

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 943 382**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 15/00 (2006.01)

G01N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2015** **PCT/EP2015/081156**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.06.2017** **WO17108129**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2015** **E 15823163 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2023** **EP 3362777**

54 Título: **Celda de flujo para el análisis de partículas en un líquido que va a ser examinado, procedimiento y uso**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.06.2023

73 Titular/es:

SIEMENS HEALTHCARE GMBH (100.0%)
Henkestraße 127
91052 Erlangen, DE

72 Inventor/es:

HAYDEN, OLIVER;
RICHTER, LUKAS y
UGELE, MATTHIAS

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 943 382 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

Celda de flujo para el análisis de partículas en un líquido que va a ser examinado, procedimiento y uso

La invención se refiere a un dispositivo para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado. Además, la invención se refiere a un dispositivo para la observación microscópica de partículas en un líquido que va a ser examinado. Además, la invención se refiere a un procedimiento para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado. Además, la invención se refiere al uso de una celda de flujo y un dispositivo de generación de ondas para la generación piezoacústica de ondas de sonido.

La sangre consiste en varios componentes que están presentes en la sangre en diferentes concentraciones. Las células rojas de la sangre, también llamadas eritrocitos, representan el 98 % de la sangre, las plaquetas, también llamadas trombocitos, comprenden por el contrario sólo 1,9 % de la sangre y las células blancas de la sangre, también llamadas leucocitos, tienen incluso sólo una proporción de 0,1 % en la sangre. Cuando se desea examinar sólo los componentes de la sangre con baja proporción, es decir, las plaquetas o las células blancas de la sangre, existen dos formas de operar posibles. Bien sea se detectan las células rojas de la sangre presentes con una frecuencia mayor de hasta mil veces, junto con el tipo de célula de interés, es decir, los trombocitos o los leucocitos, o antes del análisis se eliminan las células rojas de la sangre, para concentrar de modo correspondiente los componentes interesantes en el líquido del análisis.

En el primer tipo de aproximación se prolonga notablemente el tiempo total de análisis, es decir en un factor correspondiente a la relación entre la proporción de las células rojas de la sangre y la proporción del tipo de célula que va a ser analizada. Además, al respecto se eleva de modo extremo la cantidad de datos que deben procesarse. En el segundo tipo de aproximación, es necesaria una operación antes del verdadero análisis, en la cual se eliminan del líquido de análisis los componentes de la sangre que no van a ser analizados. Sólo con el segundo procedimiento se alcanza una reducción aceptable en el tiempo de análisis. Los procedimientos convencionales de análisis descansan en métodos eléctricos, como por ejemplo el principio de Coulter. El principio del contador de Coulter se basa en la medición del cambio del promedio de conductividad eléctrica entre dos electrodos. Éstos se sumergen en un líquido conductor de la electricidad, que contiene partículas con una conductividad diferente a la del líquido. El dispositivo de medición usado durante el procedimiento comprende dos cámaras de medición. En cada una de las dos cámaras, que están separadas una de otra por una abertura estrecha, está dispuesto un electrodo de medición. Al respecto, el tamaño de la abertura está determinado por el tamaño de las partículas que van a ser examinadas.

Otros procedimientos convencionales de análisis se basan en métodos ópticos. En este contexto, se menciona la citometría de flujo. Al respecto, se analizan las células que van a ser examinadas en un líquido, que pasan con elevada velocidad individualmente en un campo eléctrico o un rayo de luz. Dependiendo de la forma, estructura o coloración de las células, surgen como resultado diferentes efectos, sobre cuya base se determinan las propiedades de las respectivas células. Este principio es usado por ejemplo en aparatos de análisis de hematología o citómetros de flujo por fluorescencia. En la citometría de flujo por fluorescencia, se clasifican en diferentes recipientes de reactivo células dotadas con un marcador fluorescente, dependiendo de la coloración.

El documento US 2014/0147860 A1 describe la citometría de flujo acústico en partículas biológicas. En particular, el documento US 2014/0147860 divulga un dispositivo para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado, que exhibe un paso de proceso para la separación y ubicación de las partículas que van a ser examinadas, que comprende:

- un paso de flujo, a través del cual se mueve con una primera tasa de flujo el líquido que va a ser examinado, con por lo menos una entrada, a través de la cual fluye el por lo menos un líquido de revestimiento con por lo menos una segunda tasa de flujo en el primer paso de flujo, de modo que el por lo menos un líquido de revestimiento fluye por lo menos un flujo de revestimiento en el paso de flujo y el líquido que va a ser examinado fluye longitudinalmente respecto al por lo menos un flujo de revestimiento a través del paso de flujo,

- un dispositivo de generación de ondas para la generación piezoacústica de ondas de sonido, que se propagan a través del paso de flujo transversalmente respecto a la dirección de flujo del líquido que va a ser examinado y forman nodos de ondas en un plano de observación de modo que, debido al efecto de presión de las ondas de sonido en dirección transversal, las partículas que van a ser examinadas del líquido que va a ser examinado se desplazan transversalmente al plano de observación y se concentran allí, de modo que el plano de observación corre a través del por lo menos un flujo de revestimiento y las partículas que van a ser examinadas se concentran en el por lo menos un líquido de revestimiento,

en donde el dispositivo comprende además un elemento de accionamiento para la generación de los flujos individuales del por lo menos un líquido de revestimiento y del líquido que va a ser examinado.

Además, para el análisis de los componentes sanguíneos también se usa la microscopía. Al respecto, se colorean por ejemplo células sobre un portaobjetos y se observa con un microscopio. Puede alcanzarse una elevada eficiencia de las células que van a ser examinadas, cuando la coloración de las células con sustancias fluorescentes y una observación por microscopía, se combinan con citometría de flujo.

Para la separación de partículas que van a ser examinadas en líquidos se usan también procedimientos con líquidos de revestimiento altamente viscosos (denominado en inglés como "*sheath flow*") y separación piezoacústica de células. Tales procedimientos son descritos por ejemplo en los documentos US 2004/0070757 A1, US 2010/0009333 A1, Laurel et al., Chem. Soc. Rev., 2007, 36, 492-506 y A. Nilsson et al., Micro Total Analysis Systems 2002, Kluwer Academic Publishers, Nara, Japón 2002.

No obstante, los procedimientos mencionados no fueron usados hasta ahora para concentrar componentes débilmente concentrados de líquidos que va a ser examinados.

Por ello, es un objetivo de la presente invención indicar un dispositivo mejorado y un procedimiento correspondiente para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado, que es adecuado para el análisis de partículas débilmente concentradas en líquidos que van a ser examinados.

Este objetivo es logrado mediante un dispositivo para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado, de acuerdo con la reivindicación 1, un dispositivo para la observación microscópica de partículas en un líquido que va a ser examinado de acuerdo con la reivindicación 11, un procedimiento para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado de acuerdo con la reivindicación 13 y un uso de una celda de flujo y un dispositivo de generación de ondas para la generación piezoacústica de ondas de sonido de acuerdo con la reivindicación 14.

El dispositivo de acuerdo con la invención para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado exhibe un paso de proceso para la separación y ubicación de las partículas que van a ser examinadas. El paso de proceso comprende un paso de flujo, a través del cual se mueve, con una primera tasa de flujo, el líquido que va a ser examinado. Un paso de flujo tal es configurado preferiblemente de modo que los líquidos que fluyen a través del paso de flujo, lo hacen de modo laminar. Para ello se eligen diámetros adecuados del paso de flujo y las tasas de flujo o las velocidades de flujo de los líquidos que fluyen a través del primer paso de flujo. El paso de flujo puede ser realizado por ejemplo mediante el uso de un elemento conductor o un elemento constituyente tubular, el cual es preferiblemente ópticamente transparente. Como tasa de flujo debería definirse un volumen de líquido que fluye a través de una sección transversal, por unidad de tiempo.

El paso de flujo comprende por lo menos una entrada, a través de la cual fluye en el paso de flujo en cada caso por lo menos un líquido de revestimiento con por lo menos una segunda tasa de flujo, de modo que el por lo menos un líquido de revestimiento forma por lo menos un flujo de revestimiento en el paso de flujo y el líquido que va a ser examinado fluye a través del paso de flujo, longitudinalmente respecto al por lo menos un flujo de revestimiento. Como flujo de revestimiento debería entenderse en este contexto por consiguiente un flujo de líquido, que rodea un otro flujo de líquido al menos en una dirección o fluye a lo largo de un lado del otro flujo de líquido en su dirección de flujo, en donde el flujo de revestimiento y el otro flujo de líquido fluyen en la misma dirección. Sin embargo, el flujo de revestimiento puede exhibir una velocidad y una tasa de flujo diferentes a las del otro flujo de líquido que lo rodea o que fluye a su lado. Como líquido de flujo de revestimiento, también denominado líquido de revestimiento, se utilizan usualmente las denominadas soluciones amortiguadores, en las cuales permanecen de modo durable partículas que van a ser examinadas o están protegidas por el líquido de soporte frente a los cambios.

El dispositivo de acuerdo con la invención para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado comprende además un dispositivo de generación de ondas para la generación piezoacústica de ondas de sonido. Se entiende por una generación piezoacústica de ondas de sonido, la excitación eléctrica periódica de elementos oscilantes piezocerámicos. Al respecto, los elementos oscilantes piezocerámicos se excitan con ayuda de un campo eléctrico hasta dar una oscilación mecánica, mediante la cual a su vez se causan ondas de sonido, que se propagan en el líquido que fluye a través del paso de flujo. Mediante el arreglo de elementos de reflexión opuestos al dispositivo de generación de ondas, se alcanza la formación de ondas estacionarias. En el caso más simple, para ello es suficiente por ejemplo la pared lateral de una tubería, que rodea y conduce el líquido que fluye a través del paso de flujo.

Las ondas de sonido generadas con ayuda de los elementos oscilantes piezocerámicos se propagan a través del paso de flujo transversalmente a la dirección de flujo del líquido que va a ser examinado y forman nodos de ondas en un plano de observación de modo que, debido al efecto de presión de las ondas de sonido en dirección transversal, desplazan las partículas que van a ser examinadas del líquido que va a ser examinado al plano de observación y allí se concentran. Se alcanza un enriquecimiento de las partículas que van a ser examinadas en el plano de observación porque durante el desplazamiento de las partículas que van a ser examinadas se utiliza su comportamiento cinemático específico por la influencia de ondas de sonido. Por ejemplo, en comparación con el resto de partículas, por las ondas de sonido las partículas con dimensiones relativamente grandes se mueven con mayor velocidad en dirección transversal, comparada con las partículas pequeñas. Esta diferencia en velocidad puede ser usada por ejemplo para que se concentren claramente más partículas grandes en el plano de observación, que las partículas más pequeñas indeseadas.

