

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 895 504**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 15/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2016 PCT/EP2016/056724**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016 WO16151140**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2016 E 16716500 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.08.2021 EP 3274688**

54 Título: **Dispositivo hidrofoco con una única disolución de análisis**

30 Prioridad:

26.03.2015 FR 1552527

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

21.02.2022

73 Titular/es:

**BIT GROUP FRANCE (100.0%)
Rue de la Valsière, Parc Euromédecine II
34099 Montpellier, FR**

72 Inventor/es:

**CHAMPSEIX, HENRI;
LEVEAU, MAXIME y
MAGNIN, OLIVIER**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 895 504 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

Dispositivo hidrofoco con una única disolución de análisis

La presente invención se refiere a un dispositivo para la diferenciación óptica de subpoblaciones de glóbulos blancos que comprende una celda de flujo de manga activa.

5 En general, un dispositivo de análisis permite contar y caracterizar los diferentes tipos de glóbulos presentes en la sangre, a saber:

- el número total de glóbulos blancos;
- más específicamente, el número de glóbulos blancos por subpoblaciones (basófilos, eosinófilos, neutrófilos, monocitos y linfocitos);

- 10
- el número de glóbulos rojos y plaquetas; y
 - el nivel de hemoglobina.

Se conocen varias técnicas de análisis, en particular:

- 15
- la determinación de hemoglobina se realiza después de la lisis de los glóbulos rojos, es decir la destrucción de la membrana de los glóbulos rojos, y por medida por espectrofotometría de la hemoglobina liberada en el medio; la determinación de la hemoglobina requiere además la estabilización de la hemoglobina en una forma compleja (oxihemoglobina o metahemoglobina cian) para medir la absorbancia de un solo compuesto en la longitud de onda apropiada.

- el recuento total de glóbulos blancos se realiza en la muestra de sangre por resistividad realizando la lisis específica de los glóbulos rojos y la protección de los glóbulos blancos.

- 20
- se realiza la diferenciación de glóbulos blancos y su recuento por subpoblación:
 - o por medición de resistividad volumétrica después de lisis específica de glóbulos rojos, protección de glóbulos blancos; sin embargo, esto no permite diferenciar todas las subpoblaciones;
 - o por vía óptica, en particular por citometría de flujo; después de la lisis específica de los glóbulos rojos y la protección de los glóbulos blancos, midiendo diferentes parámetros (en particular difracción, fluorescencia, absorbancia) en un flujo de glóbulos blancos en el eje en ángulos pequeños, medianos y grandes y opcionalmente después de la adición de un agente de etiquetado (por ejemplo, negro de clorazol, o un colorante que etiqueta ADN o ARN, o un colorante fluorescente) y midiendo a diferentes longitudes de onda; permitiendo esta técnica diferenciar las subpoblaciones de glóbulos blancos.
- 25

- el recuento de glóbulos rojos y plaquetas se realiza en una muestra diluida sin añadir ningún reactivo particular por medida de la resistividad.
- 30

Existen numerosas máquinas automatizadas de hematología que implementan estas técnicas.

La mayoría de las máquinas automatizadas de hematología tienen un sensor de impedancia para el recuento absoluto de glóbulos blancos y un sensor óptico para la diferenciación de glóbulos blancos.

Este sensor óptico está constituido generalmente por dos elementos:

- 35
- Un banco óptico que contiene la fuente de luz y los elementos de detección (sensores)
 - Una celda de flujo (también llamada Flow Cell o celda óptica)

Para obtener resultados fiables, la zona de medición óptica debe tener unas dimensiones limitadas (generalmente alrededor de 100 μm x 30 μm) y una distribución homogénea de la intensidad de la luz. Estas limitaciones están integradas en el diseño de un banco óptico que generalmente contiene una parte de emisión (fuente de luz + lentes de enfoque) y una parte de detección (modelado del flujo de luz con lentes y detección en células fotosensibles).

40

El segundo elemento que interviene en la realización de la medición es la celda de flujo. Entonces, la dificultad consiste en restringir la circulación del flujo del flujo que transporta las células que van a circular de modo que esté completamente dentro de la zona de medición óptica. Si el flujo que transporta las células llega al límite de la zona de medición óptica o incluso la supera, las células ya no reciben la misma cantidad de luz y la medición óptica se encuentra viciada por error.

45

Se conoce la tecnología de citometría de flujo estándar como se describe en los documentos. US6228652, US5812419

y FR2653885. La solución generalmente descrita es el uso de uno o más flujos de revestimiento concéntricos con el flujo central que transporta las células. Este flujo de revestimiento estira el flujo central para reducir su diámetro y así hacer pasar las celdas que se van a caracterizar una tras otra.

5 Esta tecnología requiere a menudo muy bajas tasas de dilución (sangre entera + reactivo) para la medición óptica (por lo general alrededor de 1/50 para un desplazamiento de la célula de una en una, incompatible con las mediciones de hemoglobina y mediciones resistivas realizadas en el tanque de dilución. Estas medidas resistivas y la hemoglobina en el tanque de dilución requieren una tasa de dilución diferente que el de la medición óptica. En la extracción de sangre entera, se utiliza generalmente una dilución específica para realizar la medición óptica. Por tanto, esta limitación impone requisitos adicionales materiales (tanques, válvulas de solenoide, sistemas multidistribución), es decir, un sistema hidráulico complejo que conlleva por lo tanto costes adicionales.

