para revisión. La selección de autoaprendizaje puede determinar si se desea una selección diferente en base a la información que se transmite sobre la salud del paciente. Por lo tanto, la selección de la muestra para algunas modalidades que se describen en la presente descripción se realiza de forma algorítmica, posiblemente con un procesador programable, y la selección cambia en base a la salud del paciente.

En modalidades de métodos y sistemas para formación de imágenes, se puede desear minimizar la cantidad y complejidad del hardware requerido, y se puede desear reutilizar parte o toda la muestra si es posible, para minimizar el volumen de muestra requerido. Por lo tanto, cuanto más capacidad se pueda extraer de la obtención de imágenes de una muestra, mejor en términos de maximizar la información que se obtiene de una muestra y, cuando sea posible, de cantidades más pequeñas de muestra. Por lo tanto, cuanto más información se pueda obtener para diferenciar diferentes tipos de células a partir de un número mínimo de imágenes, más se podrá minimizar el volumen de muestra requerido.

Opcionalmente, en un ejemplo no limitante, la cubeta para su uso en la platina de microscopía se puede configurar de la siguiente manera (con referencia a las modalidades y elementos que se muestran en las Figuras 7, 8A y 8B). Una capa de canal central comprende un núcleo de membrana plástica delgada 800 con adhesivo sensible a la presión (psa) en ambos lados. Un lado se adhiere a la capa de ventana 606 y el otro lado a la porción de cubierta de la capa superior moldeada 612. El núcleo es una película extruida de color negro, principalmente debido a razones ópticas para evitar la dispersión de la luz y la diafonía óptica entre los diferentes canales de líquido. El grosor de la membrana del núcleo es preferentemente uniforme a lo largo de su longitud y ancho, y puede formarse, por ejemplo, a partir de una película extruida de PET negro o HDPE (polietileno) negro. Las subcapas de psa en ambos lados son preferentemente lo más delgadas posible para preservar las dimensiones herméticas y uniformes del canal de líquido general (por ejemplo, el área de análisis 608), aunque preferentemente son lo suficientemente gruesas para proporcionar un buen sello fluido alrededor del canal de líquido. En modalidades, los adhesivos psa útiles para dichos portamuestras son de naturaleza acrílica y tienen una alta fuerza de adhesión para plásticos de baja energía superficial. Los canales de líquido, los puertos y otras características de alineación en la capa intermedia pueden fabricarse mediante el uso de procesos de corte por láser o troquelado. En modalidades, el calentamiento del material hasta cerca, pero no por encima, del punto de fusión del material puede usarse en la fabricación de cubetas y cámaras de cubetas. En modalidades, la unión por difusión puede usarse en la fabricación de cubetas y cámaras de cubetas (por ejemplo, los componentes de la cubeta pueden calentarse a la temperatura de transición vítrea de sus materiales, permitiendo o mejorando la difusión del material entre componentes de una cubeta previamente separados); por ejemplo, las uniones de acrílico a acrílico se pueden realizar mediante unión por difusión. En modalidades, la soldadura ultrasónica puede usarse en la fabricación de cubetas y cámaras de cubetas. Por ejemplo, los métodos de unión que incluyen, entre otros, el uso de calor, el uso de adhesivos, el uso de unión por difusión, el uso de soldadura ultrasónica y otras técnicas y métodos adecuados, pueden usarse para unir una estructura de soporte a una porción de cubierta de una cubeta (por ejemplo, una estructura de soporte 606 a una porción de cubierta 612 de las Figuras 7A y 7B). La soldadura sónica de cubetas, tal como, entre otras, la soldadura ultrasónica, puede implicar hacer múltiples capas de la cubeta y juntarlas, en lugar de moldearlas o usar adhesivos para las múltiples capas. En modalidades, se pueden combinar varias técnicas para la fabricación de la cubeta tales como, entre otras, soldar ultrasónicamente ciertas capas mientras se usan adhesivos u otras técnicas de unión en otras capas. Opcionalmente, algunas modalidades pueden usar una técnica para unir porciones perimetrales de la cubeta mientras que otra técnica puede usarse para unir estructuras o capas que entrarán en contacto con muestras o líquidos cuando la cubeta esté en uso.

Un canal en una cubeta puede tener un puerto de entrada (por ejemplo, un puerto de entrada 602 como se muestra en la Figura 6A) para llenar y puede tener dos o más puertos de entrada 602 para llenar. Un puerto de entrada 602 puede tener cualquier forma o configuración adecuada para transferir la muestra al interior del canal. En modalidades, un puerto de entrada puede tener una forma redonda, ovalada u otra adecuada para permitir que una pipeta (por ejemplo, una pipeta con una porción de extremo cónica o ahusada de manera similar) transfiera una muestra de fluido hacia y dentro de un canal. Por ejemplo, un puerto de entrada redondo puede ser adecuado para aceptar la punta de una pipeta cónica donde la pipeta se orienta sustancialmente perpendicular al plano del puerto de entrada. Por ejemplo, un puerto de entrada ovalado puede ser adecuado para aceptar una punta de una pipeta cónica donde la pipeta se orienta en un ángulo desde la perpendicular al plano del puerto de entrada. Por ejemplo, un puerto de entrada puede configurarse para dejar espacio para que una porción de extremo de una pipeta (por ejemplo, una punta de pipeta) se coloque sobre el puerto de entrada de manera que el fluido que sale de la punta de la pipeta caiga o fluya hacia el puerto de entrada; en modalidades, puede quedar un espacio entre al menos una porción del puerto de entrada y al menos una porción de la punta de la pipeta. En modalidades, un puerto de entrada puede configurarse para hacer contacto o acoplarse con al menos una porción de la punta dispensadora de líquido, tal como, entre otros, una porción de extremo de una pipeta (por ejemplo, una punta de pipeta) para formar un sello entre la porción de extremo de la pipeta y las paredes de ese puerto de entrada. En modalidades, un puerto de entrada puede tener una conicidad interna (por ejemplo, el diámetro u otra longitud de sección transversal de la porción más externa de un puerto de entrada puede diferir del diámetro u otra longitud de sección transversal de la porción más interna de ese puerto de entrada). En modalidades de un puerto de entrada con una conicidad interna, el diámetro interior u otra longitud de la sección transversal del puerto de entrada puede ser menor que el diámetro u otra longitud de la sección transversal de la parte más exterior de ese puerto de entrada, eficaz para complementar el cono de una punta de pipeta (por ejemplo, una punta de pipeta cónica) que se coloca en el puerto de entrada. En modalidades, una punta de pipeta puede acoplarse con un puerto de entrada efectivo para evitar que el fluido (por ejemplo, una muestra) que suministra una pipeta fluya fuera del canal a través del puerto de entrada. Opcionalmente, el puerto en la cubeta puede dimensionarse o diseñarse de otro modo para formar un sello contra al menos una porción de la punta de la pipeta. Opcionalmente, el material puede ser un material hidrofóbico de modo que el líquido solo entre en la cubeta cuando la fuerza suficiente dispense el líquido desde la punta, y no debido principalmente a ninguna fuerza hidrofílica.

En modalidades, un canal en una cubeta puede tener un respiradero efectivo para permitir que el aire u otro gas fluya (por ejemplo, salga) ayudando al llenado de un canal con muestra (por ejemplo, una muestra de fluido tal como sangre, plasma u otro fluido). En modalidades, un puerto de entrada puede servir como un respiradero o, en modalidades, un canal puede tener un respiradero separado, y además, de un puerto de entrada. En modalidades, un respiradero puede comprender una membrana porosa que se configura para permitir el paso de aire o gas y reducir o evitar la evaporación de líquido del canal (por ejemplo, de una muestra dentro del canal). Dicho respiradero

puede cubrirse con una membrana porosa, o puede incluir una membrana porosa en o cerca de la abertura del respiradero. Las membranas porosas que se hacen con materiales hidrofóbicos pueden ser más efectivas para mitigar la evaporación de una muestra que las membranas porosas que se hacen con materiales hidrofílicos. Dicha membrana porosa se puede fabricar con, por ejemplo, un polímero de cicloolefina tal como Zeonex® o Zeonor® (Zeon Chemicals, Louisville, KY, EE. UU.); polietileno (PE); fluoruro de polivinilideno (PVDF); combinaciones de PE y PVDF tal como Porex® (Porex Corporation, Fairburn, GA, EE. UU.); o con otros materiales porosos y combinaciones de materiales.

Un canal en una cubeta se puede llenar, por ejemplo, proporcionando una muestra a un puerto de entrada de un canal. Se entenderá que por "llenar un canal" se entiende el llenado del canal tanto completo como parcial; por lo tanto, "llenar un canal", como se usa en la presente descripción, se refiere a llenar un canal, o porción de un canal, ya sea que el canal se llene completamente o solo parcialmente. Se puede proporcionar una muestra de fluido a un canal mediante flujo por gravedad hacia el canal, por ejemplo, a través de un puerto de entrada abierto. Una muestra de fluido puede introducirse en un canal por acción capilar; por ejemplo, el contacto de una gota o porción de muestra que proporciona una punta de pipeta con una pared de un canal a través de un puerto de entrada puede iniciar y proporcionar un flujo capilar de muestra hacia un canal. Dicho medio capilar de llenar un canal es más eficaz y más fácil de lograr cuando las paredes del canal, o al menos las superficies interiores del canal, comprenden materiales o recubrimientos hidrofílicos. En modalidades, el llenado de un canal se puede lograr mediante el uso de presión, donde el fluido se fuerza al interior del canal mediante la aplicación de fuerza (por ejemplo, por presión hidráulica o de aire, que puede suministrarse por un pistón, una bomba, gas comprimido, presión osmótica u otros medios). Cuando un canal se llena a presión, se pueden usar materiales hidrofobos para formar o recubrir las paredes interiores del canal. Dichos materiales hidrofobos (por ejemplo, incluidos acrílicos, olefinas, cicloolefinas y otros polímeros y plásticos) pueden proporcionar mejores propiedades ópticas que otros (por ejemplo, que algunos materiales hidrofílicos). Cuando se va a llenar un canal mediante el uso de presión, se puede preferir un sello hermético entre una pipeta (usada para administrar el fluido, por ejemplo, la muestra) y el puerto de entrada del canal. Cuando se va a llenar un canal mediante el uso de presión, se puede proporcionar un respiradero (o respiraderos) que se configuran para permitir la salida de gas (por ejemplo, aire) o líquido que ocupaba previamente parte o todo el interior del canal. El uso de presión para llenar un canal permite el control de la velocidad y el volumen de fluido entregado; dicho control de velocidad y volumen puede ser mayor que el control de velocidad y volumen que se logra cuando se usa flujo capilar o por gravedad para llenar un canal.

En la modalidad que se describe en la presente descripción, se pueden incorporar elementos magnéticos en la cubeta (tal como, entre otros, discos magnéticos, o discos metálicos que se pueden sujetar con un imán). Por ejemplo, dichos elementos magnéticos pueden incluirse en, o pueden comprender, la capa superior moldeada de un portamuestras o cubeta. Se pueden usar elementos magnéticos para simplificar el hardware usado para transportar la cubeta. Por ejemplo, el sistema de manipulación puede acoplar las características magnéticas de la cubeta para transportarla sin tener que añadir un dispositivo de manipulación de muestras adicional.

Si bien la invención se ha descrito e ilustrado con referencia a ciertas modalidades particulares de la misma, los expertos en la técnica apreciarán que se pueden realizar diversas adaptaciones, cambios, modificaciones, sustituciones, eliminaciones o adiciones de procedimientos y protocolos sin apartarse del alcance de la invención de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. Por ejemplo, se pueden usar diferentes materiales para crear diferentes superficies reflectantes en la cubeta u otras superficies a lo largo de una trayectoria de luz en el sistema óptico. Opcionalmente, la superficie reflectante se selecciona para que la reflexión sea solo difusiva. Opcionalmente, la superficie reflectante se selecciona para que la reflexión sea solo especular. Algunas modalidades pueden usar un esquema de iluminación de parte superior plana como se establece en Coumans, FAW, van der Pol, E. y Terstappen, LWMM (2012), Perfil de iluminación de parte superior plana en un microscopio de epifluorescencia mediante series de microlentes duales. Citometría, 81A: 324-331. doi: 10.1002/cito.a.22029.