Las partículas que van a ser examinadas son transportadas en la dirección de propagación de las ondas de sonido hasta los nodos de ondas, donde ya no son expuestas a ninguna fuerza en dirección transversal y se mueven por ello sólo en dirección del flujo. Un plano de observación o una zona de observación comprende una sección estrechamente limitada en dirección transversal respecto a la dirección de flujo en el paso de flujo, en la cual con un dispositivo de

observación óptica usado para la observación de las partículas que van a ser examinadas pueden observarse de manera aguda objetos, en particular las partículas que van a ser examinadas. La extensión de la zona de observación en dirección transversal depende por consiguiente de la profundidad de foco del dispositivo de observación óptica usado. Además, la posición de la zona de observación en dirección transversal depende del ajuste y arreglo del dispositivo de observación óptica.

En el control de las entradas o de dispositivos para el movimiento de líquidos, el valor de la por lo menos una segunda tasa de flujo es elegido de modo que el por lo menos un flujo de revestimiento exhibe una sección transversal predeterminada, de modo que el plano de observación o la zona de observación corre a través del por lo menos un flujo de revestimiento y las partículas que van a ser examinadas se concentran en el por lo menos un flujo de revestimiento o en el por lo menos un líquido de revestimiento. La elección o control de las tasas de flujo ocurre mediante una unidad de control que predice y sincroniza mutuamente valores para las tasas de flujo individuales, y controla el elemento de accionamiento para la generación de los flujos individuales de los líquidos de revestimiento y del líquido que va a ser examinado, de modo correspondiente a las tasas de flujo determinadas.

De este modo, por consiguiente se descentra el flujo central, de modo que durante la separación pueden desplazarse del flujo central las partículas que van a ser examinadas a un flujo de revestimiento preferiblemente de alta transparencia y encontrarse allí simultáneamente en el plano de observación o en la zona de observación. Las partículas que van a ser examinadas, así separadas pueden entonces ser observadas fácilmente en el flujo de revestimiento preferiblemente de alta transparencia corriente abajo, con un correspondiente dispositivo de observación, sin que el resto de partículas que se encuentran en el flujo central, pudiesen perturbar o incluso impedir la vista de las partículas que van a ser examinadas. Con ayuda del dispositivo de acuerdo con la invención para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado, se alcanza por consiguiente un enriquecimiento de partículas que van a ser examinadas en un plano de observación. Adicionalmente, con ayuda de las ondas acústicas puede alcanzarse también una alineación de las partículas que van a ser examinadas, de modo correspondiente a la orientación del plano de observación, de modo que éstas pueden ser bien observadas. Para la alineación de las partículas se elige una dirección de propagación de las ondas acústicas, perpendicular al plano de observación. Con ello puede renunciarse a una adición de sustancias poliméricas para la alineación de las partículas que van a ser examinadas, como se aplica convencionalmente, o al menos reducirse la duración durante la cual se exponen las partículas que van a ser examinadas a los polímeros, para su alineación. Puesto que las sustancias poliméricas mencionadas pueden cambiar de manera indeseada su forma exterior por efecto muy prolongado sobre las partículas que van a ser examinadas, es particularmente ventajoso si puede limitarse su uso o incluso renunciarse por completo a él. De esta manera puede preservarse por consiguiente la calidad de las partículas que van a ser observadas, y a pesar de ello alcanzarse una óptima alineación de estas partículas, de manera que se alinean de manera correspondiente a una orientación de un plano de observación.

El hecho de que las partículas que van a ser examinadas puedan ser levantadas del flujo de partículas a otro plano, y por ello sean retiradas del flujo de líquido que va a ser examinado, de modo que los componentes que se encuentran en el flujo principal no tienen ninguna influencia interferente en la observación de las partículas que van a ser examinadas, puede ser muy ventajoso para ese efecto por ejemplo durante el examen de sangre, que pueda usarse, contrario a los procedimientos convencionales para el examen, sangre no diluida que exhibe una viscosidad más elevada que la sangre diluida. Con ello, sin embargo es adecuada de manera particular para flujos laminares, como ocurre en el dispositivo de acuerdo con la invención descrito. Con flujos laminares no ocurre la mezcla de los líquidos de revestimiento con el flujo central, de modo que puede realizarse en forma particularmente efectiva una separación de partículas del flujo central.

El dispositivo de acuerdo con la invención para la observación microscópica de partículas en un líquido que va a ser examinado comprende un dispositivo de acuerdo con la invención para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado. Además el dispositivo de acuerdo con la invención para la observación microscópica partículas en un líquido que va a ser examinado exhibe un microscopio, que está dispuesto en una posición longitudinal del primer paso de flujo para la observación de partículas del líquido que va a ser examinado en el plano de observación. Un microscopio tal puede ser en particular un microscopio óptico, pero puede ser también un microscopio electrónico o un microscopio de otro tipo adecuado para la observación de líquidos. Con el microscopio pueden identificarse y contarse por ejemplo partículas individuales que van a ser examinadas. Además, con ayuda del microscopio pueden diferenciarse o clasificarse las partículas que van a ser examinadas. Por ejemplo pueden diferenciarse leucocitos, trombocitos y eritrocitos. Además puede realizarse también una clasificación de los tipos de partículas observadas, en subespecies. Por ejemplo pueden clasificarse leucocitos de acuerdo con cinco subtipos diferentes.

Pueden observarse también detalles de las partículas que van a ser examinadas. Debido a la separación de las partículas que van a ser examinadas y al desplazamiento de estas partículas al plano de observación o a la zona de observación del microscopio, puede limitarse la observación a las partículas que van a ser examinadas, sin que partículas interferentes impidan la vista. Puesto que las partículas interferentes no ocurren o lo hacen sólo de manera reducida durante una observación de un líquido que contiene las partículas que van a ser observadas en la zona de observación, no tienen que ser examinadas adicionalmente y eventualmente ser descartadas, de modo que se facilita claramente una observación y análisis del líquido que contiene las partículas que van a ser observadas y, debido al bajo número de las partículas que van a ser verificadas, se acelera notablemente.

Las partículas que van a ser verificadas son desplazadas de manera focalizada mediante la fuerza acústica o la fuerza de las ondas de sonido, al plano de examen o plano de observación de un microscopio, para enriquecer éstas allí o empobrecer las partículas más pequeñas, como por ejemplo eritrocitos o trombocitos respecto a las partículas grandes, en particular los leucocitos. De esta manera puede alcanzarse un enriquecimiento de, por ejemplo, 200-2000 veces de los leucocitos.

Durante el procedimiento de acuerdo con la invención para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado, se mueve un líquido que va a ser examinado con una primera tasa de flujo, a través de un paso de flujo. Además, se introduce en el paso de flujo por lo menos un líquido de revestimiento con por lo menos una segunda tasa de flujo a través de una primera entrada, de modo que el por lo menos un líquido de revestimiento forma un primer flujo de revestimiento en el paso de flujo y el líquido que va a ser examinado fluye longitudinalmente respecto al por lo menos un flujo de revestimiento, a través del paso de flujo. Además, se generan de modo piezoacústico ondas de sonido. Las ondas de sonido se propagan a través del paso de flujo, transversalmente o a través de la dirección de flujo del líquido que va a ser examinado y forman un nodo de ondas en un plano de observación de modo que, debido al efecto de presión de las ondas de sonido en dirección transversal, se desplazan las partículas que van a ser examinadas del líquido que va a ser examinado al plano de observación, y allí se concentran. Al respecto, se elige el valor de la por lo menos una segunda tasa de flujo, de modo que el por lo menos un flujo de revestimiento exhibe una sección transversal predeterminada, de manera que el plano de observación corre a través del por lo menos un flujo de revestimiento y las partículas que van a ser examinadas se concentran en el por lo menos un líquido de revestimiento. Las partículas desplazadas al plano de observación o a la zona de observación que van a ser examinadas pueden ser observadas fácilmente entonces con una unidad óptica de observación, como por ejemplo un microscopio.

Durante el procedimiento de acuerdo con la invención ocurre un uso de una celda de flujo y de un dispositivo de generación de ondas, para la generación piezoacústica de ondas de sonido, en particular de un dispositivo de acuerdo con la invención para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado, para la separación de leucocitos de un plasma sanguíneo. Como ya se mencionó, durante la observación convencional de leucocitos ocurre el problema de la presencia de estos sólo en baja concentración en la sangre. Una observación o examen de los leucocitos sin su separación conduce por ello al respecto a que también se consideren las células rojas de la sangre y tengan que ser descartadas. Ventajosamente, durante el uso del dispositivo de acuerdo con la invención se usa el hecho de que las células blancas de la sangre se mueven más rápidamente bajo la influencia de las ondas de sonido, en comparación con los otros componentes de la sangre. Mediante el uso de este hecho pueden reemplazarse y separarse, con ayuda de ondas de sonido, ahora en un plasma sanguíneo que fluye a lo largo, las células blancas de la sangre transversalmente respecto a la dirección de flujo. La observación del bajo número, en comparación con el gran número de células rojas de la sangre, de células blancas de la sangre separadas, es realizada a continuación con muy bajo esfuerzo, de modo que ventajosamente el tiempo de observación se reduce claramente.

Los componentes esenciales del dispositivo de acuerdo con la invención para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado pueden estar configurados en una parte predominante en forma de componentes de software. Esto se refiere en particular a partes del dispositivo de generación de ondas, como por ejemplo una unidad de control para el control de la generación de ondas de sonido. Además, esto se refiere también a unidades de control que se usan para el control de las tasas de flujo de los líquidos que van a fluir a través de las entradas del paso de flujo.

Básicamente, estos componentes pueden ser realizados también algunas veces, en particular cuando se trata de cálculos particularmente rápidos, en forma de hardware soportado por software, por ejemplo FPGAs o similares. Así mismo, las interfaces necesarias, por ejemplo cuando se trata sólo de una adopción de datos de otros componentes de software, pueden estar configuradas como interfaces de software. Sin embargo, pueden estar configuradas también como interfaces constitutivas con hardware, que son controladas mediante software adecuado.