10 También se conoce la tecnología de celda de flujo con revestimiento "pasivo" como se describe en el documento. FR2883973 en el que se utiliza un reactivo específico que permite realizar la medida resistiva (recuento absoluto) y la medida óptica (diferenciación) a partir de la misma dilución y esto en dos sensores diferentes. El documento FR2883973 describe un sistema en el que la muestra diluida se empuja a través de un inyector con un diámetro interno de 80 µm. Esta muestra, empujada bajo presión por una jeringa, va acompañada de un líquido envolvente (generalmente diluyente) también empujado por una jeringa. En este caso, no es el flujo de manguito lo que impone la anchura del flujo de muestra estirándolo, sino la forma y la sección de salida del inyector. Por tanto, el revestimiento de fundente no tiene un papel activo.

El documento US 2009/142744 A1 describe un dispositivo para analizar una muestra de sangre que comprende:

- 20 • un tanque de dilución y análisis adecuado para contener una solución de análisis obtenida diluyendo la muestra de sangre en al menos un reactivo, presentando esta solución de análisis una tasa de dilución adecuada para una medición de hemoglobina,
- un tanque de circulación que comprende un tanque paralelepípedo, un inyector y entradas para el líquido de revestimiento,
- 25 • un sistema hidráulico,
- un dispositivo de medición óptica para medir las subpoblaciones leucocitarias de glóbulos blancos contenidas en la solución de análisis,
- una unidad electrónica para el control de transferencias y de medición de la solución de análisis, donde:
 - 30 ○ el tanque de dilución y de análisis está conectado directamente a la celda de flujo de modo que la solución de análisis utilizado para la medición de la concentración de hemoglobina también se utiliza para la medición de las subpoblaciones leucocitarias de glóbulos blancos, con un nivel de dilución definido con una relación de menos de 1/160,
 - la celda de flujo es del tipo de manguito activo,
 - el dispositivo de medición óptica está asociado con la celda de flujo,
 - 35 ○ la celda de flujo y el sistema hidráulico están diseñados para generar un flujo de la solución de análisis, por hidrofoco de manga activa.

Los principios fundamentales de la citometría de flujo se describen en la "Flow Cytometry Educational Guide, 2ª Edición", editora Sonja Wulff, publicada por Dako, Fort Collins, Colorado, EE. UU.

40 El documento US 2010/273168 A1 y US 2008/153170 A1 divulgan otros analizadores que aplican el principio de citometría de flujo a las muestras de sangre. Otros analizadores que aplican este principio se divulgan en el documento US 2013/216454 A1 y TOURNIER F ET AL: "CILATED DIFERENCIATION OF RABBIT TRACHEAL EPITHELIAL CELLS IN VITRO", EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY, WISSENSCHAFLICHE VERLAGSGESELLSCHAFT, STUTTGART, DE, vol. 77, no. 3, 1 de noviembre de 1998 (01-11-1998), páginas 205-213, ISSN: 0171-9335.

45 En efecto, en el caso de la citometría de flujo estándar, las restricciones fluidicas imponen una celda de medición cuya dimensión transversal es del orden de 250 µm (en función del diámetro de la muestra, el diámetro del inyector, la velocidad de flujo). En el caso de la celda con revestimiento pasivo, esta restricción se puede levantar y permitir así una dimensión transversal de 1 a 5 mm. Entonces, tal celda puede estar hecha, al menos parcialmente, de material plástico inyectado y así participar en gran medida en la reducción de costes.

50 No obstante, el hecho de utilizar manguitos pasivos conlleva un inconveniente. De hecho, el manguito sin presión no permite estirar el flujo de la muestra después de pasar por el inyector, creando así un gradiente de velocidad (relación de aproximadamente 2,5 entre la velocidad más baja y la más alta) en toda la sección del flujo. Las células, a diferencia de la citometría de flujo convencional, pasan a diferentes velocidades según su posición en el flujo en el momento de

la medición. Por tanto, esto tiene un impacto directo en el ancho medido de la celda. La detección óptica de celdas idénticas puede generar impulsos eléctricos que tienen diferentes anchos temporales dependiendo de la posición de estas células en el flujo (central o cerca del borde, la célula pasa literalmente más o menos rápido).

5 Por tanto, es necesario gestionar anchos de pulso muy dispares. Esta limitación debe ser gestionada en particular por las tarjetas de detección electrónicas que deben ser capaces de medir impulsos que tengan diferentes velocidades. Esto implica, por tanto, que estas tarjetas gestionen mayores bandas pasantes.

El objeto de la presente invención es remediar los inconvenientes antes mencionados proponiendo un nuevo dispositivo que permita una mejor diferenciación de las subpoblaciones de glóbulos blancos en comparación en particular con la técnica de manga pasiva.

10 Otro objeto de la invención es un nuevo dispositivo, cuyo coste de producción está controlado en comparación con los dispositivos de la técnica anterior.

Otro objeto de la invención es un nuevo dispositivo de diseño sencillo y robusto.