Opcionalmente, algunas modalidades pueden tener todos los canales con una superficie inferior en un plano, pero debido a los diferentes tamaños de los canales, tienen superficies superiores en diferentes planos. Opcionalmente, algunas modalidades pueden tener canales en diferentes planos verticales. Aunque la mayoría de las modalidades en la presente descripción muestran imágenes en una configuración vertical de arriba hacia abajo, debe entenderse que algunas modalidades pueden disponer canales en una configuración apilada verticalmente e imágenes de canales desde un lado. Algunas modalidades pueden usar múltiples cubetas en una plataforma de formación de imágenes. Por ejemplo, aunque la Figura 8E muestra una sola cubeta, es posible colocar varias cubetas en la plataforma de formación de imágenes para su procesamiento de manera secuencial o simultánea. Aunque las cubetas en la presente descripción se muestran típicamente formadas a partir de materiales transparentes, algunas modalidades pueden formar al menos algunas porciones de la cubeta a partir de material no transparente. Esto se puede proporcionar para proporcionar una rigidez estructural mejorada a porciones de la cubeta y/o, opcionalmente, proporcionar diferentes propiedades de manejo de la luz. Opcionalmente, algunas modalidades se pueden usar con un soporte no transparente que se acopla con al menos una porción de la cubeta y se mueve con la cubeta a una plataforma de formación de imágenes para facilitar el manejo y/o proporcionar un efecto óptico deseado.

Además, las concentraciones, cantidades y otros datos numéricos pueden presentarse en la presente descripción en un formato de intervalo. Debe entenderse que dicho formato de intervalo se usa simplemente por conveniencia y

5 brevedad y debe interpretarse de manera flexible para incluir no solo los valores numéricos enumerados explícitamente como los límites del intervalo, sino también para incluir todos los valores numéricos individuales o sub-intervalos incluidos dentro de ese intervalo como si cada valor numérico y subintervalo se enumerara explícitamente. Por ejemplo, un intervalo de tamaño de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 200 nm debe interpretarse para incluir no solo los límites enumerados explícitamente de aproximadamente 1 nm y aproximadamente 200 nm, sino también para incluir tamaños individuales tales como 2 nm, 3 nm, 4 nm, y subintervalos tales como 10 nm a 50 nm, 20 nm a 100 nm y otros intervalos.

10 Las publicaciones que se describen o citan en la presente descripción se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente descripción debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a preceder dicha publicación en virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación que se proporcionan pueden diferir de las fechas de publicación reales, por lo que es posible que sea necesario confirmarlas de forma independiente.

15 Si bien lo anterior es una descripción completa de la modalidad preferida de la presente invención, es posible usar varias alternativas, modificaciones y equivalentes. Por lo tanto, el alcance de la presente invención no debería determinarse con referencia a la descripción anterior sino que, en su lugar, debería determinarse con referencia a las reivindicaciones adjuntas junto con su alcance global o equivalentes. Cualquier característica, ya sea preferida o no, puede combinarse con cualquier otra característica, ya sea preferida o no. Las reivindicaciones adjuntas no deben interpretarse en el sentido de que incluyen limitaciones de medios más función, a menos que tal limitación se mencione explícitamente en una reivindicación dada mediante el uso de la frase "medios para". Debe entenderse que, como se usa en la presente descripción y en todas las reivindicaciones que siguen, el significado de "un", "una" y "el/la" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, como se usa en la presente descripción y en todas las reivindicaciones que siguen, el significado de "en" incluye "en" y "sobre" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Como se usa en la presente descripción, el término "o" puede incluir "y/o"; por lo tanto, el significado "o" incluye tanto la conjuntiva como la disyuntiva a menos que el contexto indique expresamente lo contrario.

30 Este documento contiene material sujeto a protección de derechos de autor. El propietario de los derechos de autor (solicitante en la presente descripción) no tiene ninguna objeción a la reproducción por facsímil de los documentos de patente y descripciones, tal como aparecen en el archivo o registros de patentes de la Oficina de Patentes y Marcas Registradas de los Estados Unidos, pero se reserva todos los derechos de autor. Se aplicará el siguiente aviso: Copyright 2013 y 2014 Theranos, Inc.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar una célula en una muestra que contiene una pluralidad de células, que comprende:
 - 5 (a) colocar dicha muestra en un portamuestras (600) que comprende una cámara de muestra (608) definida por un canal que tiene una forma de sección transversal variable de manera que la dimensión de la sección transversal del canal difiere a lo largo de la longitud del canal con una porción de extremo estrecha y una porción media más ancha, en donde la cámara de muestra se configura para contener la muestra, al menos una porción de dicho portamuestras (600) que comprende un material ópticamente transmisor, dicho material ópticamente transmisor que comprende una superficie ópticamente transmisiva y una superficie reflectante (614), en donde dicha superficie ópticamente transmisiva y dicha superficie reflectante (614, 618) se configuran de manera que la luz que pasa a través de la superficie ópticamente transmisiva proporciona simultáneamente epi-iluminación y trans-iluminación a la muestra en la cámara de muestra (608), donde la epi-iluminación comprende luz que viaja desde dicha fuente de iluminación a la muestra sin reflexión en una superficie del material ópticamente transmisor, y donde la trans-iluminación comprende luz de dicha fuente de iluminación que viaja dentro del material ópticamente transmisor y hacia la muestra siguiendo al menos una reflexión desde al menos una superficie de dicho material ópticamente transmisor;
 - 10 (b) iluminar dicho portamuestras (600) de manera efectiva para proporcionar simultáneamente epi-iluminación y trans-iluminación de la muestra; y
 - 15 (c) identificar una célula en la muestra.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicha identificación comprende identificar dicha célula con un detector que se configura para generar imágenes de al menos una porción de dicha cámara de muestra.
- 25 3. El método de la reivindicación 2, en donde dicha cámara de muestra comprende un canal alargado.
4. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el portamuestras comprende una o más superficies ópticamente no transmisoras.
- 30 5. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde dicha trans-iluminación se proporciona al menos en parte mediante la reflexión interna total de la luz en una superficie.
6. El método de la reivindicación 5, en donde dicha trans-iluminación se proporciona al menos en parte por la reflexión interna total de la luz dentro de la cubeta.
- 35 7. El método de la reivindicación 1, en donde el portamuestras comprende dos o más cámaras de muestra para contener la muestra.
- 40 8. El método de la reivindicación 1, en donde dicha etapa de identificación de una célula (c) comprende además: analizar una célula de la pluralidad de células para al menos uno de: (i) la presencia de un antígeno de superficie celular; (ii) la cantidad de un antígeno de superficie celular; o (iii) el tamaño de célula.
- 45 9. El método de la reivindicación 8, que comprende además: analizar la célula identificada en la reivindicación 8 para al menos uno de: (i) tamaño nuclear; o (ii) forma nuclear.
- 50 10. El método de la reivindicación 9, que comprende además: analizar la célula identificada en la reivindicación 9 para la dispersión de luz celular cuantitativa, y usar dicha información de dispersión de luz celular cuantitativa en combinación con la información de la reivindicación 8 y la reivindicación 9 para identificar la célula en la muestra que contiene una pluralidad de células
- 55 11. El método de la reivindicación 1, en donde dicha etapa de identificación de una célula (c) comprende además:
 - (a) analizar una célula de la pluralidad de células para al menos uno de: (i) la presencia de un antígeno de superficie celular; (ii) la cantidad de un antígeno de superficie celular; o (iii) el tamaño de célula;
 - (b) analizar la célula de (a) para al menos uno de: (i) el tamaño nuclear; o (ii) la forma nuclear; y
 - (c) analizar la célula de (a) y (b) para la dispersión de luz de célula cuantitativa,

en donde la combinación de información de las etapas (a), (b) y (c) se usa para identificar la célula en la muestra que contiene una pluralidad de células.
- 60 12. El método de la reivindicación 11, en donde la célula se mantiene en un portamuestras que comprende una cámara de muestra que tiene un piso ópticamente transmisor, dicho portamuestras que tiene una superficie exterior que comprende al menos una estructura cóncava o convexa que se configura para proporcionar soporte mecánico al portamuestras y en donde dicha al menos una estructura cóncava o convexa comprende una superficie, y en donde dicha superficie se configura para reflejar la luz dentro del portamuestras.
- 65

- 5 13. El método de la reivindicación 11, en donde la célula se mantiene en un portamuestras que comprende una cámara de muestra que tiene un piso ópticamente transmisor, dicho portamuestras que tiene una superficie exterior que comprende al menos una estructura cóncava o convexa que se configura para i) proporcionar soporte mecánico a la muestra portamuestras, y ii) proporcionar una trayectoria para la luz que se refleja internamente dentro del portamuestras.
- 10 14. El método de la reivindicación 12 o 13, en donde dicha al menos una estructura cóncava o convexa del portamuestras tiene una forma de sección transversal que se selecciona entre rectangular, triangular, circular y semicircular.