Una realización ampliamente ejecutada por software tiene como ventaja que también ya pueden actualizarse unidades de control usadas hasta ahora, de manera simple mediante una actualización de software, para trabajar según el modo de acuerdo con la invención. A este respecto, el objetivo es logrado también mediante un correspondiente producto de programa de ordenador con un programa de ordenador, el cual puede ser cargado directamente en un dispositivo de almacenamiento de un dispositivo de control del dispositivo de acuerdo con la invención, para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado, con secciones de programa, para realizar todas las etapas del procedimiento de acuerdo con la invención, cuando el programa es realizado en el dispositivo de control. Un producto de programa de ordenador así puede comprender, aparte del programa de ordenador, dado el caso componentes adicionales como por ejemplo una documentación y/o componentes adicionales, también componentes de hardware, como por ejemplo llaves de hardware (claves, etc.), para el uso del software.

Para el transporte hasta el dispositivo de control y/o para el almacenamiento de o en el dispositivo de control puede servir un medio legible en ordenador, por ejemplo una memoria, un disco duro u otro portador de datos fijo o transportable, en los cuales se almacenan las secciones de programa del programa de ordenador que pueden ser leídas y realizadas por una unidad de ordenador del dispositivo de control. La unidad de ordenador puede exhibir por ejemplo para ello uno o varios microprocesadores que trabajan juntos, o similares.

Las reivindicaciones dependientes así como la siguiente descripción contienen en cada caso configuraciones y desarrollos ventajosos de la invención. Al respecto, en particular las reivindicaciones de una categoría de reivindicaciones pueden también estar desarrolladas de manera análoga a las reivindicaciones dependientes de otra categoría de reivindicaciones. Además, en el marco de la invención, los diferentes rasgos de diferentes ejemplos de realización y reivindicaciones pueden combinarse también para dar nuevos ejemplos de realización.

En una configuración del dispositivo para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado, el paso de flujo exhibe una primera entrada a través de la cual fluye en el paso de flujo un primer líquido de revestimiento con una segunda tasa de flujo. Además, el paso de flujo comprende una segunda entrada opuesta a la primera entrada, a través de la cual fluye en el paso de flujo un segundo líquido de revestimiento con una tercera tasa de flujo. La primera entrada y la segunda entradas están dispuestas de modo opuesto de tal forma que el primer líquido de revestimiento forma un primer flujo de revestimiento en el paso de flujo y el segundo líquido de revestimiento forma un segundo flujo de revestimiento en el paso de flujo, de modo que el líquido que va a ser examinado fluye entre el primer flujo de revestimiento y el segundo flujo de revestimiento a través del paso de flujo. Los valores de la segunda tasa de flujo y de la tercera tasa de flujo son elegidos de modo que los flujos de revestimiento exhiben una sección transversal predeterminada, de manera que el plano de observación corre a través de uno de los dos flujos de revestimiento. Con ayuda de los dos flujos de revestimiento puede ajustarse una posición del flujo central del líquido que va a ser examinado, en la sección transversal del paso de flujo o en dirección transversal respecto a la dirección de flujo. En particular mediante ello puede lograrse que el flujo central ya no fluya en el plano de observación, de manera que las partículas que van a ser examinadas puedan ser elevadas desde el flujo central al plano de observación. El uso de dos flujos de revestimiento permite una ubicación libre del flujo central, así como una mayor flexibilidad en la elección del plano de observación al cual se transfieren las partículas que van a ser examinadas, donde pueden ser observadas con ayuda de un aparato de observación, como por ejemplo un microscopio.

En una configuración del dispositivo de acuerdo con la invención para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado, el paso de flujo está dimensionado de modo que los líquidos que fluyen a través de él, lo hacen de modo laminar. Esto puede ser alcanzado por ejemplo cuando el paso de flujo comprende un canal de microfluído. Si en el paso de flujo predomina un flujo laminar, depende del diámetro del paso de flujo y de la velocidad de los líquidos que fluyen a través de él y de su viscosidad. Para tasa de flujo y viscosidad dadas, el diámetro del paso de flujo es elegido por consiguiente de manera correspondiente, de forma que los líquidos que pasan por el paso de flujo pueden atravesarlo de modo laminar. La presencia de un flujo laminar tiene como ventaja, que en el paso de flujo no ocurren turbulencias que pudiesen conducir a una mezcla indeseada de flujo central y flujo de revestimiento.

En una configuración preferida del dispositivo de acuerdo con la invención para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado, el líquido que va a ser examinado comprende plasma sanguíneo. Como ya se mencionó, el dispositivo de acuerdo con la invención para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado, es particularmente bien adecuado para la separación y subsiguiente observación de leucocitos, que ocurren en concentración relativamente baja en el plasma sanguíneo.

Preferiblemente, con el dispositivo de acuerdo con la invención para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado se fija la posición de los nodos de las ondas acústicas en dirección transversal, para el ajuste de la frecuencia de las ondas de sonido. La posición de los nodos en dirección transversal respecto a la dirección de flujo depende de la longitud de onda de las ondas estacionarias y, con, ello de la frecuencia usada para la excitación de las ondas. De esta manera, se ajusta la posición de los nodos de ondas a una posición deseada de un plano de observación o una zona central de una zona de observación, en dirección transversal a la dirección de flujo.

En una variante particularmente preferida del dispositivo de acuerdo con la invención para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado, las partículas que van a ser examinadas exhiben leucocitos o eritrocitos o trombocitos. El procedimiento descrito de enriquecimiento se aplica también para el enriquecimiento de eritrocitos. Los eritrocitos tienen un tamaño de 5 a 6 μm y tienen un tamaño doble de los trombocitos, que es de aproximadamente 1,5 a 3,5 μm . Con ello, con ayuda de ondas de sonido se separan también los eritrocitos de los trombocitos. Además, también podría conectarse en serie un paso adicional de proceso al paso de proceso descrito, lo cual separa aun los leucocitos de los eritrocitos y funciona de manera análoga al paso de proceso descrito.

Los trombocitos pueden ser separados de la manera descrita anteriormente por ello como partículas más pequeñas, como resultado de la separación de todos los componentes sanguíneos, es decir, los leucocitos y los eritrocitos, y de la desviación del flujo central con los trombocitos al plano de observación.

De modo particular, preferiblemente el dispositivo de acuerdo con la invención para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado exhibe un paso de separación conectado en serie con el paso de flujo. Al respecto, el paso de separación exhibe un paso de flujo adicional con un flujo central con un líquido, inicialmente libre de las partículas que van a ser examinadas y por lo menos un flujo de revestimiento, denominado a continuación como flujo de revestimiento del paso de separación, el cual fluye longitudinalmente respecto al flujo central a través del paso de flujo del paso de separación, y exhibe el líquido que va a ser examinado. Preferiblemente, el por lo menos un flujo de revestimiento del paso de separación rodea al flujo central. En este contexto, como flujo central debería considerarse un flujo de líquido que fluye junto al por lo menos otro flujo de líquido, en este caso un flujo de revestimiento. Como se

describió, el flujo central está preferiblemente rodeado por el por lo menos un flujo de revestimiento, de modo que fluye entonces de modo central a través del paso de flujo.

En esta variante, el paso de separación exhibe además un dispositivo adicional de generación de ondas para la generación piezoacústica de ondas de sonido, las cuales se propagan transversalmente a la dirección de flujo del líquido que va a ser examinado, a través del paso de flujo del paso de separación, y forman un nodo de ondas en un plano a través del flujo central de modo que, debido al efecto de presión de las ondas de sonido en dirección transversal, desplaza partículas, en particular partículas con un diámetro mayor en comparación con otros tipos de partículas, en el líquido que va a ser examinado, al flujo central, y allí se concentran. En esta variante particularmente preferida, ocurre por consiguiente una separación adicional de las partículas que van a ser examinadas, desde el líquido que va a ser examinado, antes de la separación de las partículas que van a ser examinadas y su desplazamiento al plano de observación, de modo que se eleva la efectividad y confiabilidad de la separación de las partículas que van a ser examinadas.

En una variante particularmente ventajosa que va a ser aplicada del dispositivo de acuerdo con la invención para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado, el líquido inicialmente libre de las partículas que van a ser examinadas es transparente. La elevada transparencia del líquido libre de las partículas que van a ser examinadas permite una observación simplificada de partículas que van a ser examinadas transferidas a este líquido.

En una configuración particularmente ventajosa del dispositivo de acuerdo con la invención para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado, el dispositivo de generación de ondas del paso de separación y del paso de proceso está configurado de modo que la dirección de propagación de las ondas de sonido en el paso de separación y la dirección de propagación de las ondas de sonido en el paso de flujo del paso de proceso corren de modo mutuamente ortogonal, y ortogonal respecto a la dirección de flujo del líquido que va a ser examinado.

Alternativamente, el paso de separación y el paso de proceso están configurados de modo que la separación en el paso de separación y el subsiguiente desplazamiento del flujo central en el paso de proceso, corren en la misma dirección.

Para ello, pueden cambiarse las dimensiones de un canal que define el paso de flujo o la ruta de flujo, o posicionar el dispositivo de generación de ondas lateralmente, y no verticalmente.

La alineación de la dirección de propagación de las ondas acústicas está determinada por la forma geométrica de los elementos de conducción que rodean al paso de flujo, y por la alineación y posición de una unidad de observación que le va a ser asignada, como por ejemplo un microscopio de observación.

En una variante especial del dispositivo de acuerdo con la invención para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado, se amplía el paso de flujo del paso de proceso antes de la posición longitudinal del dispositivo de generación de ondas del paso de proceso, transversalmente a la dirección de flujo, de modo que se reducen la velocidad de flujo del líquido que va a ser examinado y del por lo menos un líquido de revestimiento. Como consecuencia de la menor velocidad de flujo, se observan y analizan más fácilmente las partículas que van a ser examinadas, puesto que permanecen más tiempo en el cual las partículas se mantienen en la zona de observación de un aparato de observación usado.

Preferiblemente, el dispositivo de acuerdo con la invención para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado exhibe una unidad de adición de amortiguador. La unidad de adición de amortiguador está dispuesta para añadir un amortiguador a la solución hipotónica del flujo central o del líquido que va a ser examinado. Con ayuda del amortiguador adicional se disuelven partículas con elevada presión osmótica intracelular, mientras permanecen partículas con baja presión osmótica intracelular.

Durante la separación de células blancas de la sangre de un plasma sanguíneo, con ayuda de la solución adicional amortiguadora se disuelven células rojas de la sangre debido a su elevada presión osmótica intracelular, mientras permanecen las células blancas de la sangre. Esta medida hace posible con ello una separación ampliamente mejorada de las células blancas que van a ser examinadas de la sangre, del plasma sanguíneo.