Otro objeto de la presente invención es un dispositivo nuevo que permite realizar mediciones ópticas a una velocidad superior a 60 ensayos o análisis por hora.

15 Al menos uno de los objetivos antes mencionados se consigue con un dispositivo de análisis de una muestra de sangre según la reivindicación 1, comprendiendo este dispositivo:

- un tanque de dilución y de análisis adecuado para contener una solución de análisis obtenida diluyendo la muestra de sangre en al menos un reactivo, presentando esta solución de análisis una tasa de dilución adecuada para una medición de hemoglobina,
- 20 • una celda de flujo que comprende una celda paralelepípeda, un inyector y entradas para el líquido de revestimiento,
- un sistema hidráulico (electroválvulas, jeringas, motor, circuito de tuberías, etc.)
- un dispositivo de medición óptica para medir las subpoblaciones leucocitarias de glóbulos blancos contenidas en la solución de análisis,
- 25 • una unidad electrónica para controlar las transferencias y medir la solución de análisis, donde
- el tanque de dilución y de análisis está conectado directamente a la celda de flujo de modo que la solución de análisis utilizada para la medición de los niveles de hemoglobina también se utiliza para la medición de las subpoblaciones leucocitarias de glóbulos blancos, con un nivel de dilución definido con una relación de menos de 1/160, preferiblemente igual a 1/170,
- 30 • la celda de flujo es del tipo de manga activa,
- el dispositivo de medición óptica está asociado con la celda de flujo,
- el inyector presenta un diámetro interno de 200 μm , y
- la celda de flujo y el sistema hidráulico están diseñados para generar un flujo de la solución de análisis, por hidrofoco de manga activa, que tiene un diámetro entre 70 y 90 μm para tener suficientes células para la medición
- 35 óptica.

Ventajosamente, el enlace directo entre el tanque de dilución y de análisis por un lado y la celda de flujo por otro lado puede significar que este enlace sea directo de forma independiente, por ejemplo, sin otras conexiones de tubería de diluyente en particular.

40 La invención hace que sea posible utilizar, por ejemplo, una dilución de 1/170, adecuada para la medición de la hemoglobina y el recuento de glóbulos blancos, para llevar a cabo la diferenciación leucocitaria con la tecnología de manga activa, es decir hidrofoco (contracción de la expresión inglesa "hydrodynamic focusing" (enfoque hidrodinámico)). Las medidas de la hemoglobina y de las subpoblaciones leucocitarias se realizan a partir de una única dilución de la muestra de sangre.

45 Con el dispositivo según la invención se utiliza la misma solución de análisis para la medida de hemoglobina y la medida óptica en una celda de flujo tipo hidrofoco, es decir de manga activa. Así, la solución de análisis utilizada para la medición de hemoglobina y la solución de análisis utilizada para la medición óptica tienen la misma tasa de dilución: esto tiene la ventaja de ahorrar una etapa adicional de dilución. En particular, para realizar la medición óptica, se transfiere directamente parte de la solución de análisis prevista para la medición de hemoglobina.

Además, el revestimiento activo (hidrofoco) se utiliza aquí en la celda de flujo, es decir, que se utiliza una solución de revestimiento que reduce el diámetro del flujo de la solución de análisis en la celda de flujo de forma que todas las células en este flujo tienen la misma velocidad independientemente de sus posiciones en la sección del flujo.

En la técnica anterior, durante la medición óptica,

- 5 • o bien se utiliza una dilución débil con una proporción del orden de 1/50 para:
- mantener una alta concentración de células,
- permitir una alineación de estas células mediante un manguito activo,
- permitir mediciones ópticas rápidas de células sucesivas;
- 10 • o se usa una dilución fuerte como en el documento EP1866651 con una proporción del orden de 1/173 para mantener el mismo nivel de dilución que la medición del nivel de hemoglobina.

Según la presente invención, se utiliza una única solución de análisis para la medición óptica y la medición del nivel de hemoglobina.

15 En el contexto del manguito pasivo según la técnica anterior, el flujo del manguito no reduce el flujo de la solución de análisis que sale del inyector. Por lo tanto, este inyector debe tener una abertura idéntica al diámetro deseado para el flujo de la solución de análisis, a saber, por ejemplo, 80 μm : lo que corresponde a un inyector caro. Con la presente invención, se usa un inyector menos costoso que tiene un diámetro interno de 200 μm . Es el revestimiento (manga activa) el que reduce el diámetro del flujo a un diámetro entre 70 y 90 μm . Tal inyector es más barato de fabricar que el que tiene un diámetro de 80 μm , por ejemplo, como se recomienda en dispositivos de la técnica anterior en el contexto del manguito pasivo (diámetro del inyector = diámetro del flujo de la solución de análisis). En la técnica anterior, en el contexto de la citometría de flujo convencional, cuando los inyectores son del orden de 200 μm , estos son los medios implementados para reducir el diámetro de flujo de la solución de análisis de 200 μm a 5-50 μm , que son más caros para los diámetros más pequeños (estos medios son medios para ajustar el caudal y la presión además de los que se utilizan para realizar la doble dilución).