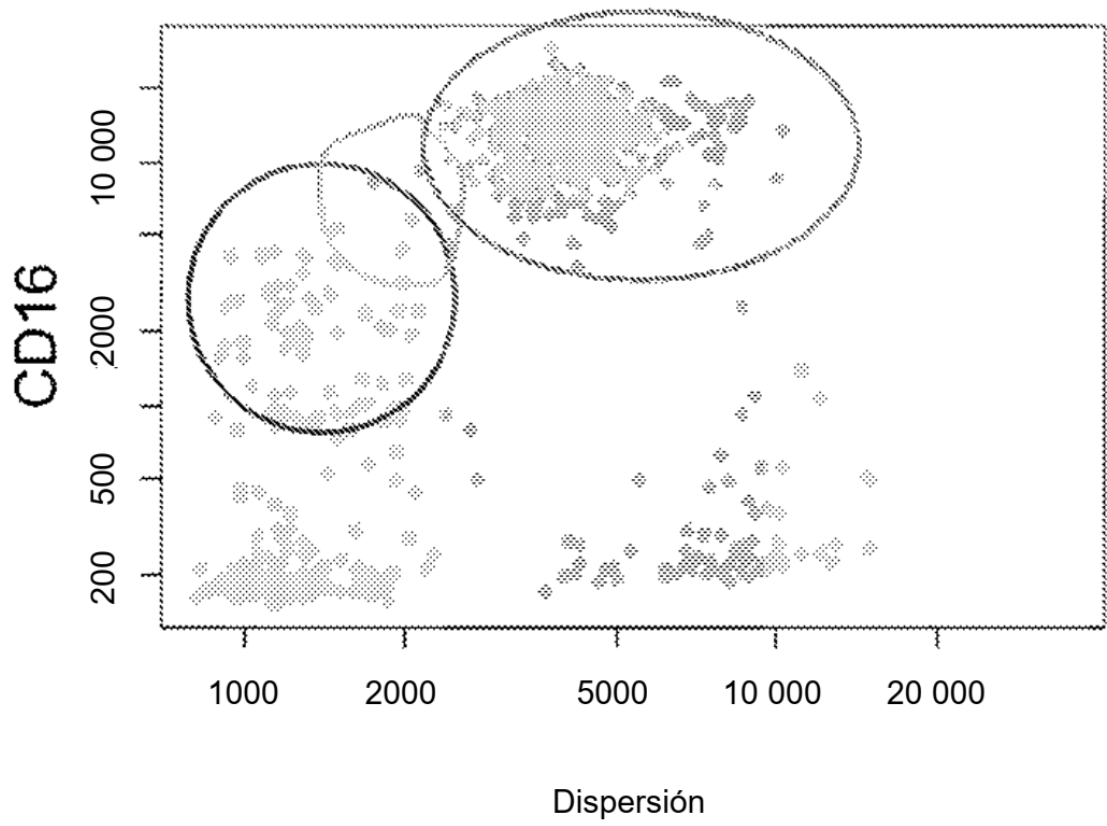


Figura 1A

Relación de Área Celular Total/Nuclear

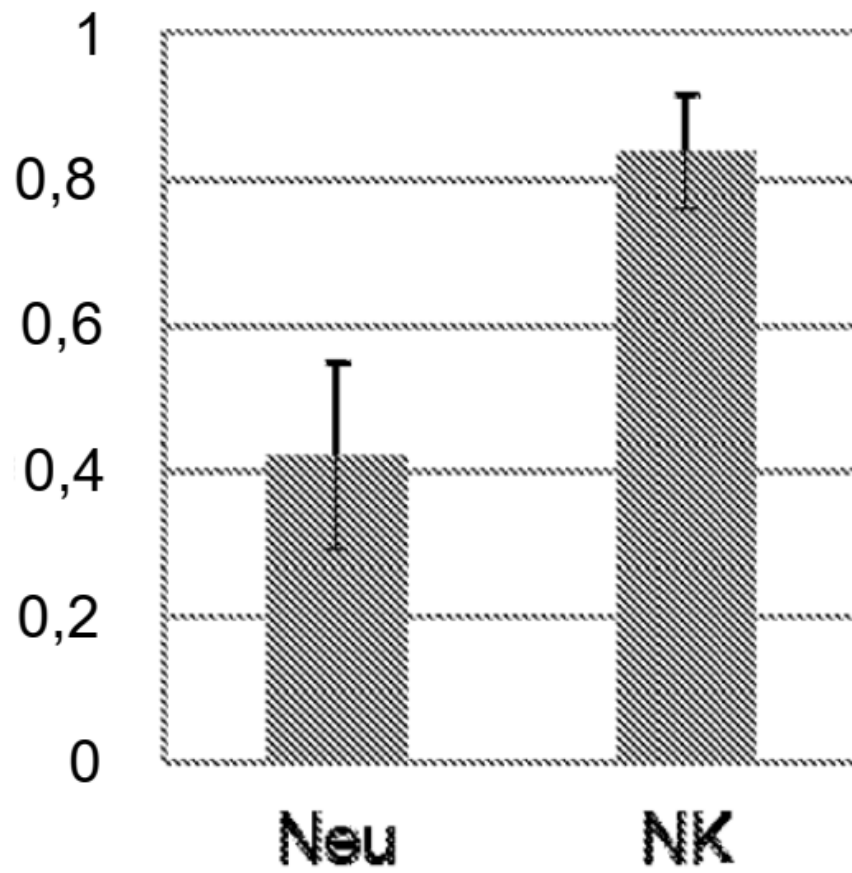


Figura 1B

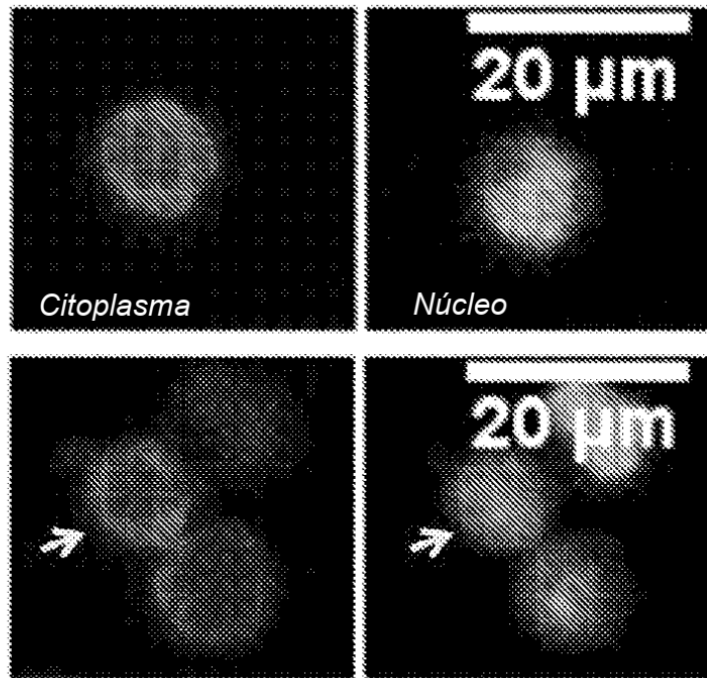


Figura 1C

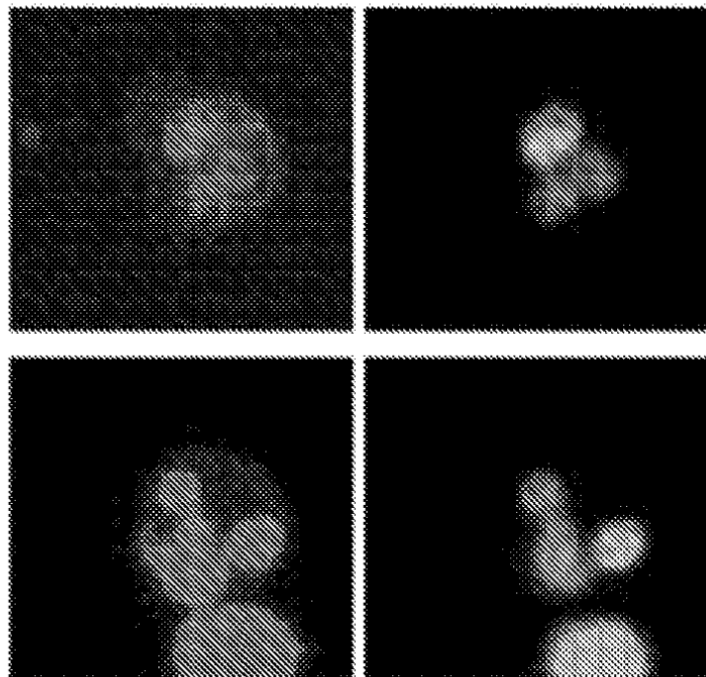