De modo particular preferiblemente, el dispositivo de acuerdo con la invención para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado exhibe una unidad que preferiblemente está conectada con la segunda entrada y está adaptada para añadir marcadores para la partícula objetivo al por lo menos un líquido de revestimiento. Los marcadores pueden tener propiedades químicas específicas, de modo que se unen sólo con determinados componentes que van a ser analizados en un líquido que va a ser examinado. Por ejemplo pueden exhibir un color especial y con ello marcar fácilmente los componentes de interés del líquido que va a ser examinado. El uso de marcadores facilita por consiguiente la trazabilidad de las partículas que van a ser observadas en un líquido que va a ser examinado. Los marcadores pueden tener también propiedades físicas, que facilitan o también hacen posible una separación de las partículas adheridas a ellos. Por ejemplo, podrían dotarse con marcadores adecuados básicamente partículas de difícil separación, de modo que los procedimientos de separación descritos anteriormente sean aplicables de manera más fácil y efectiva. Ocasionalmente puede ocurrir una situación en la cual diferentes partículas presentes en un líquido tengan casi el mismo tamaño y por ello sean sólo difícilmente separadas unas de otras, con ondas de

sonido. Si ahora se dotan las partículas de interés con marcadores de correspondientes dimensiones grandes, a pesar de ello puede ocurrir una separación de las partículas de interés, con ayuda de ondas de sonido.

Además, el dispositivo para la observación microscópica de partículas en un líquido que va a ser examinado puede exhibir una unidad de recolección, que está dispuesta conectada en serie al paso de proceso, corriente abajo de la posición longitudinal del microscopio y está adaptada para recolectar las partículas en estudio. Las partículas recolectadas pueden a continuación ser examinadas adicionalmente con otro método de examen, que requiere un enriquecimiento de las partículas examinadas, preferiblemente métodos de biología molecular. De este modo puede usarse varias veces, sucesivamente y para diferentes exámenes, la separación focalizada de partículas que van a ser examinadas y enriquecimiento, con ayuda del dispositivo de acuerdo con la invención.

El dispositivo de acuerdo con la invención para la observación microscópica de partículas en un líquido que va a ser examinado puede exhibir además una unidad de transferencia de partículas, que está dispuesta corriente abajo, es decir, conectada después del paso de proceso, detrás de la posición longitudinal del microscopio, y configurada para la transferencia de las partículas, en particular las partículas que se examinan, del paso de flujo a un portaobjetos, para el examen adicional de las partículas. Una unidad tal de transferencia puede ser por ejemplo parte de la unidad de recolección descrita y exhibir una abertura a través de la cual se mueven las gotas de líquido concentrado con las partículas que se examinan, de modo que a continuación caen sobre un portaobjetos. El portaobjetos puede ser usado como un medio de transporte de las partículas que se examinan hasta otra posición, en la cual se ejecutan otros exámenes.

La invención es ilustrada una vez más en más detalle a continuación con referencia a las figuras anexas, en virtud de los ejemplos de realización.

La FIG 1 muestra una representación esquemática de un dispositivo para el examen de células blancas de la sangre de acuerdo con un ejemplo de realización de la invención,

la FIG 2 muestra una representación esquemática de un proceso de separación de células blancas de la sangre en un paso de separación,

la FIG 3 muestra una representación esquemática de un desplazamiento de células blancas de la sangre a un plano de observación,

la FIG 4 muestra una sinopsis de los procedimientos de separación y desplazamiento de un dispositivo para el examen de células blancas de la sangre, durante la aplicación de una solución hipotónica de acuerdo con un ejemplo de realización de la invención,

la FIG 5 muestra una representación esquemática de un dispositivo para el examen de células blancas de la sangre de acuerdo con un ejemplo de realización de la invención, con un portaobjetos conectado en serie,

la FIG 6 muestra un diagrama de flujo, con el cual se ilustra el curso de un procedimiento para el examen de células blancas de la sangre, de acuerdo con un ejemplo de realización de la invención.

Se describe un primer ejemplo de realización de un dispositivo 1 para el examen de células WBC blancas de la sangre, en relación con las FIG 1 a FIG 3.

En la FIG 1 se representa una vista superior sobre un sistema 1 de canal de microfluído, en el que como celda de flujo para el examen de células WBC blancas de la sangre sirve un dispositivo para el examen de partículas en un líquido que va a ser examinado, de acuerdo con un ejemplo de realización de la invención. El sistema de canal de microfluído comprende un paso S1 de separación, un paso S2 de proceso conectado en serie con el paso de separación y una unidad S3 de recolección que sigue al paso del proceso. La vista superior ocurre sobre el plano x/y. Al respecto, la dirección de flujo del líquido que va a ser examinado es la dirección x. Adicionalmente, en la FIG 1 se representa la parte presentada al lado derecho, es decir, el paso S2 de proceso, que comprende un paso F de flujo, y la unidad S3 de recolección del sistema 1 de canal de microfluído, abajo a la derecha en la imagen en vista lateral, es decir en el plano x/z.

El sistema 1 de canal de microfluído exhibe un paso S1 de separación. El paso S1 de separación comprende una primera entrada E1, en la cual fluye el plasma BL sanguíneo con una primera tasa v_1 de flujo en el sistema 1 de canal de microfluído. Adicionalmente, el sistema 1 de canal de microfluído comprende una segunda entrada E2, a través de la cual fluye un líquido PF libre del plasma sanguíneo, en este caso un líquido PF amortiguador, con una segunda tasa v_2 de flujo. Los dos líquidos BL, PF son combinados en un paso F1 de flujo o una primera sección F1 de paso de flujo, e incluso de modo que el líquido PF amortiguador forma un flujo ZS central y el plasma BL sanguíneo forma un flujo de revestimiento del paso MS de separación alrededor del líquido PF amortiguador, que fluye a lo largo de ambos lados por fuera del flujo ZS central. Debido a las pequeñas dimensiones del canal 1 de microfluído (el ancho está entre 100 y 1500 μm y la altura es de aproximadamente 30 a 500 μm) el flujo ZS central y el flujo de revestimiento del paso MS de separación se comportan, para velocidades típicas de flujo, en cada caso de modo laminar de modo que fluyen a lo largo uno de otro, sin mezclarse. El plasma BL sanguíneo que se va a examinar fluye en el flujo ZS central en ambos lados a lo largo y después de pasar la primera sección F1 de paso de flujo, finalmente vuelve a una zona SB

de drenaje, la cual en la FIG 1 está dibujada en el lado de la primera entrada E1 opuesto a la segunda entrada E2, es decir, totalmente a la izquierda. El plasma BL sanguíneo comprende en el ejemplo de realización mostrado en la FIG 1 células RBC rojas de la sangre, células WBC blancas de la sangre y plaquetas PLT.

En la primera sección F1 de paso de flujo está dispuesto también un primer dispositivo WE1 de generación de ondas para la generación piezoacústica de ondas AW de sonido (véase la FIG 2). El primer dispositivo WE1 de generación de ondas está simbolizado en la FIG 1 con una estrella. con ayuda del primer dispositivo WE1 de generación de ondas se generan ondas AW de sonido que se propagan perpendicularmente a la dirección de flujo (véase la FIG 2), que forman nodos de ondas en una zona central de la primera sección F1 de paso de flujo, en la cual corre el flujo ZS central. Las células WBC blancas de la sangre, que se suspenden en el flujo de revestimiento del paso MS de separación, son desviadas por las ondas AW de sonido en dirección del flujo ZS central, debido a su tamaño, con mayor velocidad que otros componentes de la sangre BL, como por ejemplo células RBC rojas de la sangre o plaquetas PLT. De esta manera, en la primera sección F1 de paso de flujo ocurre un primer enriquecimiento de células WBC blancas de la sangre en el flujo ZS central.

En el otro curso PR del proceso ocurre ahora una transición del flujo ZS central a un paso S2 de proceso del sistema 1 de canal de microfluído. El paso S2 de proceso comprende un paso F de flujo con una segunda F2, una tercera F3 y una cuarta sección F4 de paso de flujo. En la segunda sección de paso de flujo del paso F de flujo fluyen desde una tercera entrada E3 un líquido PF1 amortiguador con una tercera tasa v_3 de flujo y desde una cuarta entrada E4 en dirección z opuesta a la tercera entrada E3, fluye un líquido PF2 amortiguador con una cuarta tasa v_4 de flujo a la segunda sección de paso de flujo del paso F de flujo. Los dos líquidos PF1, PF2 amortiguadores forman en cada caso un primer o un segundo flujo MS1, MS2 de revestimiento y limitan el flujo ZS central con las células WBC blancas de la sangre a una zona que está entre los dos flujos MS1, MS2 de revestimiento, que no está en un plano de observación o una zona BA de observación de un microscopio M usado posteriormente para la observación (véase también la FIG 2). Esta estructura de flujo es alcanzada en una tercera sección F3 de paso de flujo. En la tercera sección F3 de paso de flujo se ensancha el canal 1 de microfluído en dirección y, es decir transversalmente a la dirección de flujo, para reducir la velocidad del primer y segundo flujos MS1, MS2 de revestimiento y del flujo ZS central. Es necesaria una ralentización de las velocidades de flujo para poder observar a continuación con un microscopio M las células WBC blancas de la sangre individuales. Como se reconoce en una representación magnificada en la FIG 1, la posición del flujo ZS central depende de la magnitud de las tasas v_3 , v_4 de flujo del primer y segundo flujos de revestimiento. Si $v_4 < v_3$, entonces el flujo central está desplazado en dirección z hacia arriba. Si $v_4 = v_3$, entonces el flujo ZS central está, mirado en dirección z, exactamente en el centro de la sección transversal del paso F de flujo, y si $v_4 > v_3$, entonces el flujo ZS central está, mirado en dirección z, por debajo del centro de la sección transversal del paso F de flujo.