25 La presente invención es especialmente notable, pero no exclusivamente, por el hecho de que el compromiso tecnológico de las dimensiones del inyector y del flujo de la solución de análisis hace que sea posible reducir los costes de un dispositivo de este tipo mientras se mantiene una cadencia de análisis muy competitiva como, por ejemplo, 60 ensayos o análisis por hora. La cadencia está vinculada a la relación entre la tasa de dilución, el diámetro del flujo de la solución de análisis y el tratamiento analítico de las medidas ópticas.

30 Un manguito activo permite imponer la misma velocidad de desplazamiento a las células de la solución de análisis. Esto proporciona importantes ventajas en el tratamiento de las señales resultantes de la medición óptica.

Se puede utilizar como solución de análisis la que se define en particular en el documento EP1866651, obteniéndose esta solución de análisis introduciendo un monoreactivo en una muestra de sangre.

35 Con el dispositivo según la presente invención, se utiliza una única solución de análisis (una sola dilución), se coloca un manguito activo para reducir el diámetro del flujo y las mediciones ópticas se llevan a cabo a una cadencia adecuada.

Según una característica ventajosa de la invención, el flujo de la solución de análisis puede tener un diámetro de 80 μm para la medición óptica. Este valor es un buen compromiso que permite al automatista asegurar una cadencia rápida y no ser demasiado caro.

40 Ventajosamente, la celda paralelepípeda puede tener un lado interior de 250 μm . Se trata del ancho en el que pasan el flujo de la solución de análisis y el flujo del manguito. Esta celda paralelepípeda puede ser una celda comercial estándar para limitar el coste del dispositivo.

Según la invención, el tanque de dilución y de análisis puede comprender un espectrofotómetro para realizar una medida de hemoglobina directamente a partir de la solución de análisis contenida en dicho tanque.

45 También puede comprender un dispositivo eléctrico para el recuento de glóbulos blancos midiendo la resistividad de la solución de análisis contenida en dicho tanque.

Según la invención, el dispositivo de medida óptica también puede configurarse para realizar un recuento y diferenciación de las células contenidas en la solución de análisis.

50 Según una característica ventajosa de la invención, la celda de flujo comprende medios de presión configurados para que las células de la solución de análisis circulen en un flujo sin gradiente de velocidad sobre una sección del flujo. Esto se puede implementar mediante el uso de jeringas, circuito hidráulico y electroválvulas.

Según otro aspecto de la invención, se propone un procedimiento de análisis de una muestra de sangre, comprendiendo este método las siguientes etapas:

- 5 • medición de un nivel de hemoglobina de una solución de análisis obtenida mezclando (diluyendo) la muestra de sangre con al menos un reactivo en un tanque de dilución y análisis. El método también comprende las siguientes etapas:
 - transferencia directa, sin dilución, de al menos parte de dicha solución de análisis a una celda de flujo,
 - generación por manguito activo en la celda de flujo y por medio de un inyector que tiene un diámetro interno de 200 μm , de un flujo de la solución de análisis, estando este flujo comprendido entre 70 y 90 μm ,
 - 10 ○ medición óptica de las subpoblaciones leucocitarias en el flujo de la solución de análisis, teniendo esta solución de análisis el mismo nivel de dilución que la solución de análisis utilizada para medir el nivel de hemoglobina; estando definida esta tasa de dilución con una relación inferior a 1/160, preferiblemente igual a 1/170.

En particular, también se lleva a cabo una medición resistiva directamente a partir de dicha solución de análisis en dicho tanque de dilución y análisis.

- 15 Según una realización ventajosa de la invención, durante la medición óptica, se detectan células, y para cada célula detectada, se aplica un filtro de ancho para eliminar cualquier detección que tenga un ancho de impulso mayor que un valor predeterminado. Este filtrado es posible, en particular, por el hecho de que las células circulan todas a la misma velocidad durante la medición óptica, por consiguiente, un impulso, como resultado de una detección de una célula, deben tener una cierta anchura temporal cualquiera que sea la célula detectada. Un ancho demasiado grande
20 corresponde a un defecto de detección como, por ejemplo, una semicoincidencia, dos células detectadas en la zona de detección óptica.

Otras ventajas y características de la invención resultarán evidentes al examinar la descripción detallada de un modo de realización que no es en modo alguno limitativo, y de los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 es una vista esquemática general simplificada del dispositivo según la invención.

- 25 La figura 2 es una vista simplificada de la celda de flujo según la invención.

La figura 3 es un esquema que ilustra la velocidad de circulación de las células en el flujo de la solución de análisis según la invención.

La figura 4 es una vista esquemática simplificada de una celda de flujo de citometría de flujo estándar de acuerdo con la técnica anterior.

- 30 La figura 5 es una vista esquemática simplificada de una celda de flujo con un sistema de revestimiento pasivo según la técnica anterior.

Las figuras 6 y 7 son diagramas que ilustran la dispersión de las células en función de su ancho, sin filtrar, después de una medición óptica con y sin tecnología de hidrofoco respectivamente, y

- 35 Las figuras 8 y 9 son diagramas que ilustran la dispersión de las células en función de la difracción y la absorbancia, con filtrado, después de la medición óptica con y sin tecnología de hidrofoco respectivamente.