Figura 1D

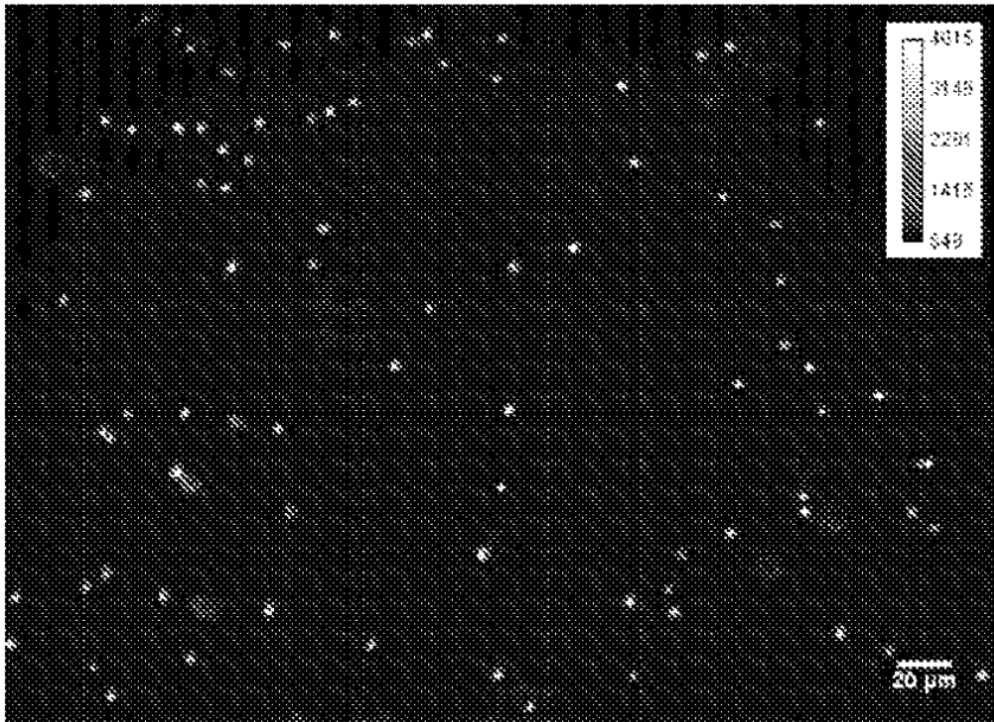


Figura 2A

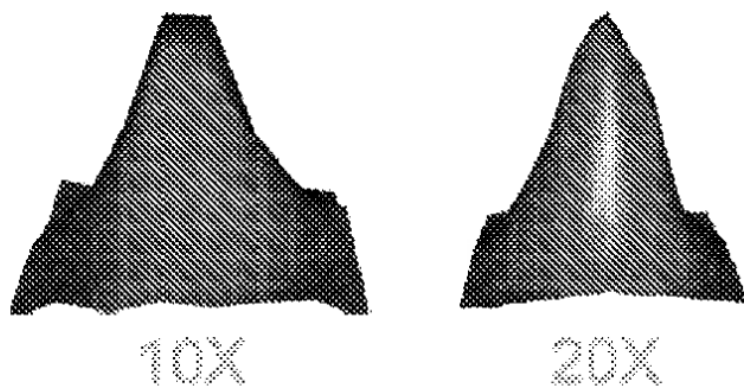


Figura 2B

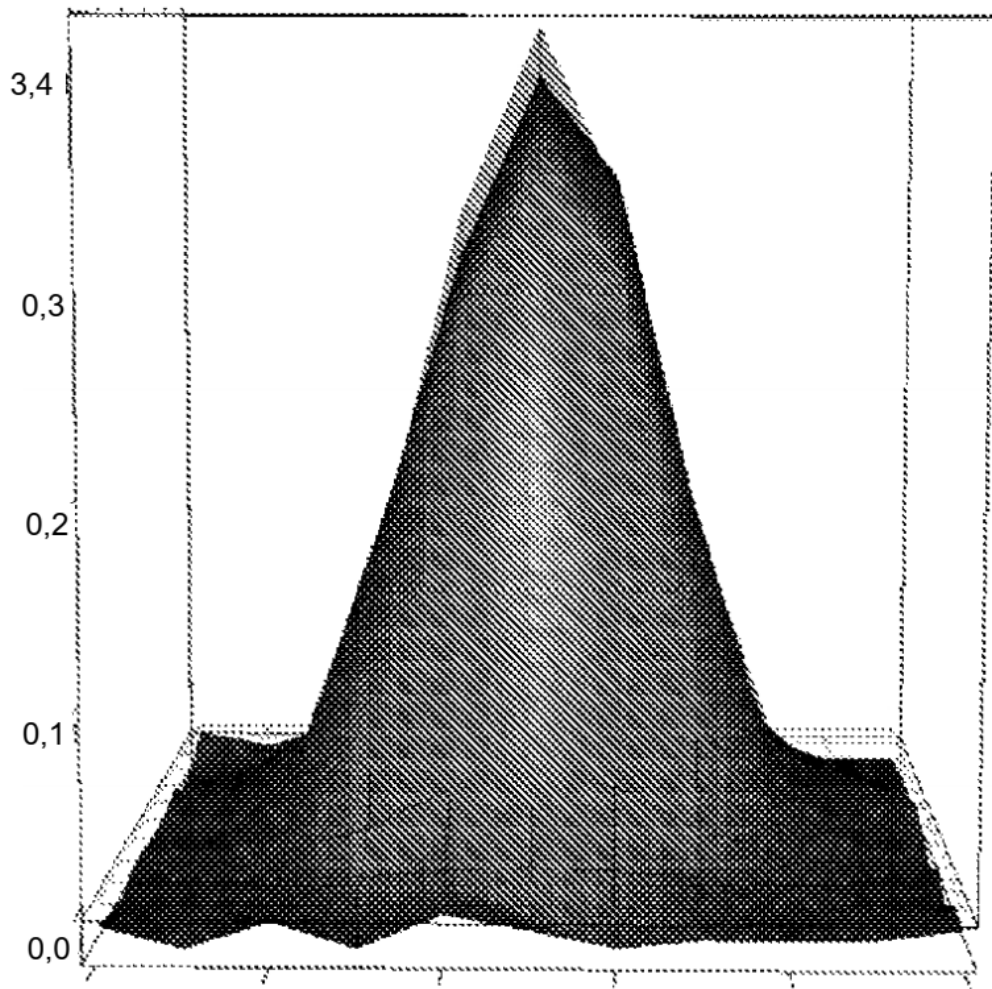


Figura 2C

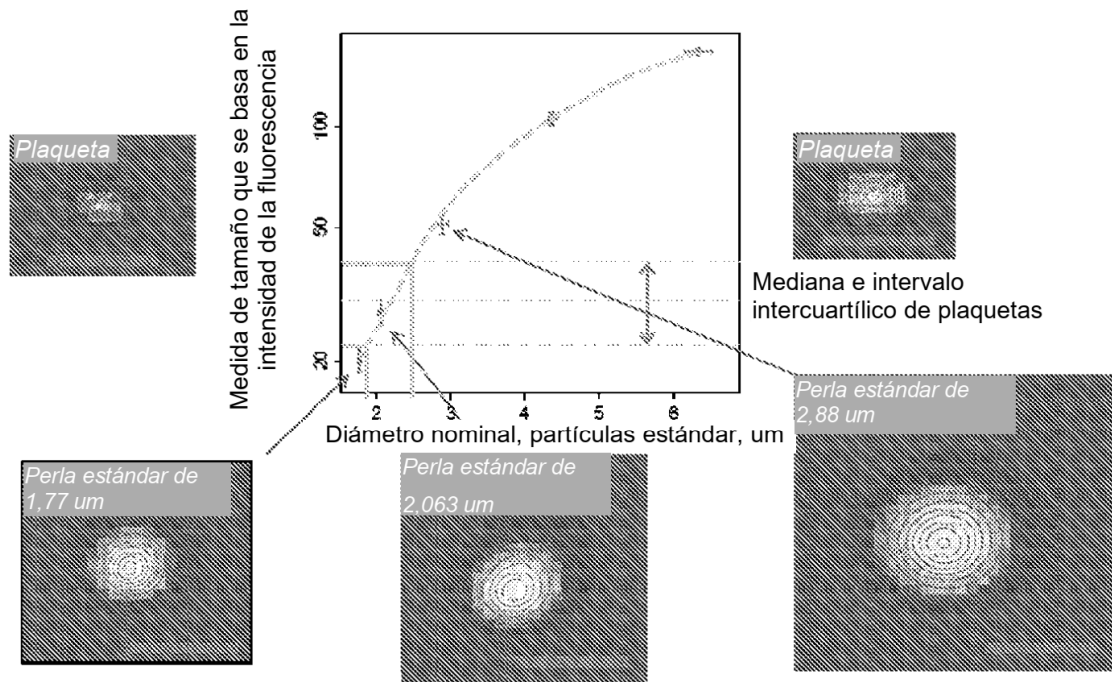


Figura 3

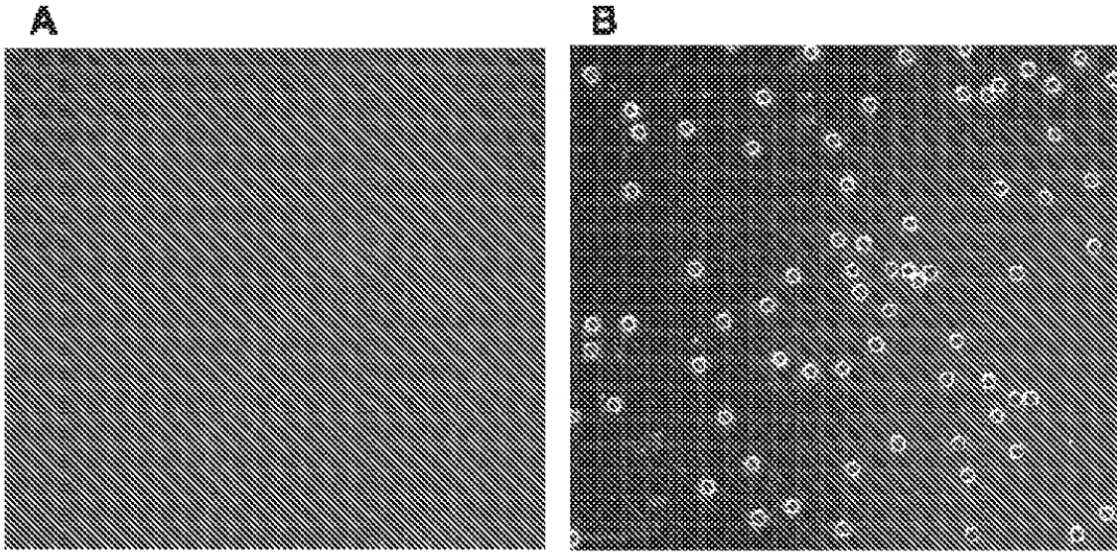