En una cuarta sección F4 de paso de flujo, con ayuda de un segundo dispositivo WE2 de generación de ondas (simbolizado en la FIG 1 como estrella) se generan nuevamente, perpendicularmente a la dirección de flujo, ondas AW de sonido que se propagan, sin embargo se propagan en este caso en dirección z y no en dirección y. Las ondas AW de sonido, en donde se trata preferiblemente de ondas estacionarias, exhiben de nuevo nodos KN de ondas, que sin embargo esta vez no están en la zona de flujo del flujo ZS central, sino que están adyacentes a la zona de flujo de uno de los dos flujos MS1, MS2 de revestimiento (en la FIG 3 los nodos KN están en el primer flujo MS1 de revestimiento). Los nodos de ondas están sin embargo en el plano BA de observación o, visto en dirección z, a la altura de la zona BA de observación del microscopio M. Debido a las ya ilustradas diferencias de tamaño, ahora nuevamente las células WBC blancas de la sangre son desviadas preferiblemente al plano BA de observación, es decir, llegan al primer flujo MS1 de revestimiento (véase la FIG 3), a través del cual corre también el plano BA de observación del microscopio M. El primer flujo MS1 de revestimiento es preferiblemente incoloro, de modo que las células WBC blancas de la sangre que se encuentran en el primer flujo MS1 de revestimiento son bien reconocidas. En una sección B de observación dispuesta en el extremo de la cuarta sección F4 de paso de flujo, ocurre ahora perpendicularmente a la dirección de flujo de las células WBC blancas de la sangre, su observación a través de un microscopio M ubicado perpendicularmente a la dirección de flujo, es decir, alineado en dirección z, en la cuarta sección F4 de paso de flujo. Por ejemplo, con ayuda del microscopio M pueden contarse las células WBC blancas de la sangre y/u observarse su estructura y construcción. A continuación, en una tercera sección del sistema 1 de canal de microfluído, también denominada como zona S3 de recolección, ocurre una recolección de las células WBC blancas de la sangre, que pueden ser usadas a continuación para exámenes adicionales.

En la FIG 2 se muestra de modo magnificado el proceso de separación de las células WBC blancas de la sangre en la primera sección F1 de paso de flujo del paso S1 de separación, y su enriquecimiento en un flujo ZS central que comprende una solución amortiguadora. Como ya se ilustró, las células WBC blancas de la sangre, que se encuentran en el flujo de revestimiento del paso MS de separación, son desviadas con ayuda de ondas AW de sonido en dirección de la zona central de la primera sección F1 de paso de flujo donde, debido al arreglo de los nodos KN de las ondas AW de sonido, permanecen sobre el eje central de la primera sección F1 de paso de flujo en el flujo ZS central. Los nodos KN están indicados mediante líneas que se cruzan. Las ondas AW de sonido son reflejadas en el lado de la frontera de la primera sección F1 de paso de flujo, opuesto al dispositivo WE1 de generación de ondas de sonido y forman ondas estacionarias, que forman los nodos de ondas delineados. Las ondas AW acústicas hacen posible que las células más grandes, en este caso las células WBC blancas de la sangre (con diámetro aproximado de 7 a 15 μm), se muevan más rápidamente en dirección de la zona central de la primera sección F1 de paso de flujo, comparado con las células más pequeñas, como por ejemplo células RBC rojas de la sangre (con diámetro aproximado de 5 a 6 μm). En la zona central de la primera sección F1 de paso de flujo, donde se encuentran los nodos KN de las ondas

AW acústicas, las células WBC blancas de la sangre son movidas sólo por el flujo ZS central laminar y se mueven con ello a lo largo del eje central del canal 1 de microfluído corriente abajo, es decir, en la dirección PR de proceso. Durante el cambio de posición de las células WBC blancas de la sangre perpendicularmente a la dirección de flujo, las células WBC blancas de la sangre son transferidas a otro medio, el medio del flujo ZS central. El flujo ZS central está libre de otras partículas y por ello es altamente transparente. Puede influirse en el diámetro del flujo de revestimiento del paso MS de separación y del flujo ZS central o en su posición así como el enriquecimiento de las células WBC blancas de la sangre en el flujo ZS central, con ayuda de las tasas de flujo v_1 o v_2 del flujo MS de revestimientos o del flujo ZS central. Para una relación entre la primera tasa v_1 de flujo y la segunda tasa v_2 de flujo de 10, se alcanza un enriquecimiento de células WBC blancas de la sangre en el flujo ZS central, que por otro lado está asociado con una fuerte reducción en la proporción de las células rojas de la sangre en el flujo ZS central, en comparación con el plasma BL sanguíneo en el flujo de revestimiento del paso MS de separación.

Como ya se mencionó, el flujo ZS central fluye adicionalmente corriente abajo hasta un paso S2 de proceso y allí fluye en una segunda sección F2 de paso de flujo en una tercera y una cuarta entradas E3, E4 a lo largo, de cuyos primer y segundo flujos MS1, MS2 de revestimiento fluye con tercera y cuarta tasas v_3 , v_4 de flujo al canal 1 de microfluído. Los dos primero y segundo flujos MS1, MS2 de revestimiento controlan la ubicación del flujo ZS central en dirección z. Éste escenario es mostrado de manera magnificada en la FIG 3. Por un lado, la extensión del flujo ZS central, que exhibe una tasa de flujo v_s , es limitada por el primer y segundo flujos MS1, MS2 de revestimiento en dirección z, por otro lado, la ubicación del flujo ZS central es fijada con ayuda de la elección de la tercera y cuarta con tasas V_3 , V_4 de flujo de los dos flujos MS1, MS2 de revestimiento, de modo que el flujo ZS central está por fuera de un plano de observación o de una zona BA de observación de un microscopio M, que está dispuesto en una posición de observación o una sección B de observación del canal 1 de microfluído. Esta ubicación del flujo ZS central ocurre en una tercera sección F3 de paso de flujo. La tasa de flujo del flujo ZS central, denominada inicialmente con v_2 , permanece evidentemente igual, aunque la sección transversal o la superficie de sección transversal del flujo ZS central cambia después de la segunda sección F2 de paso de flujo. Para indicar esto, desde la tercera sección F3 de paso de flujo se usa el signo de referencia " v_s ". La sección transversal del flujo ZS central depende, desde la tercera sección F3 de paso de flujo, de las tasas de flujo del primero y segundo flujos MS1, MS2 de revestimiento.

Para concentrar más las células WBC blancas de la sangre y mantener las células RBC rojas de la sangre todavía presentes en el flujo ZS central fuera de la zona BA de observación, con la ayuda del primero y segundo flujos de revestimiento MS1 y MS2 se mantiene el flujo ZS central en una posición no centrada del canal 1 de microfluído.

En el otro curso PR de proceso, en una cuarta sección F4 de paso de flujo, con ayuda de un segundo dispositivo WE2 de generación de ondas se generan ondas AW acústicas con una dirección de propagación transversal respecto a la dirección de flujo y nodos KN de ondas en el plano de observación o en la zona BA de observación limitada en dirección z. Con ello, como consecuencia de la presión de las ondas AW de sonido, las células WBC blancas de la sangre más grandes son desplazadas al primer flujo MS1 de revestimiento y con ello al plano BA de observación, mientras las células RBC rojas de la sangre más pequeñas permanecen predominantemente en el flujo ZS central. Debido a la fuerza claramente mayor de las ondas AW acústicas, en comparación con las fuerzas de flujo del flujo ZS central y de los dos flujos MS1, MS2 de revestimiento, las células WBC blancas de la sangre tiene suficiente tiempo para cambiar al primer en flujo MS1 de revestimiento, antes de entrar a la sección B de observación. Allí las células WBC blancas de la sangre pueden ser fácilmente observadas en la solución PF1 amortiguadora transparente del primer flujo MS1 de revestimiento. Debido a su limitada profundidad de foco, el microscopio M exhibe una zona BA de observación limitada en dirección z. Dado que las células WBC blancas de la sangre son transferidas exactamente a esta zona BA de observación, pueden ser observadas con resolución óptima.

En la FIG 4 se ilustra el proceso de separación y ubicación de dos pasos ilustrado en las FIG 1 a FIG 3, una vez más mediante una representación secuencial de los dos procedimientos de separación y ubicación, en donde para el ejemplo de realización de acuerdo con la FIG 4 se añade adicionalmente un amortiguador tipo hipotónico para una primera sección F1 de paso de flujo en el flujo ZS central. Mientras en la primera sección F1 de paso de flujo ocurre un primer enriquecimiento de células WBC blancas de la sangre en un flujo ZS central, mediante el desplazamiento de las células WBC blancas de la sangre en dirección y, y estas permanecen sin afectarse también por el amortiguador hipotónico, las células rojas de la sangre, que desde el flujo MS de revestimiento del paso de separación llegan así mismo de manera indeseada al flujo ZS central, se disuelven paso a paso por las condiciones hipotónicas en el flujo ZS central, de modo que la concentración de las células rojas de la sangre disminuye gradualmente en el flujo ZS central. Esto es aclarado mediante el rayado de una flecha KE que simboliza la concentración de las células rojas de la sangre, en donde la separación más grande entre las líneas de rayado debería significar una más baja concentración de células rojas de la sangre.

A continuación, se descentra en dirección z este flujo ZS central en una segunda sección F2 de paso de flujo (véase la FIG 1). Después del ensanchamiento de los flujos ZS, MS1, MS2 de líquidos en dirección y, en una cuarta sección F4 de paso de flujo se separan nuevamente células WBC blancas de la sangre (véase la FIG 4 en el lado derecho), sin embargo en este caso desde el flujo ZS central en dirección z a un primer flujo MS1 de revestimiento. Allí se mantienen las células WBC blancas de la sangre en una zona z correspondiente a la zona BA de observación y a continuación llegan corriente abajo a la posición longitudinal B (véase la FIG 1), en la cual está dispuesto un microscopio M. También durante el paso de la cuarta sección F4 de paso de flujo se disuelven de nuevo células rojas de la sangre eventualmente presentes todavía en el flujo ZS central. Como ya se mencionó, con ayuda de la flecha

KE que corre en dirección PR de proceso, se simboliza la concentración que se torna cada vez más baja en dirección corriente abajo, de las células rojas de la sangre en el flujo ZS central, de modo que poco antes de la posición B del microscopio M en la zona BA de observación están presentes casi sólo células WBC blancas de la sangre. Adicionalmente, pueden añadirse al primer flujo MS1 de revestimiento mediante la cuarta entrada E4 en la segunda sección F2 de paso de flujo, también marcadores coloreados, como por ejemplo SDS, con los cuales cambia la morfología de las células.