La presente invención se refiere a un dispositivo para la diferenciación óptica de subpoblaciones de glóbulos blancos y para medir la hemoglobina a partir de una dilución única, estando esta dilución adaptada para medir la hemoglobina; la diferenciación leucocitaria se realiza en una celda de flujo de manga activa.

- 40 En la Figura 1 vemos un dispositivo de análisis 1 en una representación esquemática muy simplificada que comprende un tanque 2 de dilución y análisis en el que se encuentra una solución 3 de análisis. Esta solución de análisis está constituida, en particular, de una muestra de sangre, de un diluyente y de un mono reactivo como, por ejemplo, el descrito en el documento EP1866651. Se pueden usar otras soluciones siempre que sean adecuadas para someterse a una medición del nivel de hemoglobina.

- 45 Se distingue un espectrómetro 11 que permite medir en esta solución 3 de análisis en el tanque 2 de dilución, después de la lisis de los glóbulos rojos, el nivel de hemoglobina.

Se distingue también un dispositivo 12 eléctrico que permite medir la resistividad de la solución 3 de análisis.

- 50 Ventajosamente, la tasa de dilución de la solución de análisis tiene una relación de 1/170 que permite medir el nivel de hemoglobina. Uno o más tubos 14 hacen posible extraer parte de la solución 3 de análisis e inyectar directamente en la celda de flujo representada globalmente 4. Esta transferencia se lleva a cabo directamente sin dilución de modo que la tasa de dilución es la misma entre la medición del nivel de hemoglobina realizado directamente en el tanque 2

de dilución y análisis y la medición óptica que tendrá lugar en la celda de flujo 4.

El diámetro del flujo se adapta al nivel de dilución para tener suficientes células para permitir tratamientos estadísticos en las subpoblaciones leucocitarias.

5 En la figura 2 se ve un poco más en detalle la celda de flujo 4 que comprende un canal superior 5 que es una celda paralelepípeda con lados internos de 250 μm . En las figuras 1 y 2, la base 15 de la celda de flujo tiene un diámetro mayor que el canal 5 para poder acomodar las entradas 7, 8 que de hecho forman una abertura circular alrededor de un inyector 13. Las entradas 7, 8 permiten el paso de un flujo de manguito inyectado a presión en todo los alrededores del inyector 13. Este último, el inyector 13, también recibe bajo presión la solución 3 de análisis llevada por la tubería 14. Medios 6 de presiones tales como circuitos hidráulicos, electroválvulas y/o jeringas que permiten aplicar niveles de presión apropiados en el inyector 13 y en las entradas 7, 8 para crear un manguito activo. En este caso, se reduce el diámetro del flujo que sale del inyector 13 hacia el canal 5. Ventajosamente, el diámetro interno del inyector es de 200 μm , siendo idealmente el diámetro del flujo en el canal 5 de 80 μm . Cuando está en una condición de manguito activo, la velocidad de las células en el flujo de la solución de análisis en el canal 5 es idéntica en todos los puntos. La figura 3 ilustra este fenómeno de gradiente nulo en una sección del flujo.

15 Ventanas 16 están dispuestas en el canal 5 para permitir que un dispositivo 9 de medición óptica (emisor, receptor, lentes y otros componentes ópticos y electrónicos) realice la diferenciación leucocitaria.

Se prevé una unidad 10 electrónica para controlar la transferencia de la solución de análisis desde el tanque de dilución y análisis a la celda de flujo y, en particular, para controlar las diferentes medidas de espectrometría, resistividad, ópticas, etc., pudiendo estas dotada esta unidad con un microcontrolador configurado para realizar estas diferentes tareas.

20 Durante la medición óptica, la unidad electrónica se puede configurar para aplicar un filtro sobre la anchura de los impulsos para eliminar las semi-coincidencias, es decir, el defecto de la detección simultánea de dos células en la zona óptica de detección del que resulta un impulso de mayor ancho.

25 En las figuras 6 y 7 se distinguen dos diagramas resultantes del análisis después de la medición óptica de células calibradas de 7 μm de diámetro. En la figura 6, el flujo de la solución que se va a analizar se genera según la presente invención mediante manguito activo (hidrofoco). En la figura 7, el flujo de la solución que se va a analizar se genera sin hidrofoco. El eje de ordenadas representa la amplitud de la señal resultante de la difracción de la fuente de luz (dispersada hacia adelante) en las células. Cada punto del diagrama representa el nivel de cada célula en el eje de ordenadas y su ancho asociado en el eje de abscisas. Como todas las partículas se desplazan a la misma velocidad en el flujo, la tecnología de hidrofoco permite distinguir las semi-coincidencias por la diferencia de ancho. En la Fig. 6, por ejemplo, el ancho medido para una semicoincidencia es aproximadamente dos veces mayor que el ancho medido para una célula detectada individualmente. Por el contrario, sin la tecnología de hidrofoco, las células se mueven a muchas velocidades diferentes, por lo que se detectan muchos anchos diferentes. Por tanto, no es posible aplicar un filtro de anchura sin rechazar detecciones individuales que tienen grandes anchuras (por ejemplo una célula lenta) ya que puede confundir estas detecciones individuales con ciertas detecciones de semi-coincidencias (dos células rápidas).