Figura 4

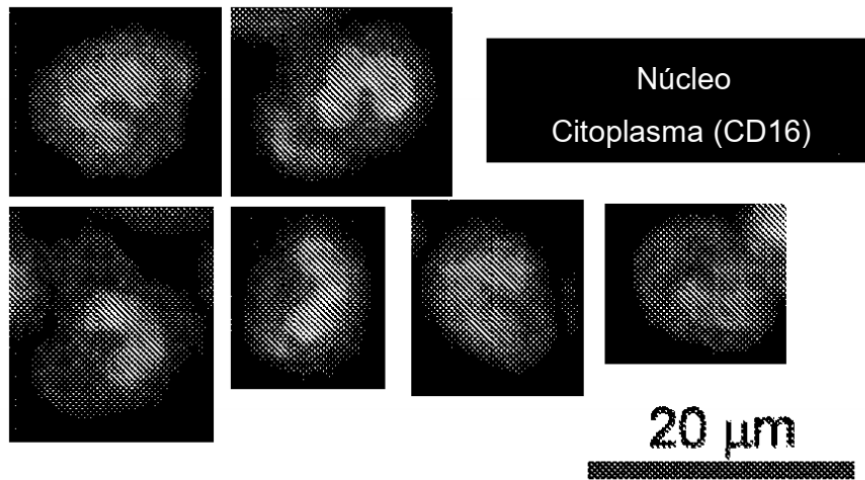


Figura 5A

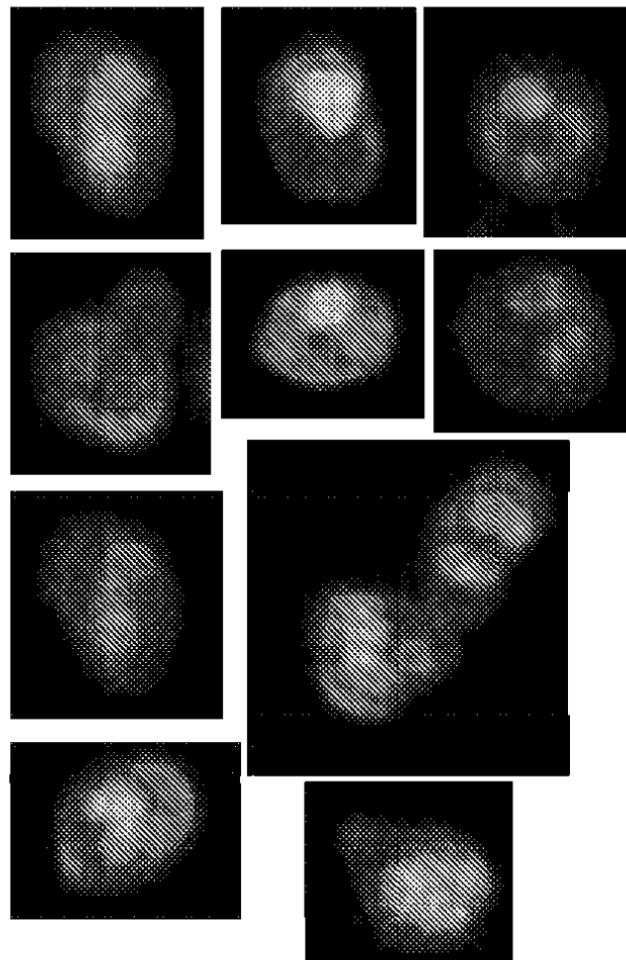


Figura 5B

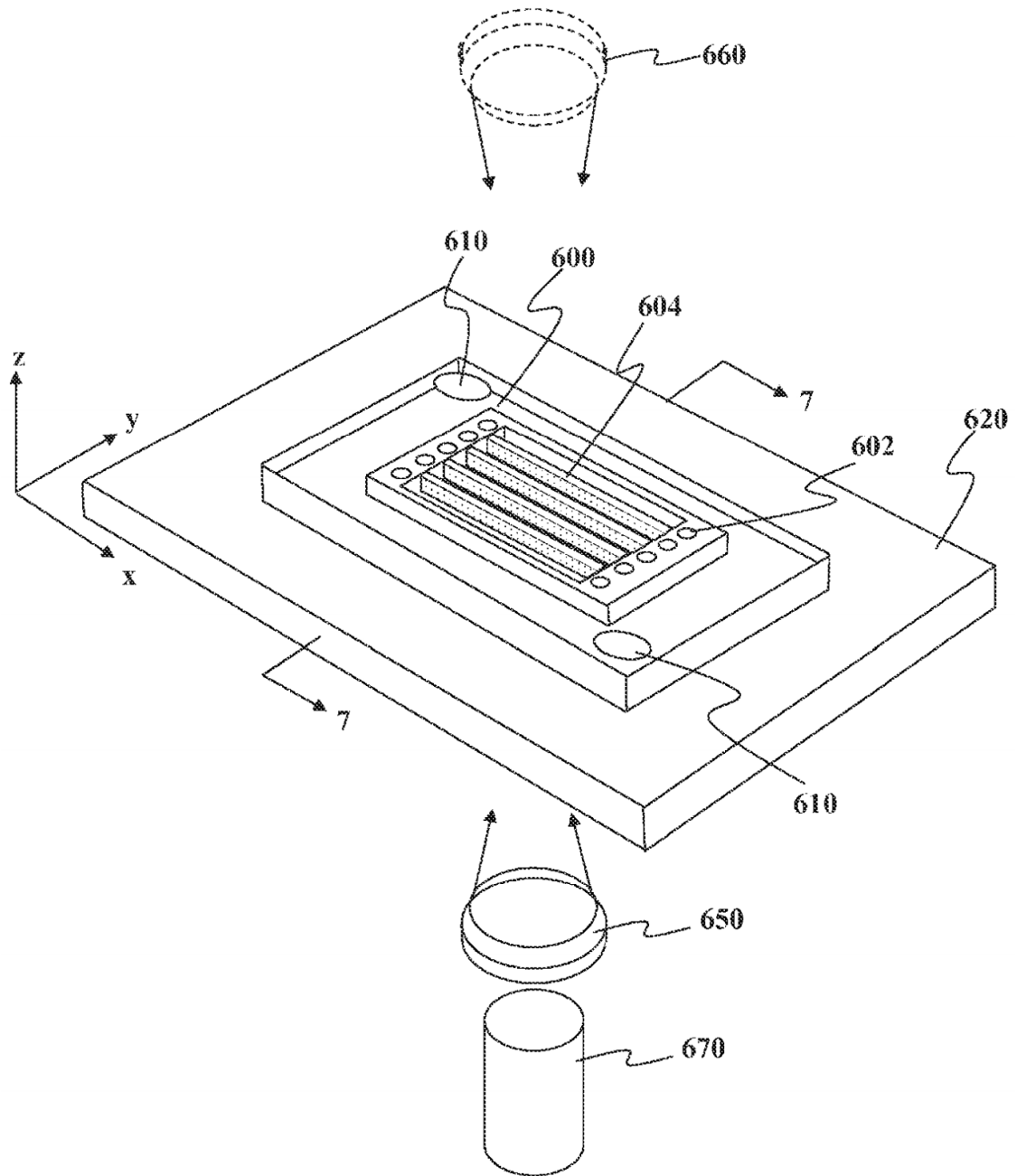


Figura 6A

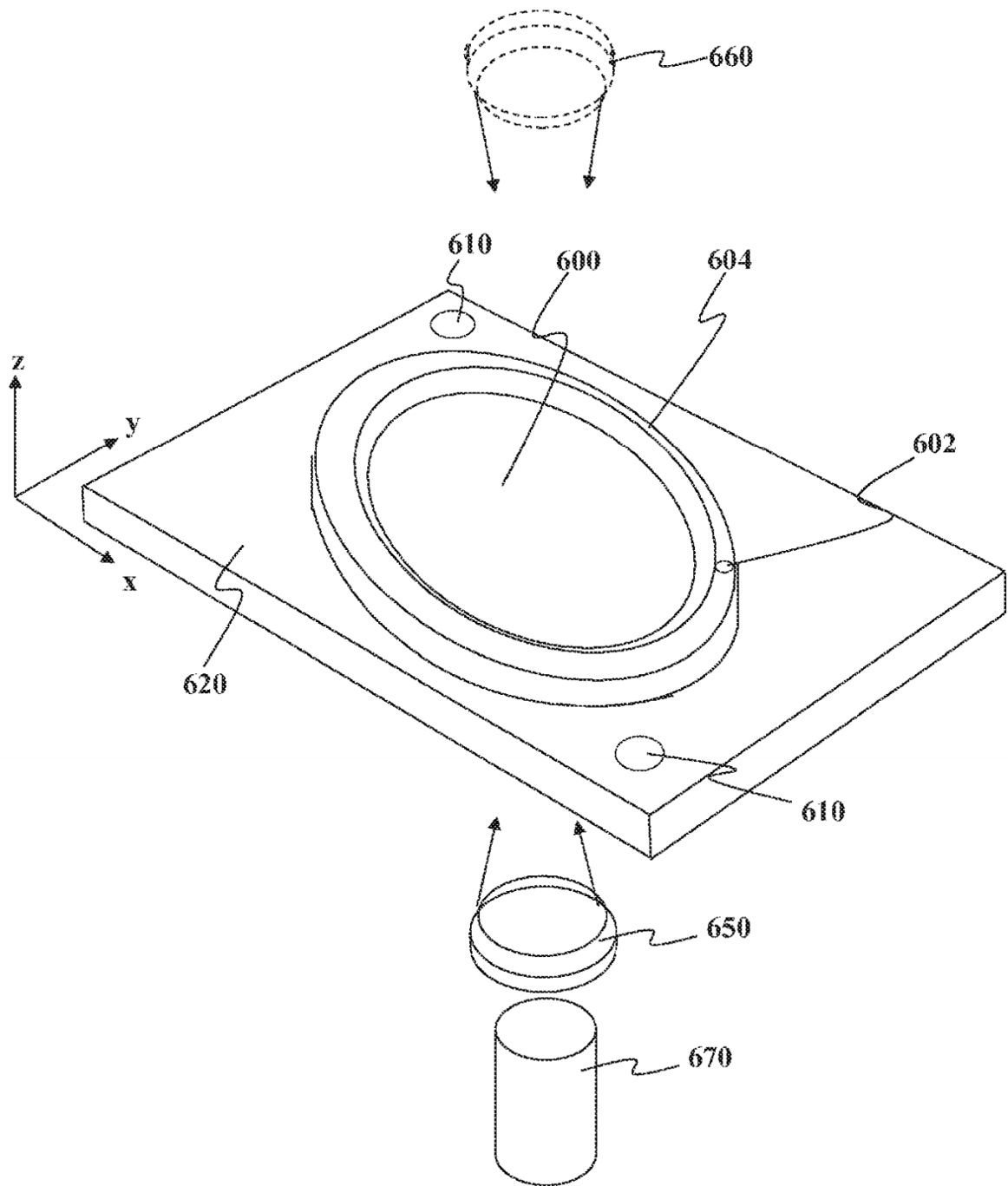


Figura 6B