En la FIG 5 se ilustra una representación esquemática de un sistema 2 de canal de microfluído, para el examen de células WBC blancas de la sangre de acuerdo con un ejemplo de realización de la invención con un portaobjetos OT conectado en serie. La construcción del sistema 2 de canal de microfluidos mostrado en la FIG 5 corresponde ampliamente al del sistema mostrado en la FIG 1. Adicionalmente, el sistema 2 mostrado en la FIG 5 comprende sin embargo aún un portaobjetos OT, sobre el cual caen (fuerza de gravedad en dirección x) gotas D_{WBC} con un volumen definido de, por ejemplo, 20 a 35 μ l, desde la zona S3 de recolección del sistema 2 de canal de microfluído, las cuales contienen células WBC blancas de la sangre. Portaobjetos OT puede ser desplazado en dirección MD de movimiento, en este caso en dirección y, de modo que las gotas D_{WBC} individuales con las células WBC blancas de la sangre y llegan sucesivamente y en forma ordenada al portaobjetos OT. Las gotas D_{WBC} sobre el OT pueden a continuación ser procesadas con ayuda de diferentes tecnologías estándar de coloración para la identificación celular, como por ejemplo la coloración de Hoechst. Como consecuencia del fuerte enriquecimiento de las células WBC blancas de la sangre con ayuda del procedimiento de acuerdo con la invención, se hace posible por ejemplo la identificación de patologías de células WBC blancas de la sangre con una significancia estadística mucho más alta, en comparación con el caso, por ejemplo actualmente con ayuda de una coloración de Giemsa de células WBC blancas de la sangre, en una muestra de sangre no concentrada.

En la FIG 6 se muestra un diagrama 600 de flujo, con el cual se ilustra el curso de un procedimiento para el examen de células blancas de la sangre de acuerdo con un ejemplo de realización de la invención. Durante la etapa 6.I se introduce plasma BL sanguíneo en un paso S1 de separación mediante una primera entrada E1 en un flujo entrante dispuesto de modo periférico de una primera sección F1 de paso de flujo de un sistema 1 de canal de microfluído. En la etapa 6.II se abre una segunda entrada E2 del sistema 1 de canal de microfluído mediante la cual se introduce una solución PF amortiguadora en un flujo entrante dispuesto centralmente de la primera sección F1 de paso de flujo. Mientras la sangre que fluye a través de la primera entrada E1 en la primera sección F1 de paso de flujo, forma un flujo de revestimiento del paso MS de separación con una primera tasa v_1 de flujo, la solución PF amortiguadora que fluye centralmente a través del paso F1 de flujo forma un flujo ZS central con una segunda tasa v_2 de flujo. En la etapa 6.III se generan ahora ondas AW de sonido por un dispositivo de generación de ondas de sonido, por ejemplo con ayuda de piezoelementos, las cuales se propagan transversalmente a la dirección de flujo de la primera sección F1 de paso de flujo del sistema 1 de canal de microfluído. Como consecuencia de la presión que surge por las ondas AW de sonido estacionarias en dirección transversal a la primera sección F1 de paso de flujo, se transfieren de manera creciente células WBC blancas de la sangre desde el flujo MS de revestimiento del paso de separación al flujo ZS central, de modo que se enriquecen en la solución PF amortiguadora que forma el flujo ZS central. En la etapa 6.IV se controlan ahora después de la transición a un paso S2 de proceso con un paso F de flujo en una segunda sección F2 de paso de flujo del paso F de flujo, una tercera entrada E3 y una cuarta entrada E4, de modo que fluyen soluciones PF1, PF2 amortiguadora altamente transparentes a la segunda sección F2 de paso de flujo del sistema 1 de canal de microfluído y forman primer y segundo flujos MS1, MS2 de revestimiento que rodean al flujo ZS central en dirección z. Al respecto, las tasas de flujo v_3 , v_4 del primer y segundo flujos MS1, MS2 de revestimiento son elegidas de modo que el flujo ZS central está descentrado en dirección z, es decir, en dirección de la observación de un microscopio, es decir, el flujo ZS central está desplazado en dirección z, de modo que ya no fluye un en plano BA posterior de observación.

Una vez el paso F de flujo se ha ampliado en una tercera sección F3 de paso de flujo, de modo que disminuye la velocidad de flujo tanto del flujo ZS central como también del primer y segundo flujos MS1, MS2 de revestimiento, en una etapa 6.V en una cuarta sección F4 de paso de flujo del paso F de flujo en dirección transversal respecto a la dirección de flujo, se generan nuevamente ondas AW de sonido, que se propagan transversalmente respecto a la dirección de flujo de la sección F4 de paso de flujo del paso F de flujo del sistema 1 de canal de microfluído. Como consecuencia de la presión que surge por las ondas AW de sonido estacionarias en dirección transversal de la sección F4 de paso de flujo, se transfieren de manera creciente células WBC blancas de la sangre desde el flujo ZS central descentrado a uno del primer y segundo flujos MS1, MS2 de revestimiento. Las ondas AW de sonido forman ondas estacionarias, cuyos nodos de ondas están posicionados en dirección z de modo que, vistos en dirección z, están dispuestos en la altura o en un plano de observación, que corre a través de una zona BA de observación de un microscopio M dispuesto corriente abajo. En una etapa 6.VI las células WBC blancas de la sangre pasan una posición longitudinal B del sistema 1 de canal de microfluído, en la cual está dispuesto un microscopio M. Las células WBC blancas de la sangre ubicadas en dirección z en la zona BA de observación del microscopio M son observadas ahora con el microscopio M. Después de la observación, las células WBC blancas de la sangre son recolectadas en una etapa 6.VII en una unidad S3 de recolección y a continuación son dispensadas sobre un portaobjetos OT en una etapa 6.VIII, en forma de gotas para otros análisis.

Para concluir, se indica una vez más que el procedimiento y dispositivo descritos anteriormente son solo ejemplos de realización preferidos de la invención y que la invención puede ser variada por el experto, sin que se pierda el alcance de la invención, en tanto se especifiquen las reivindicaciones. Por ejemplo, se describió el arreglo 1 de canal de

5 microfluidos, en el contexto de la observación y análisis de células WBC blancas de la sangre. Sin embargo, la invención no está limitada a la separación y observación de células WBC blancas de la sangre, sino que puede ser aplicada también a otras células sanguíneas o también a otros líquidos diferentes a la sangre, y a partículas que ocurren en estos líquidos. En aras de la integridad también se indica que el uso del artículo indeterminado "un" o "uno" no excluye que los rasgos en cuestión también puedan estar presentes varias veces. Así mismo, el concepto de "unidad" no excluye que ésta consista en varios componentes que, dado el caso, también pueden estar distribuidos espacialmente.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo (1, 2) para el examen de partículas (WBC, RBC, PLT) en un líquido (BL) que va a ser examinado, que exhibe una etapa (S2) de proceso para la separación y ubicación de las partículas que van a ser examinadas (WBC, RBD, PLT), que comprende:

- un paso (F) de flujo, a través del cual el líquido (BL) que va a ser examinado es movido con una primera tasa de flujo (v_s), con por lo menos una entrada (E3, E4), a través de la cual fluye por lo menos un líquido (PF1, PF2) de revestimiento con por lo menos una segunda tasa de flujo (v_3 , v_4) al primer paso (F) de flujo, de modo que el por lo menos un líquido (PF1, PF2) de revestimiento forma por lo menos un flujo (MS1, MS2) de revestimiento en el paso (F) de flujo y el líquido (BL) que va a ser examinado fluye longitudinalmente respecto al por lo menos un flujo (MS1, MS2) de revestimiento, a través del paso (F) de flujo,

- un dispositivo (WE2) de generación de ondas para la generación piezoacústica de ondas (AW) de sonido, que se propagan a través del paso (F) de flujo transversalmente a la dirección de flujo del líquido (BL) que va a ser examinado, y forman nodos de ondas (KN) en un plano (BA) de observación, de modo que debido al efecto de presión de las ondas (AW) de sonido en la dirección transversal, las partículas (WBC, PLT, RBC) que van a ser examinadas del líquido (BL) que va a ser examinado son desplazadas transversalmente al plano (BA) de observación y se concentran allí,

en donde el valor de la por lo menos una segunda tasa de flujo (v_3 , v_4) es elegida de modo que el por lo menos un flujo (MS1, MS2) de revestimiento exhibe una sección transversal predeterminada, de modo que el plano (BA) de observación corre a través del por lo menos un flujo (MS1, MS2) de revestimiento y las partículas (WBC, PLT, RBC) que van a ser examinadas se concentran en el por lo menos un líquido (PF1, PF2) de revestimiento,

en donde el dispositivo es configurado mediante arreglo de elementos de reflexión opuestos al dispositivo (WE2) de generación de ondas a la formación de ondas estacionarias, en donde el dispositivo comprende además elementos de accionamiento para la generación de los flujos individuales del por lo menos un líquido (PF1, PF2) de revestimiento así como del líquido (BL) que va a ser examinado, en donde el dispositivo comprende además una unidad de control para elegir o controlar las tasas de flujo, en donde la unidad de control está configurada para predecir y sincronizar los valores para las tasas de flujo individuales y controlar el elemento de accionamiento para generar los flujos individuales de los líquidos de revestimiento y del líquido que va a ser examinado, de modo correspondiente a las tasas de flujo determinadas.

2. Dispositivo (1, 2) de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el paso (F) de flujo exhibe una primera entrada (E3), a través de la cual fluye un primer líquido (PF1) de revestimiento con una segunda tasa (v_3) de flujo en el paso (F) de flujo, y una segunda entrada (E4) opuesta a la primera entrada (E3), a través de la cual fluye un segundo líquido (PF2) de revestimiento con una tercera tasa (v_4) de flujo en el paso (F) de flujo, de modo que el primer líquido (PF1) de revestimiento forma un primer flujo (MS1) de revestimiento en el paso (F) de flujo y el segundo líquido (PF2) de revestimiento forma un segundo flujo (MS2) de revestimiento en el paso (F) de flujo y el líquido (BL) que va a ser examinado fluye a través del paso (F) de flujo entre el primer flujo (MS1) de revestimiento y el segundo flujo (MS2) de revestimiento,

en donde el valor de la segunda tasa (v_3) de flujo y de la tercera tasa (v_4) de flujo es elegida de modo que los flujos (MS1, MS2) de revestimiento exhibe una sección transversal predeterminada, de modo que el plano (BA) de observación corre a través de uno de los dos flujos (MS1, MS2) de revestimiento.

3. Dispositivo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el paso (F) de flujo está dimensionado de modo que los líquidos (BL, PF1, PF2) que fluyen a través de él lo hacen de modo laminar, y/o el paso (F) de flujo comprende un canal de microfluído (MFK).

4. Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el líquido (BL) que va a ser examinado comprende plasma sanguíneo y/o las partículas (WBC, RBC, PLT) que van a ser examinadas del líquido (BL) que va a ser examinado exhiben por lo menos uno de los siguientes componentes sanguíneos:

- leucocitos,
- trombocitos
- eritrocitos.

5. Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, que exhibe una etapa (S1) de separación conectado corriente arriba a la etapa (S2) de proceso, en donde la etapa (S1) de separación comprende:

- un paso (F1) de flujo con un flujo (ZS) central con un líquido (PF) libre inicialmente de las partículas (WBC, RBC, PLT) que van a ser examinadas, y por lo menos un flujo (MS) de revestimiento de paso de separación, que fluye longitudinalmente respecto al flujo (ZS) central a través del paso (F1) de flujo de la etapa (S1) de separación y exhibe líquido (BL) que va a ser examinado,

- 5 - un dispositivo (WE1) adicional de generación de ondas para la generación piezoacústica de ondas (AW) de sonido, que se propagan a través del paso (F1) de la etapa (S1) de separación transversalmente respecto a la dirección de flujo del líquido (BL) que va a ser examinado de flujo y forman un nodo de ondas (KN) en un plano a través del flujo (ZS) central de modo que, debido al efecto de presión de las ondas (AW) de sonido en dirección transversal, desplaza partículas (WBC, PLT) del líquido (BL) que va a ser examinado al flujo (ZS) y se concentran allí.
6. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el por lo menos un flujo (MS) de revestimiento de paso de separación rodea al flujo (ZS) central en dirección transversal respecto a la dirección de flujo y/o el líquido (PF) inicialmente libre de las partículas (WBC, RBC, PLT) que van a ser examinadas, es transparente.
- 10 7. Dispositivo de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6, en donde el dispositivo (WE1, WE2) de generación de ondas está diseñado de modo que la dirección de propagación de las ondas (AW) de sonido en la etapa (S1) de separación y la dirección de propagación de las ondas (AW) de sonido en la etapa (S2) de proceso corren de modo mutuamente ortogonal y ortogonal respecto a la dirección de flujo del líquido (BL) que va a ser examinado.
- 15 8. Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 a 7, en donde el paso de flujo (F3) de la etapa (S2) de proceso amplía su ancho transversalmente a la dirección de flujo, antes de la posición longitudinal del dispositivo (WE2) de generación de ondas de la etapa (S2) de proceso, de modo que se reducen la velocidad de flujo del líquido (BL) que va a ser examinado y del por lo menos un líquido (PF1, PF2) de revestimiento.
9. Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, que exhibe una unidad de adición de amortiguador para la adición de un amortiguador a la solución hipotónica en el flujo (ZS) central o el líquido (BL) que va a ser examinado.
- 20 10. Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, que exhibe una unidad la cual está unida preferiblemente con la segunda entrada (E4), para la adición de marcadores para las partículas (WBC, RBC, PLT) que van a ser examinadas, de modo que el segundo líquido (PF2) de revestimiento comprende los marcadores.
11. Dispositivo para la observación microscópica de partículas (RBC, WBC) en un líquido que va a ser examinado, que comprende:
- 25 - un dispositivo (1, 2) de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10,
- un microscopio (M), el cual está dispuesto en una posición longitudinal del paso (F) de flujo de la etapa (S2) de proceso, para la observación de partículas (WBC, RBC, PLT) del líquido que va a ser examinado en el plano (BA) de observación.
12. Dispositivo de acuerdo con una reivindicación 11, que exhibe además:
- 30 - una unidad (S3) de recolección, que está conectada en serie con la etapa (S2) de proceso, corriente abajo de la posición longitudinal del microscopio (M) y está configurada para recolectar las partículas (WBC, RBC, PLT) examinadas, para examinar éstas adicionalmente con método adicional de examen, que requiere un enriquecimiento de las partículas (WBC, RBC, PLT) examinadas, preferiblemente un método de medición por biología molecular, y/o
- 35 - una unidad de transferencia de partículas, que está dispuesta corriente abajo detrás de la posición longitudinal del microscopio (M) y está configurada para la transferencia de partículas (WBC, RBC, PLT) del paso (F) de flujo a un portaobjetos (OT) para el examen adicional de las partículas (WBC, RBC, PLT).
13. Procedimiento para el examen de partículas (RBC, WBC, PLT) en un líquido (BL) que va a ser examinado, que exhibe las etapas:
- 40 - movimiento de un líquido (BL) que va a ser examinado con una primera tasa de flujo (V_s) a través de un paso (F) de flujo,
- suministro de por lo menos un líquido (PF1, PF2) de revestimiento al paso (F) de flujo, a través de una primera entrada (E3) con una segunda tasa (V_3) de flujo, de modo que el por lo menos un líquido (PF1, PF2) de revestimiento forme por lo menos un flujo (MS1, MS2) de revestimiento en el paso (F) de flujo y el líquido (BL) que va a ser examinado fluya a través del paso (F) de flujo longitudinalmente respecto al por lo menos un flujo (MS1, MS2) de revestimiento,
- 45 - generación piezoacústica de ondas (AW) de sonido, que se propagan a través del paso (F) de flujo transversalmente respecto a la dirección de flujo del líquido (BL) que va a ser examinado y formación de nodos de ondas (KN) en un plano (BA) de observación de modo que, debido al efecto de presión de las ondas (AW) de sonido en dirección transversal, las partículas (WBC, RBC, PLT) que van a ser examinadas del líquido (BL) que va a ser examinado se desplazan transversalmente en el plano (BA) de observación y allí se concentran,
- 50 - elección del valor de la por lo menos una segunda tasa (V_3) de flujo, tasa (V_4) de flujo, de modo que el por lo menos un flujo (MS1, MS2) de revestimiento exhibe una sección transversal predeterminada, de modo que el plano (BA) de observación corre a través del por lo menos un flujo (MS1, MS2) de revestimiento y se concentran las partículas (WBC, RBC, PLT) que van a ser examinadas en el por lo menos un líquido (PF1, PF2) de revestimiento,

en donde mediante el arreglo de elementos de reflexión opuestos al dispositivo (WE2) de generación de ondas, se alcanza la formación de ondas de estacionarias,

en donde elementos de accionamiento generan los flujos individuales del por lo menos un líquido (PF1, PF2) de revestimiento y del líquido (BL) que va a ser examinado,

5 en donde una unidad de control para la elección o control de las tasas de flujo predice y sincroniza mutuamente los valores para las tasas individuales de flujo y controla el elemento de accionamiento, para generar los flujos individuales de los líquidos de revestimiento y del líquido que va a ser examinado, de modo correspondiente a las tasas de flujo determinadas.

10 14. Uso de un dispositivo (1, 2) de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 12 para la separación de leucocitos (WBC) de un plasma sanguíneo (BL).