35 Las figuras 8 y 9 son diagramas para los que el eje de ordenadas representa la amplitud de la señal resultante de la absorbancia de la fuente de luz por la célula y el eje de abscisas representa la difracción en la célula. Se analizaron células de alta concentración de tamaños de 5 μm y 7 μm de diámetro en la misma dilución. En la figura 8, el flujo de la solución que se va a analizar se genera según la presente invención mediante manguitos activos (hidrofoco) y se ha aplicado un filtro de ancho de 7 μs (correspondiente al ancho de un impulso de una célula de 7 μm) en los impulsos generados por la detección de las células en la zona de detección óptica. Se eliminan todas las detecciones que producen anchos de impulso superiores a este límite. Todas las detecciones de eventos de semi-coincidencia pueden eliminarse.

40 En la figura 9, el flujo de la solución que se va a analizar se genera sin la tecnología de hidrofoco y también se ha aplicado un filtro de ancho de 7 μs . Se constata que el filtro de ancho no permite eliminar todas las semi-coincidencias (doble detección) debido a una dispersión demasiado grande de los anchos de impulso debido al gradiente de velocidad en el flujo.

Con la tecnología de hidrofoco, se pueden obtener mediciones consistentes incluso cuando la concentración de células es muy alta.

Idealmente, el dispositivo según la presente invención:

- 50
- utiliza el inyector de 200 μm con un manguito activo para reducir el diámetro de la muestra a 80 μm , y
 - utiliza una celda de 250 μm para reducir el flujo gracias al líquido de manguito a presión, esta vez jugando un papel activo en la forma del flujo.

55 Esto hace posible utilizar una relación de dilución idéntica para la medición resistiva, la medición óptica y la medición de la hemoglobina, y obtener un perfil de velocidad uniforme en toda la sección del flujo de muestra. Un perfil de velocidad uniforme significa que las células del flujo de análisis tienen la misma velocidad. Esto permite simplificar el

tratamiento numérico de las señales detectadas durante la medición óptica en comparación con el tratamiento numérico cuando las celdas tienen diferentes velocidades en la solución de análisis.

Por supuesto, la invención no se limita a los ejemplos que se acaban de describir y se pueden aportar numerosas modificaciones a estos ejemplos sin apartarse del marco de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo (1) de análisis de una muestra de sangre que comprende:

- 5 - un tanque (2) de dilución y análisis adecuado para contener una solución (3) de análisis obtenida por dilución de la muestra de sangre en al menos un reactivo, presentando esta solución de análisis una tasa de dilución conveniente para medir la hemoglobina,
- una celda (4) de flujo que comprende una celda (5) paralelepípeda, un inyector (13) y entradas (7, 8) para el líquido del manguito,
- un sistema (6) hidráulico,
- 10 - un dispositivo (9) de medición óptica para medir subpoblaciones leucocitarias de glóbulos blancos contenidos en la solución de análisis,
- una unidad (10) electrónica para controlar las transferencias y medir la solución de análisis,

donde

- 15 - el tanque (2) de dilución y análisis está conectado directamente a la celda (4) de flujo de modo que la solución (3) de análisis utilizada para medir el nivel de hemoglobina también se utiliza para medir subpoblaciones leucocitarias de glóbulos blancos, con un nivel de dilución definido con una proporción inferior a 1/160,
- la celda (4) de flujo es del tipo de manga activa,
- el dispositivo (9) de medición óptica está asociado con la celda de flujo,
- el inyector tiene un diámetro interior de 200 μm , y
- 20 - la celda (4) de flujo y el sistema (6) hidráulico están concebidos para generar un flujo de la solución (3) de análisis, por hidrofoco de manga activa, que tiene un diámetro comprendido entre 70 y 90 μm para tener células suficientes para la medición óptica.

2. Dispositivo según la reivindicación 1, caracterizado porque el flujo de la solución de análisis (3) tiene un diámetro de 80 μm para la medición óptica.

25 3. Dispositivo según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la celda (5) paralelepípeda tiene un lado interior de 250 μm .

4. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el tanque (2) de dilución y análisis comprende un espectrofotómetro (11) para realizar una medida de hemoglobina directamente a partir de la solución (3) de análisis contenida en dicho tanque.

30 5. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el tanque (2) de dilución y análisis comprende un dispositivo (12) eléctrico para medir la resistividad de la solución de análisis contenida en dicho tanque.

6. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el dispositivo (9) de medida óptica también está configurado para contar y diferenciar las células contenidas en la solución (3) de análisis.

35 7. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la celda (4) de flujo comprende medios de presión parametrizados para que las células de la solución de análisis circulen en un flujo sin gradiente de velocidad sobre una sección del flujo.

8. Procedimiento de análisis de una muestra de sangre, comprendiendo este procedimiento las etapas siguientes:

- 40 - medir el nivel de hemoglobina de una solución (3) de análisis obtenida mezclando la muestra de sangre con al menos un reactivo en un tanque (2) de dilución y análisis,
- en donde también comprende las siguientes etapas:
 - transferencia directa, sin dilución, de dicha solución (3) de análisis hacia una celda (4) de flujo,
 - generar, mediante manguito activo en la celda (4) de flujo y mediante un inyector (13) que presenta un diámetro interior de 200 μm , un flujo de la solución (3) de análisis, teniendo este flujo un diámetro comprendido entre 70 y 90 μm ,
 - 45 - medición óptica de las subpoblaciones leucocitarias en el flujo de la solución (3) de análisis, teniendo esta solución (3) de análisis el mismo nivel de dilución que la solución (3) de análisis utilizada para medir el nivel de hemoglobina; estando definida esta tasa de dilución con una relación de menos de 1/160.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque también se lleva a cabo una medición resistiva directamente a partir de dicha solución (3) de análisis en dicho tanque (2) de dilución.