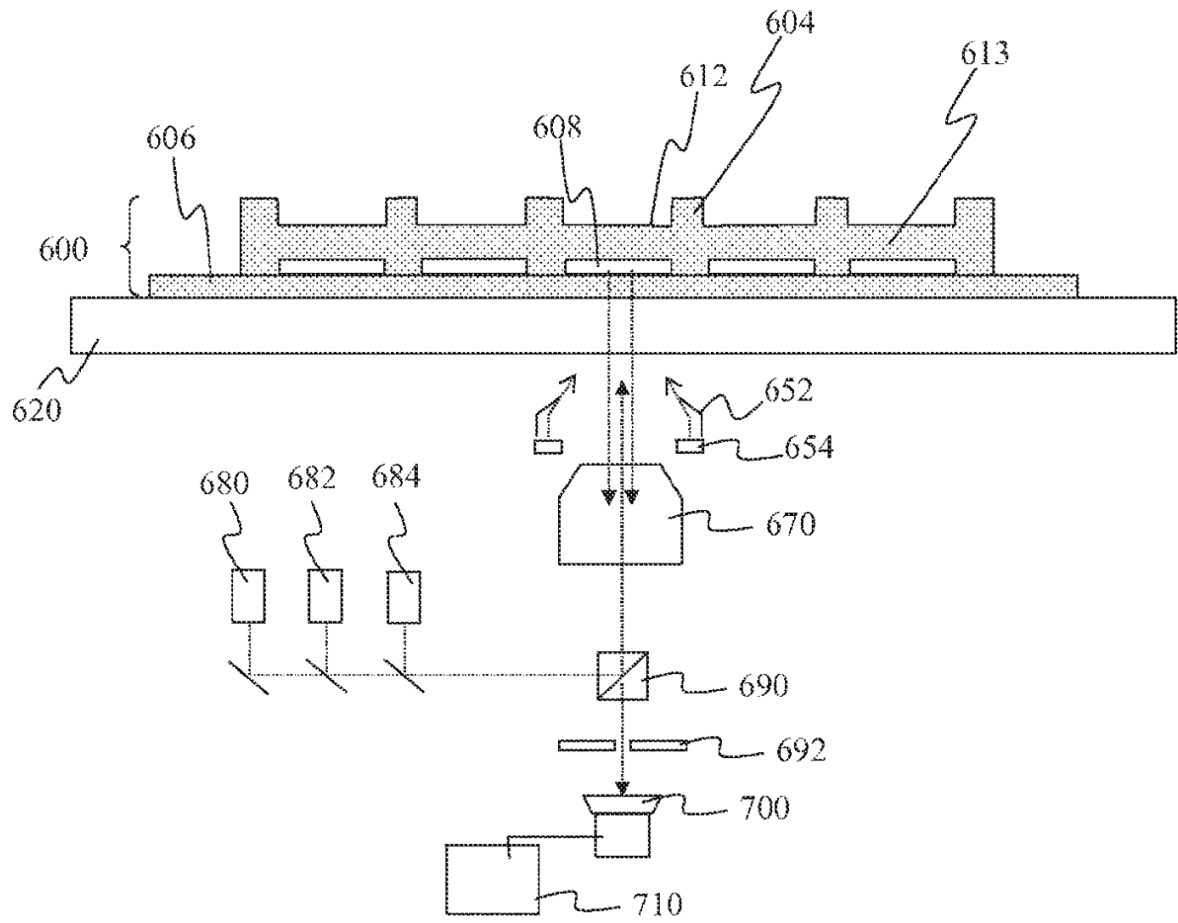


Figura 7A

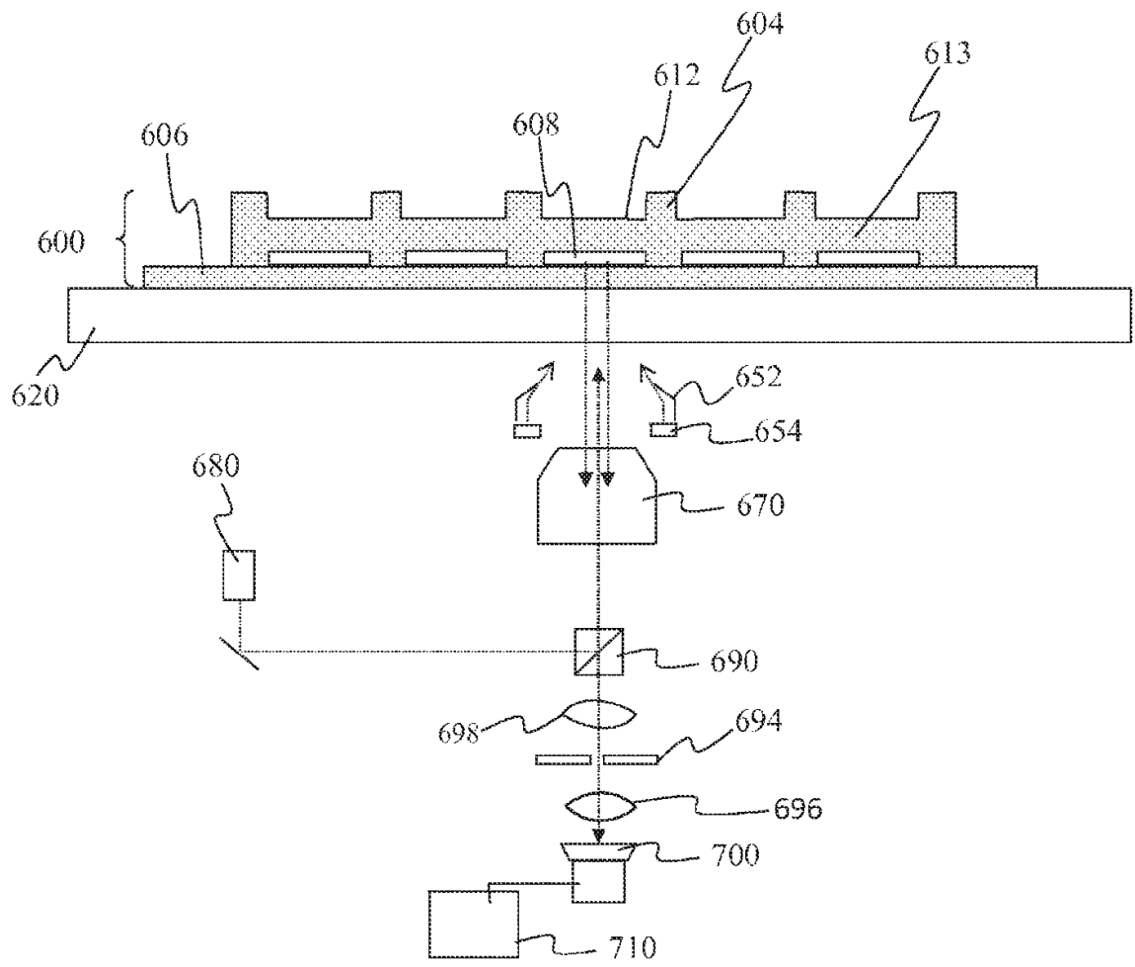


Figura 7B

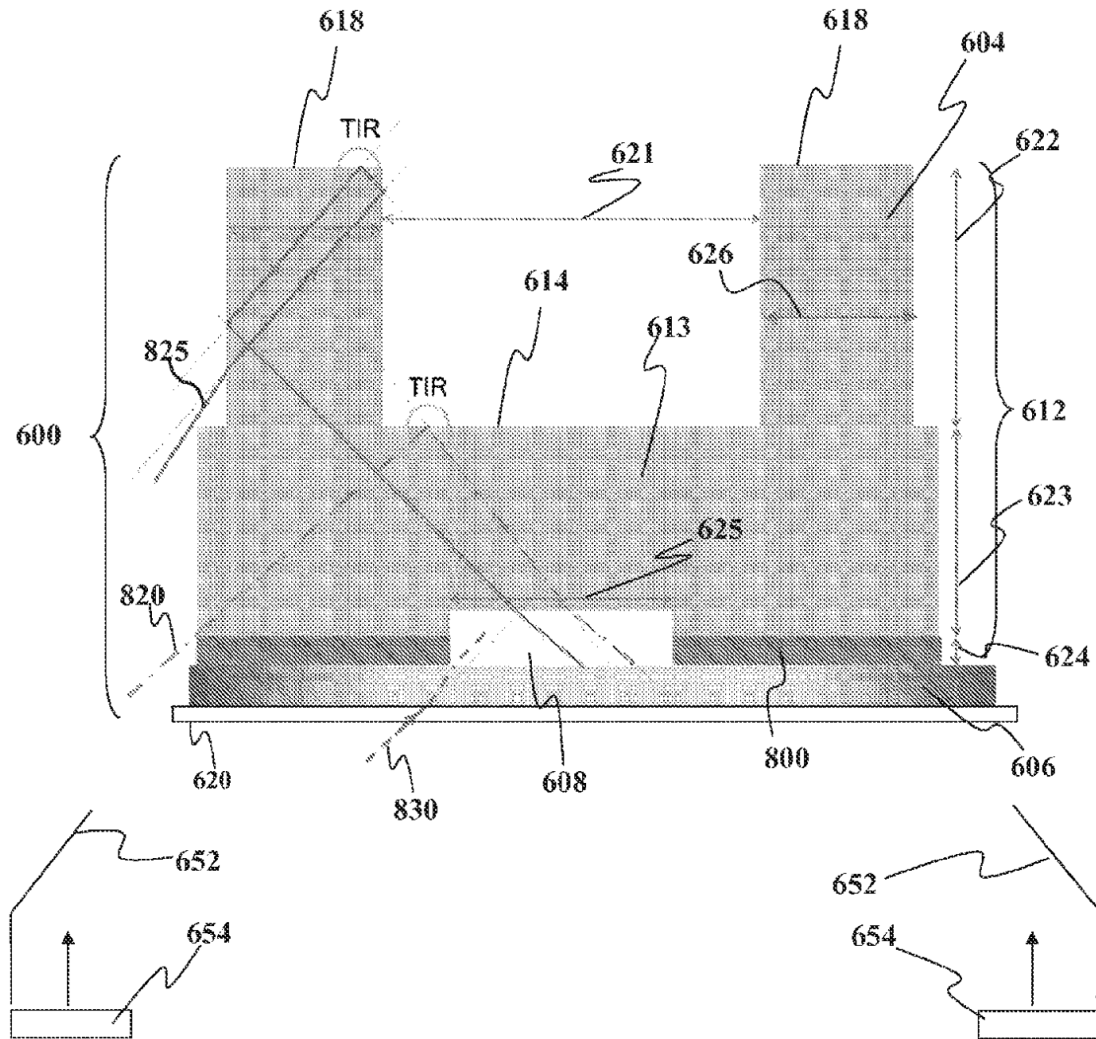


Figura 8A

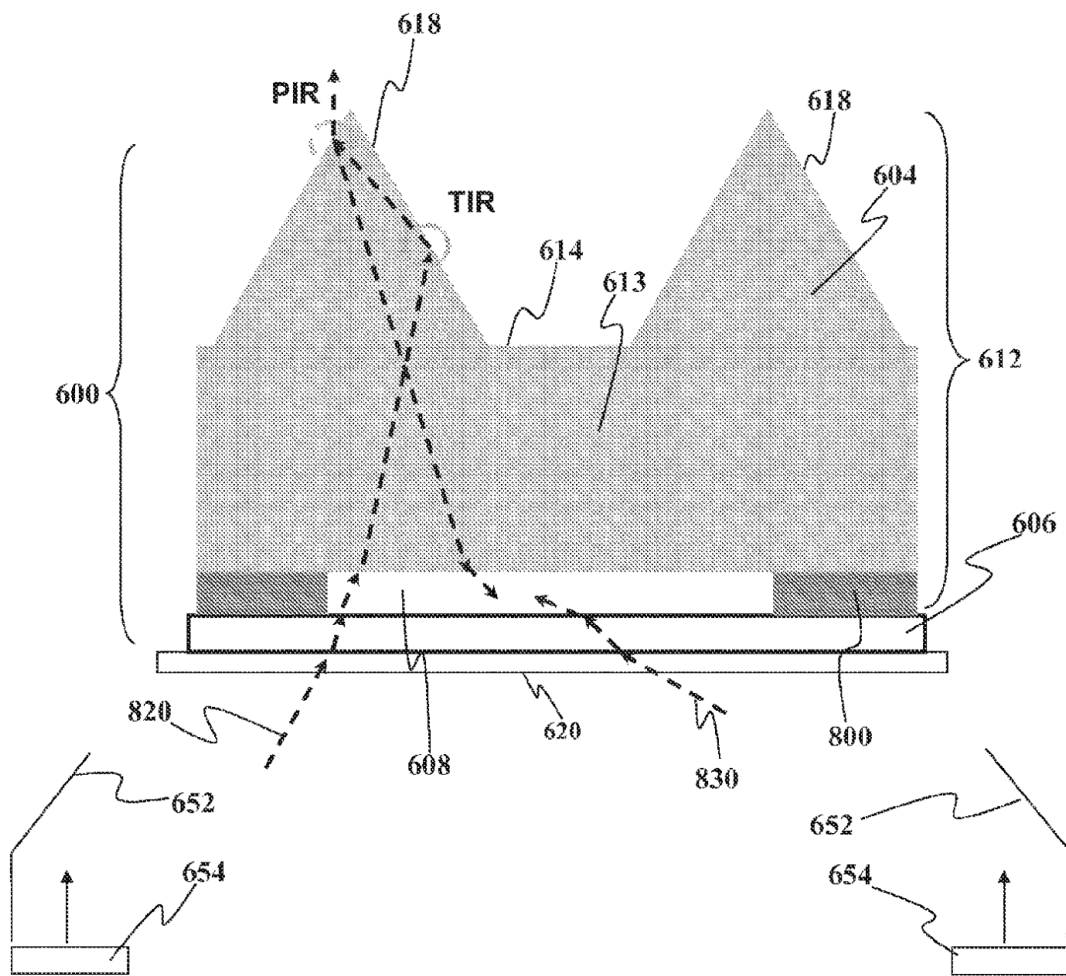


Figura 8B

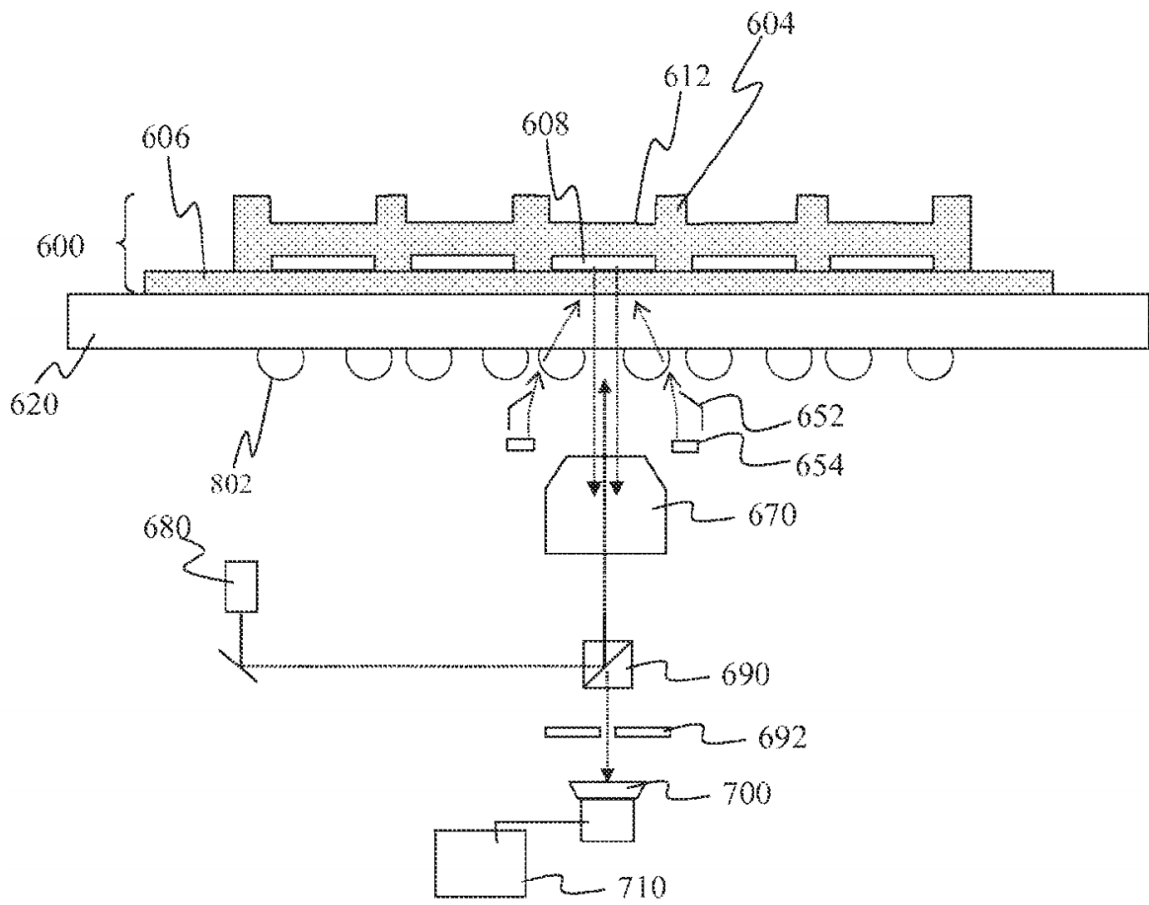