FIG 1

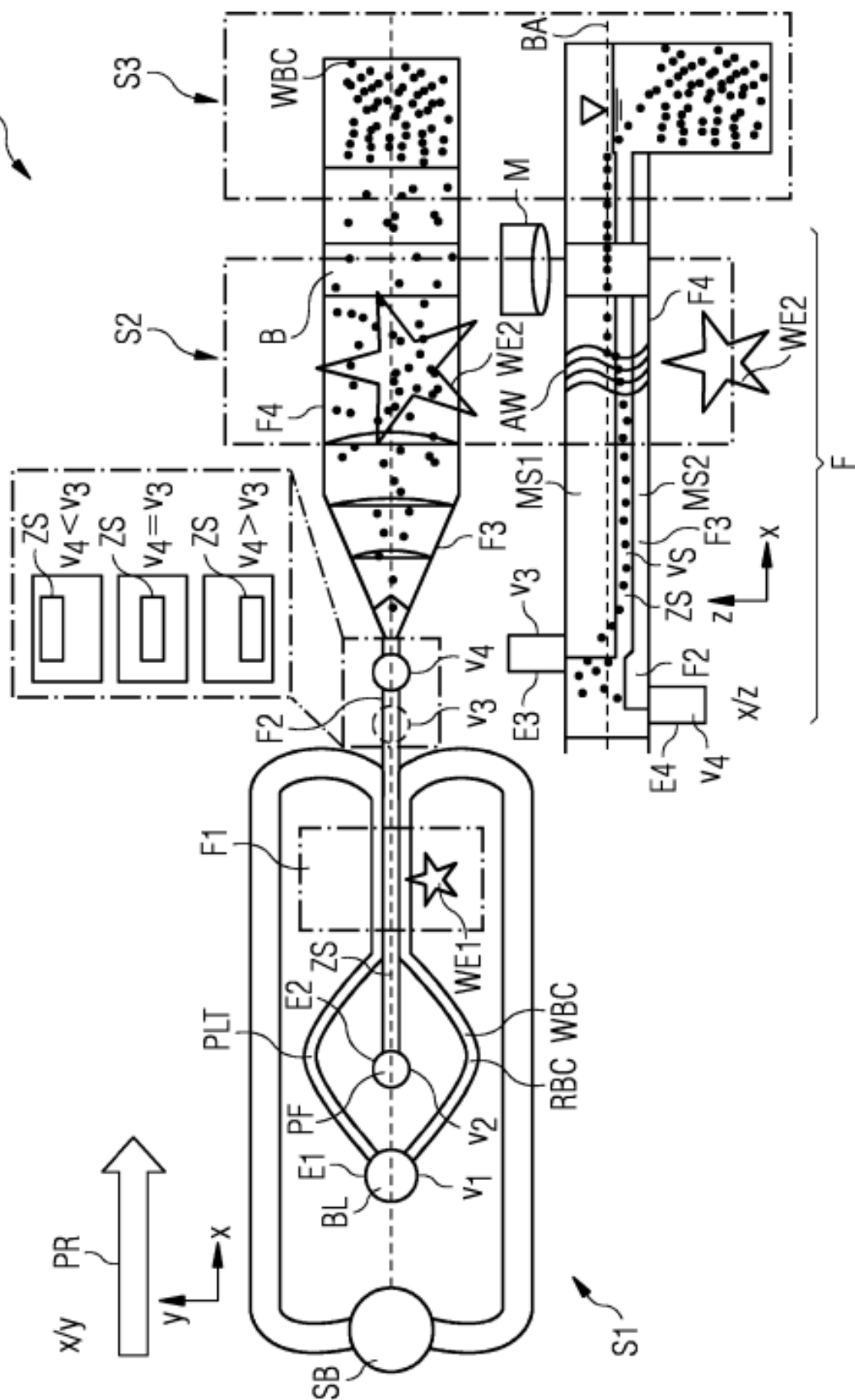


FIG 2

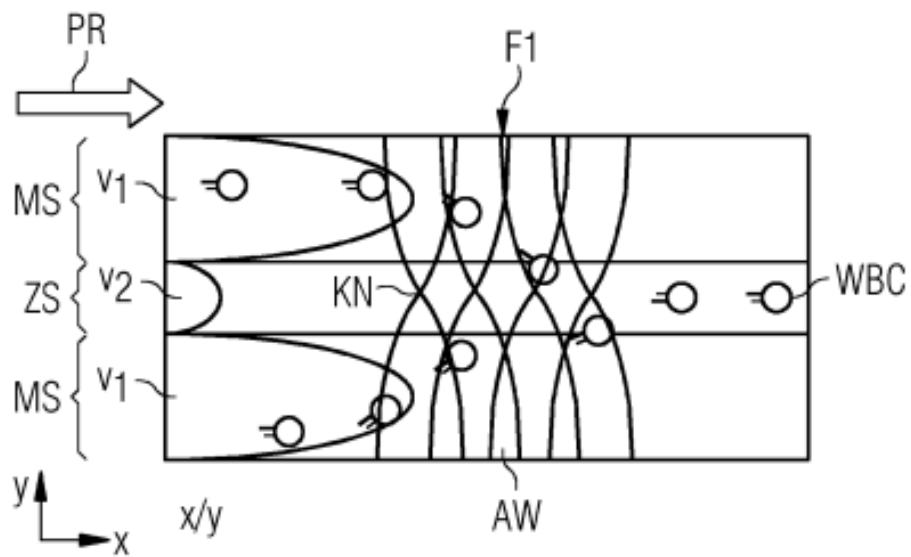


FIG 3

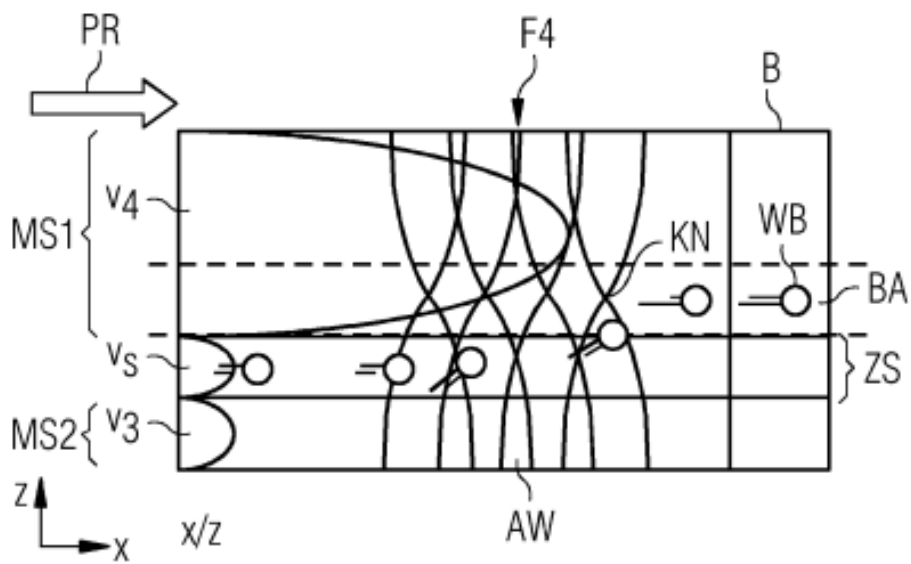
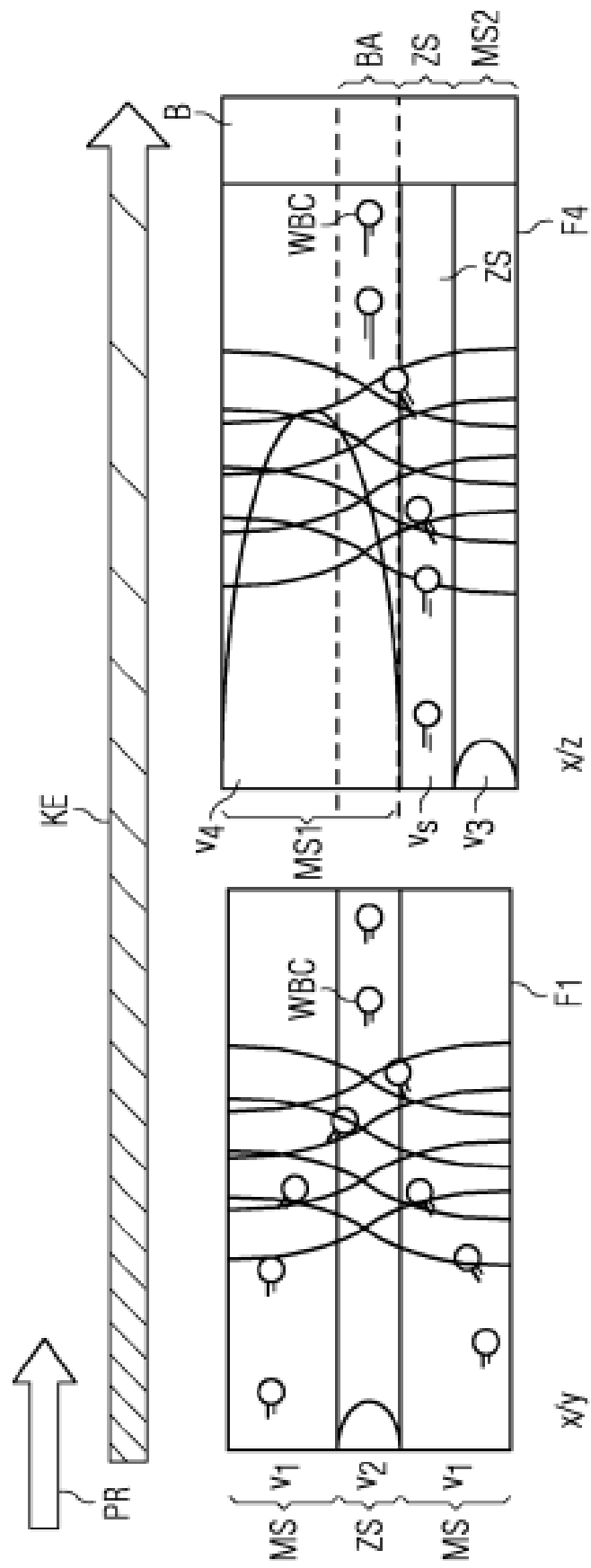


FIG 4



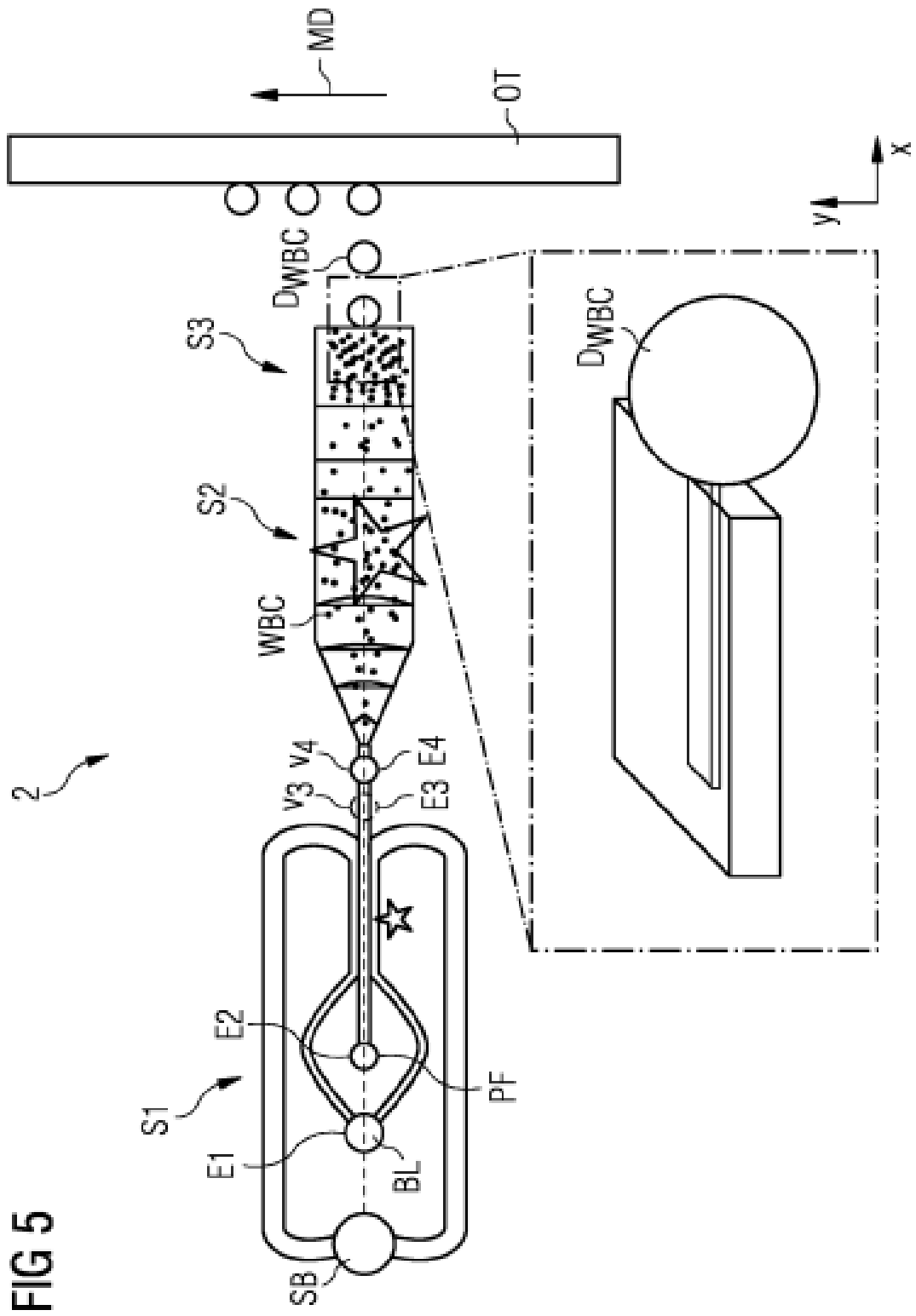


FIG 6