10. Procedimiento según la reivindicación 8 o 9, caracterizado porque durante la medición óptica, se detectan células, y para cada célula detectada, se aplica un filtro de ancho a las señales que se originan en la medición óptica para eliminar cualquier detección que tenga un ancho de impulso mayor que un valor predeterminado.

5

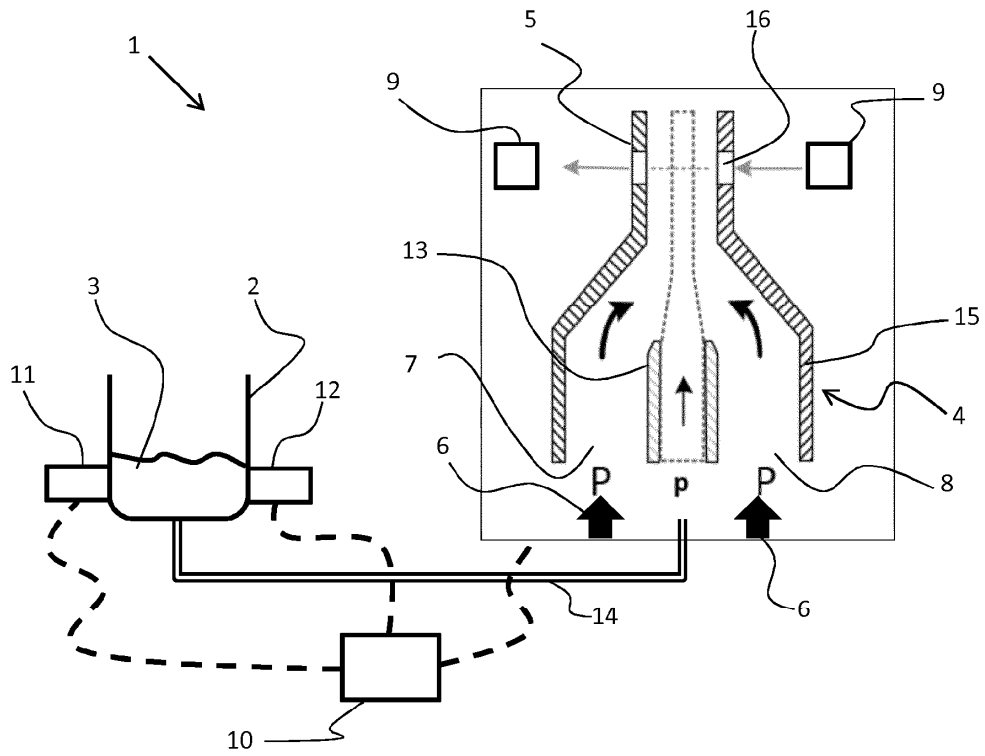