Figura 8C

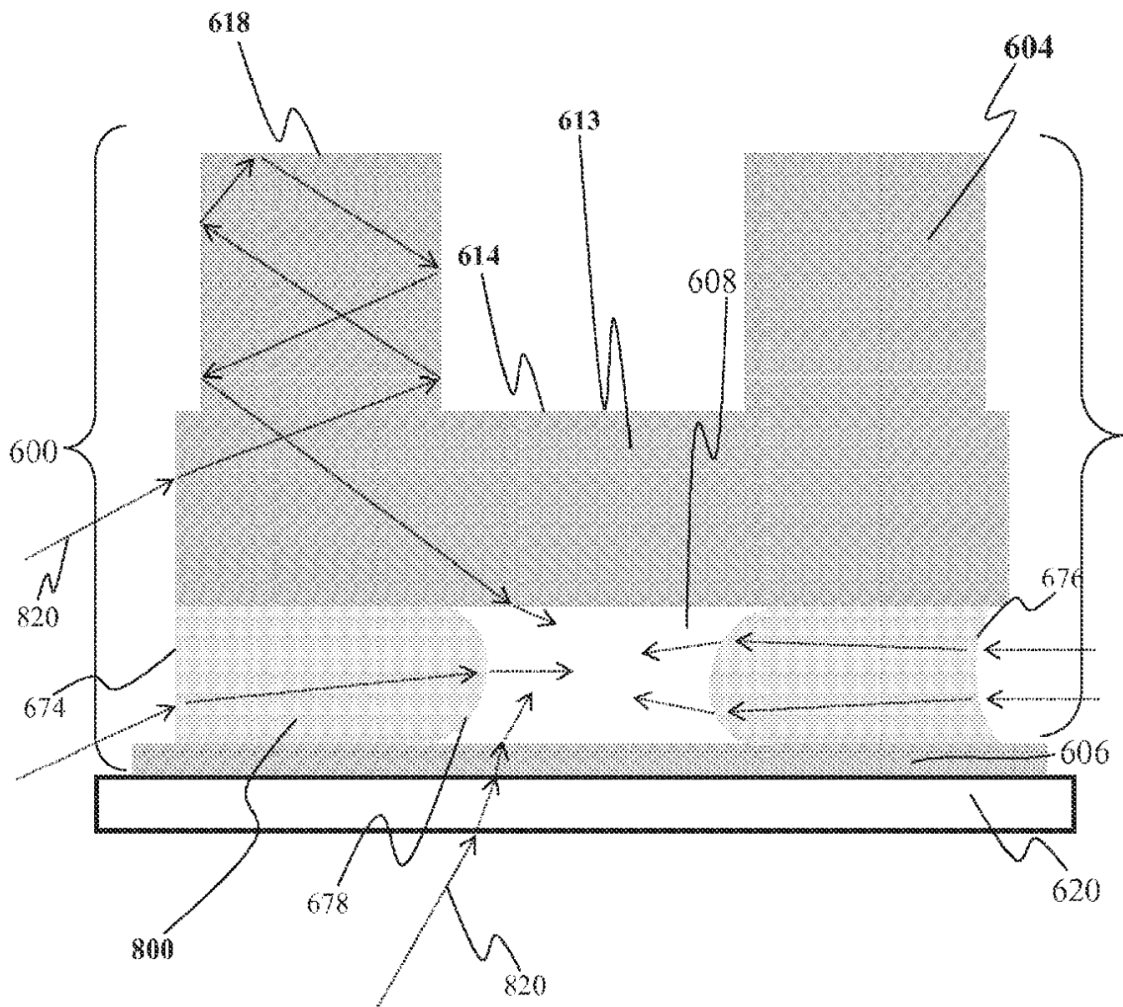


Figura 8D

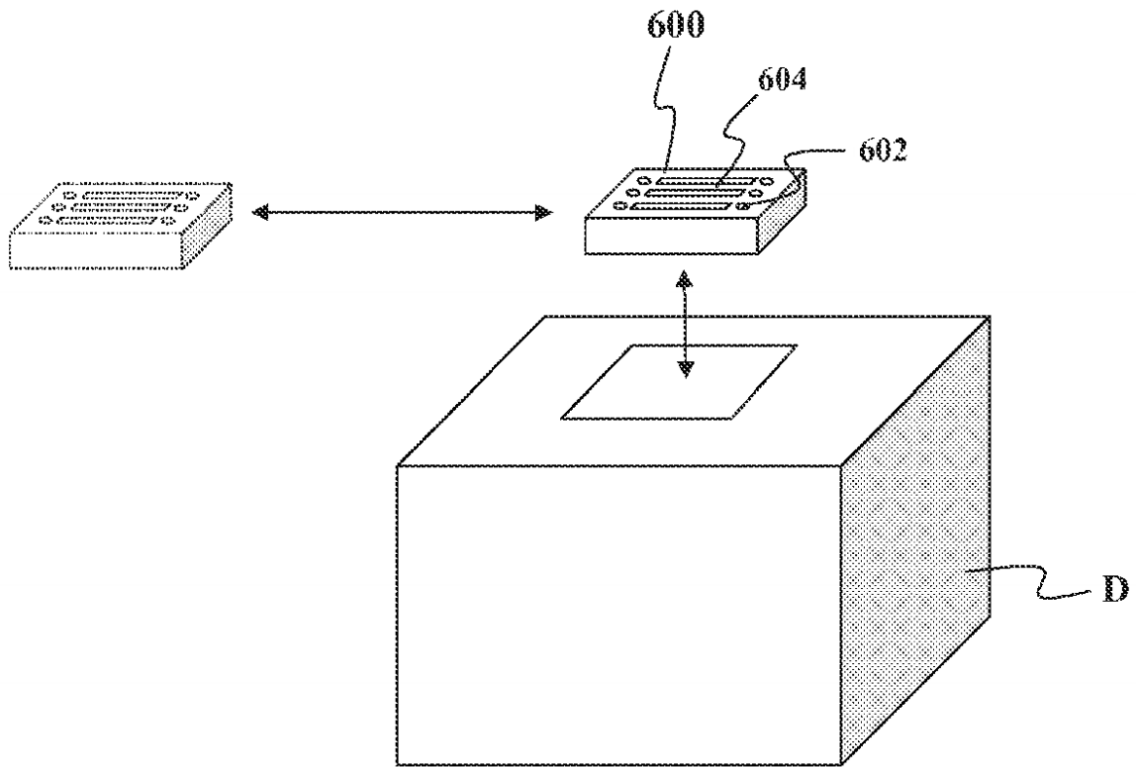


Figura 8E

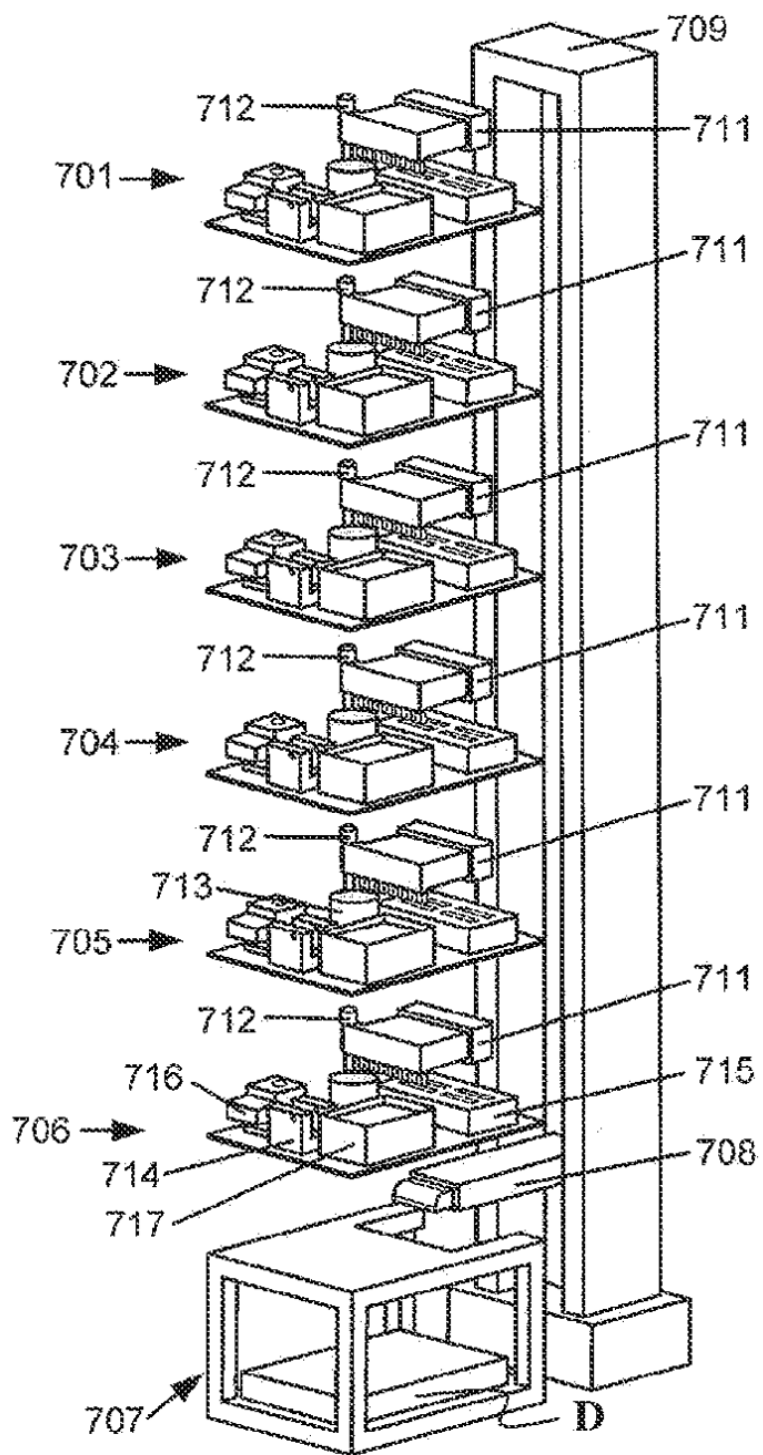
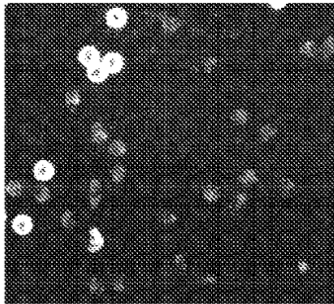
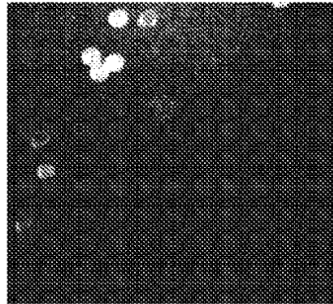


Figura 8F



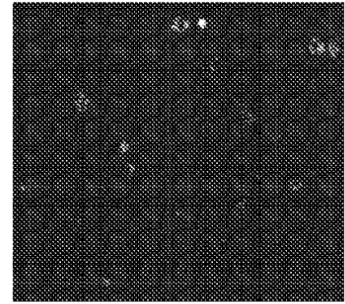
Dispersión

9A



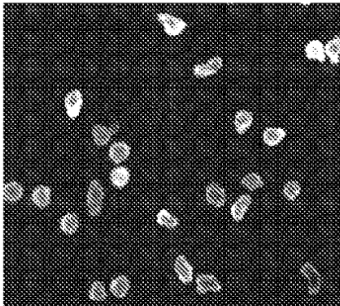
CD14-Pacific Blue para Monocitos

9B



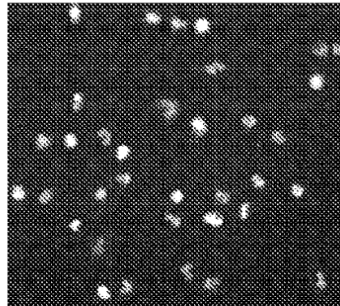
CD123-PECy5 para Basófilos

9C



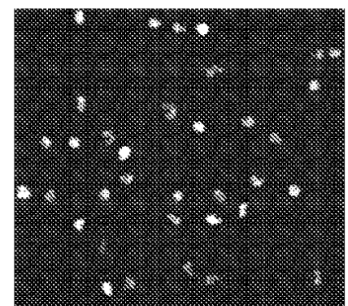
CD16-PE para Neutrófilos

9D



CD45-AF647 para todos los leucocitos

9E



Draq5 como tinción nuclear

9F

Figura 9

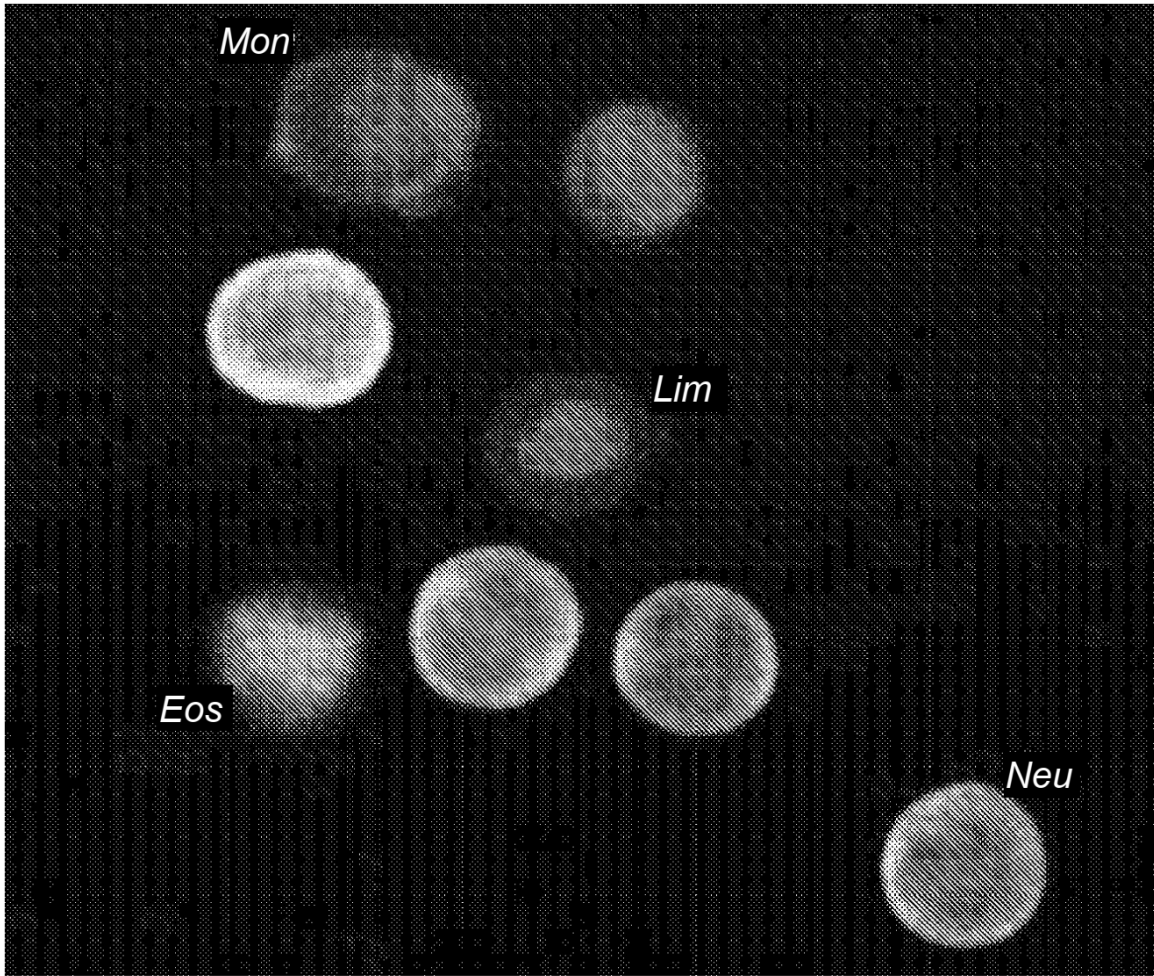


Figura 10

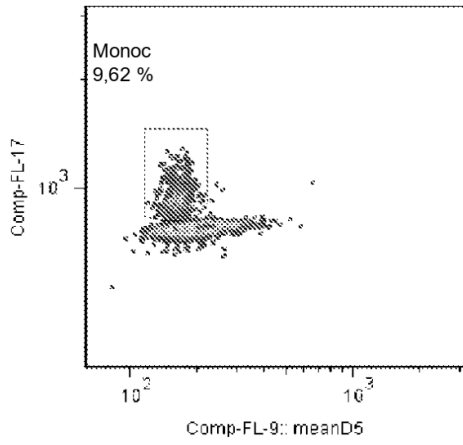


Figura 11A

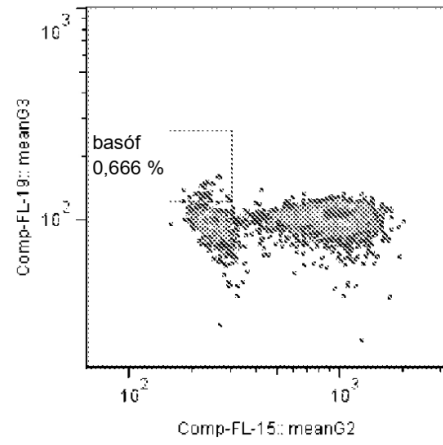


Figura 11B

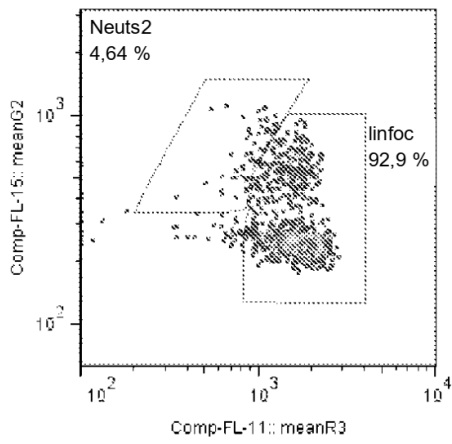


Figura 11C

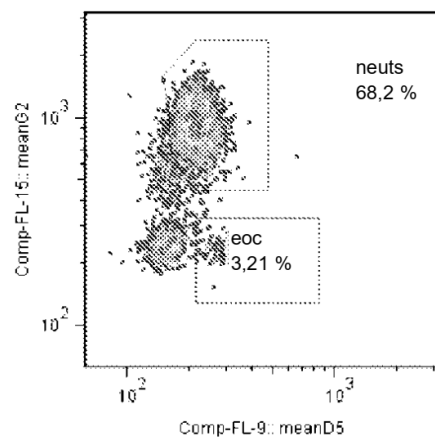


Figura 11D

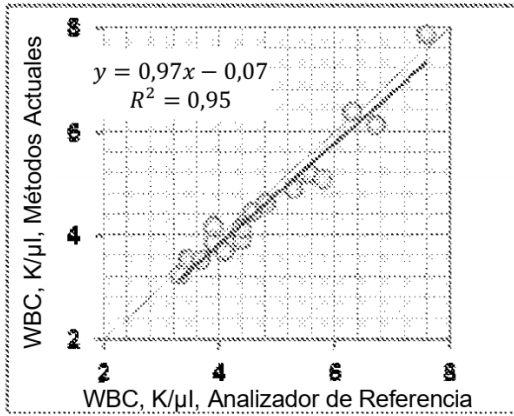


Figura 12A

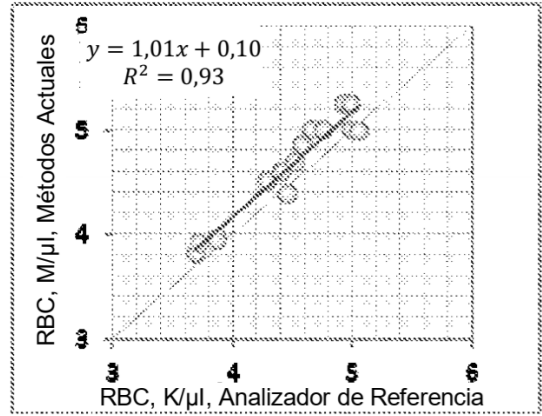


Figura 12B

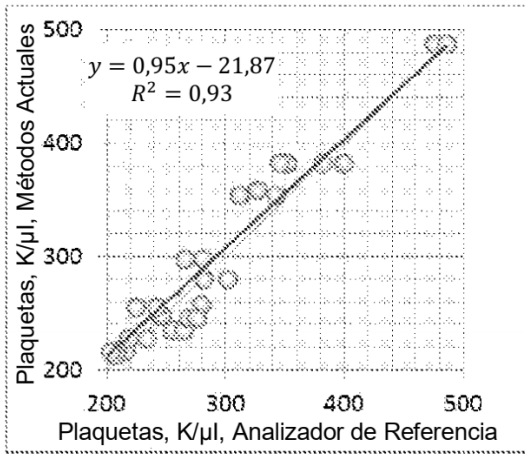


Figura 12C

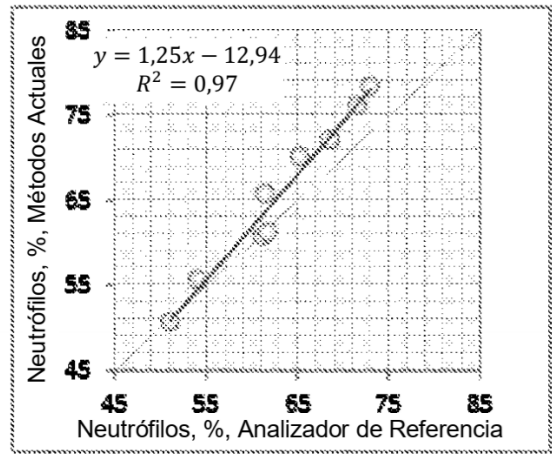


Figura 12D

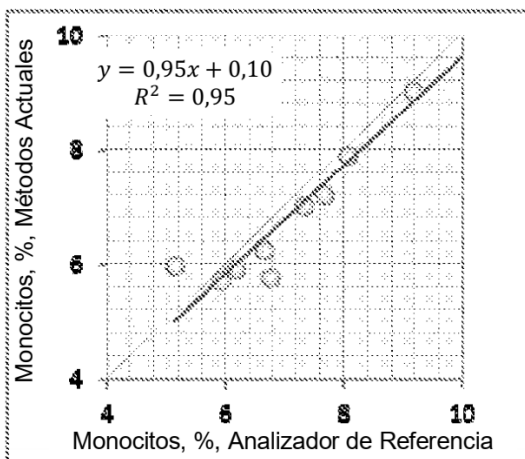


Figura 12E

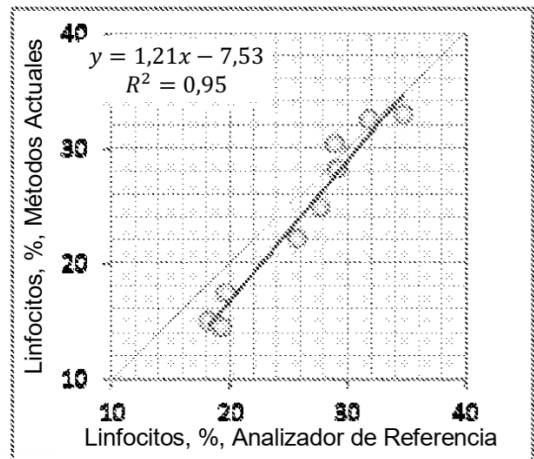


Figura 12F

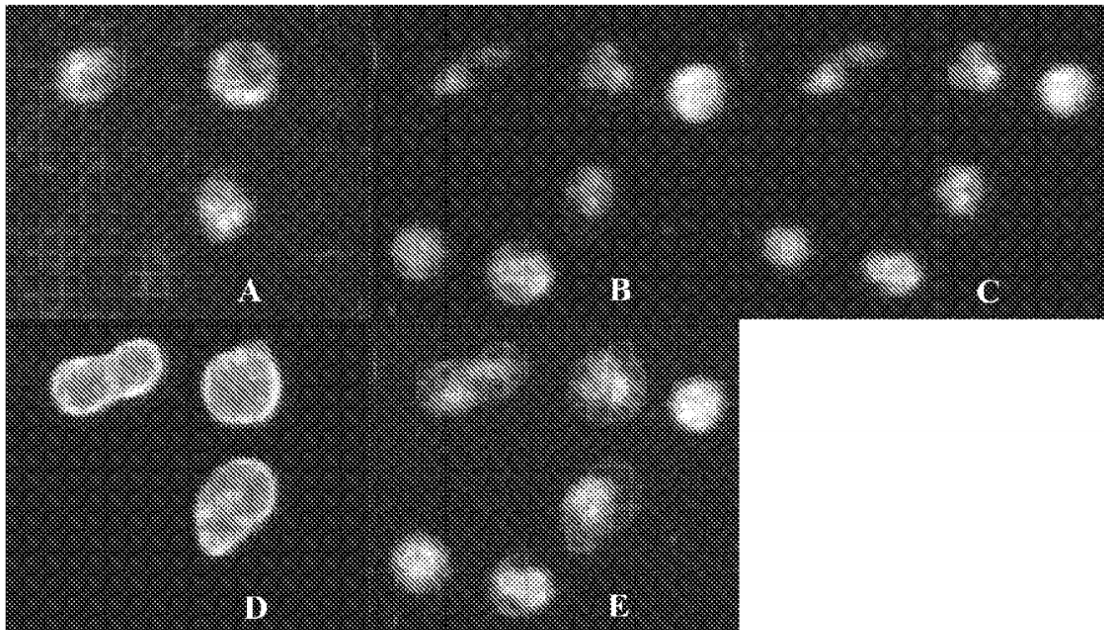


Figura 13

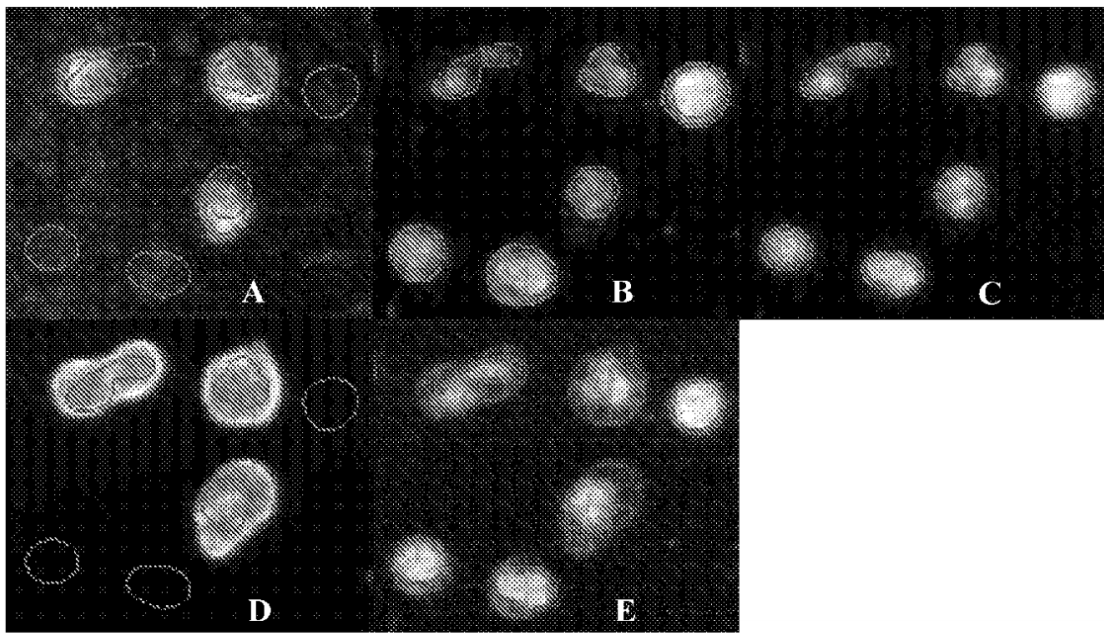


Figura 14

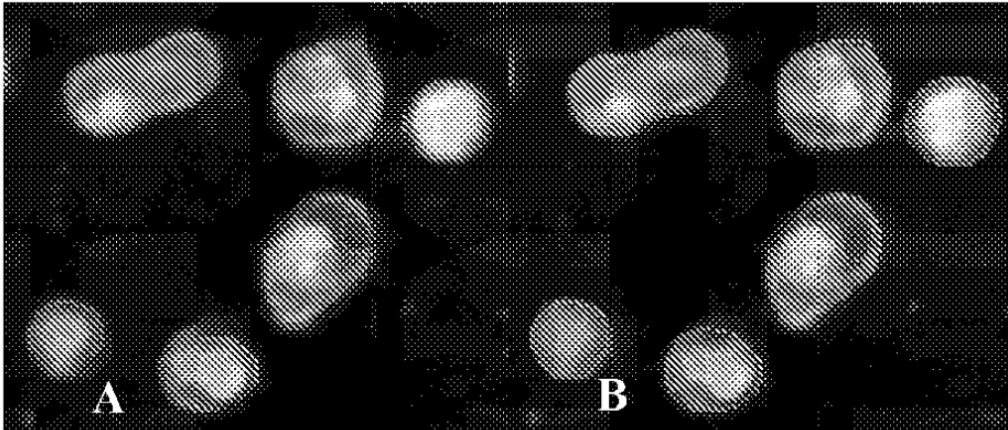


Figura 15