Figura 1

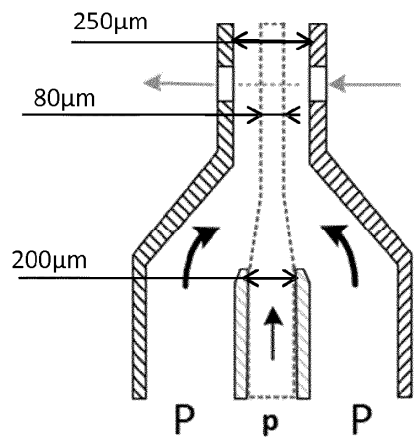


Figura 2

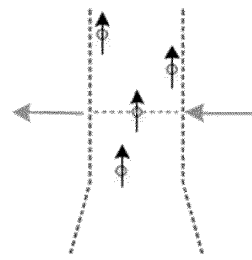


Figura 3

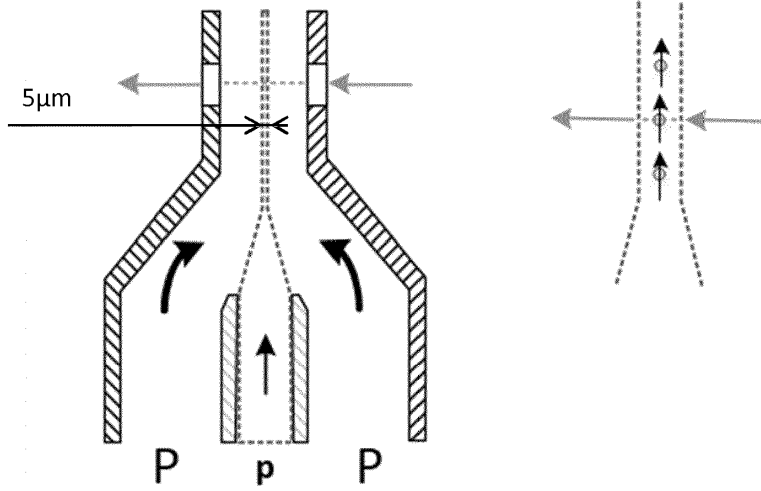


Figura 4
Técnica anterior

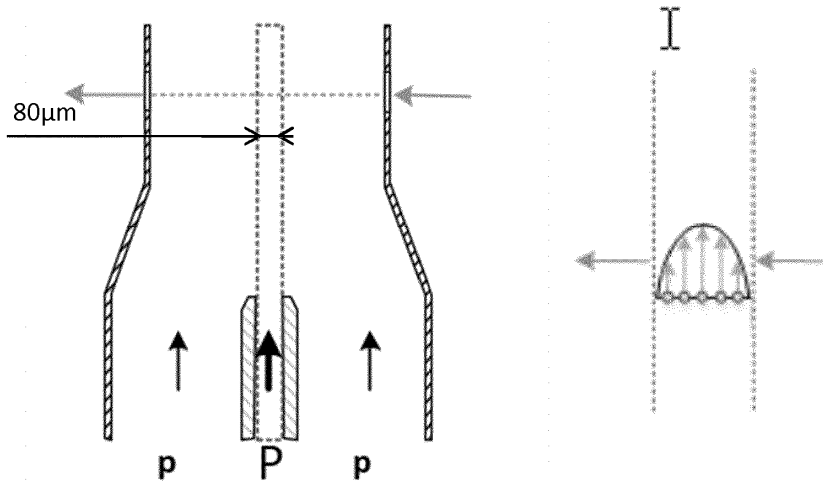


Figura 5
Técnica anterior

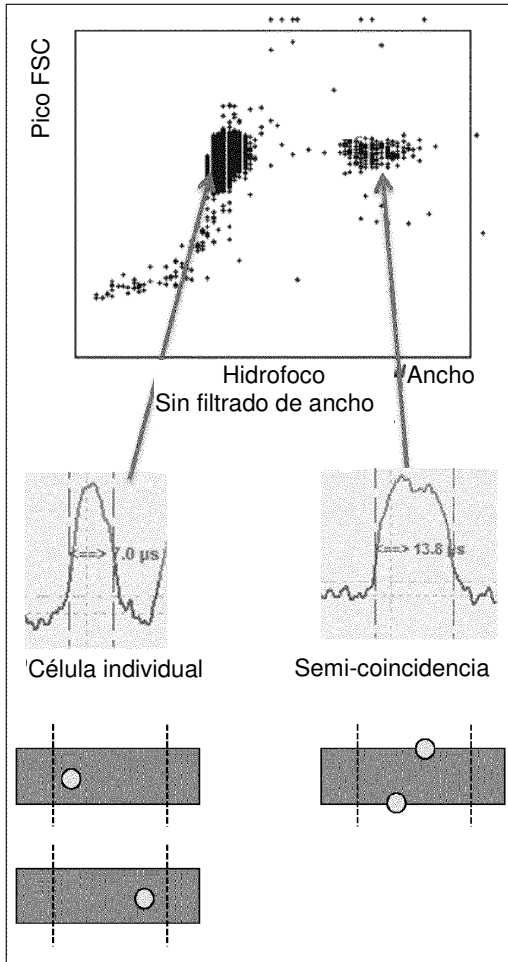


Figura 6

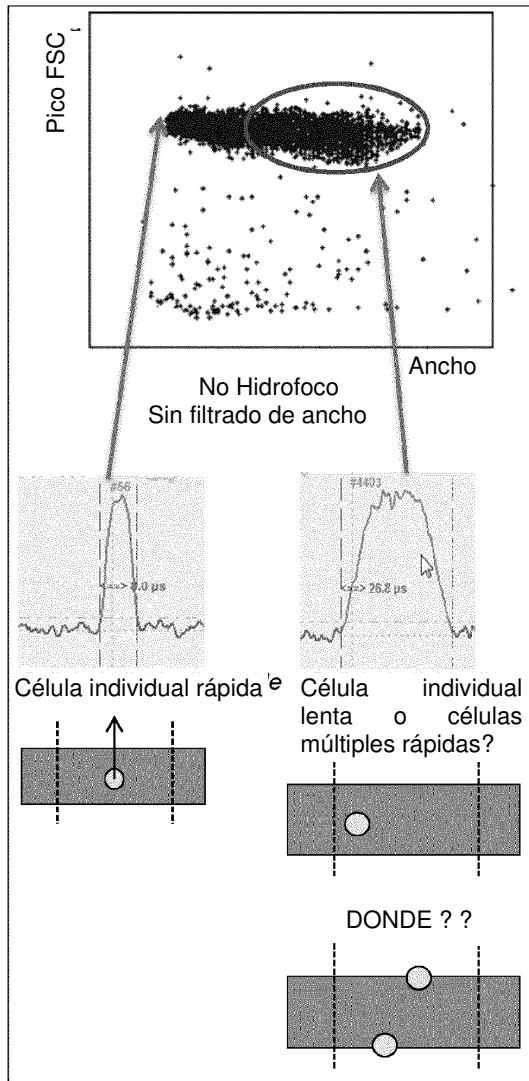


Figura 7

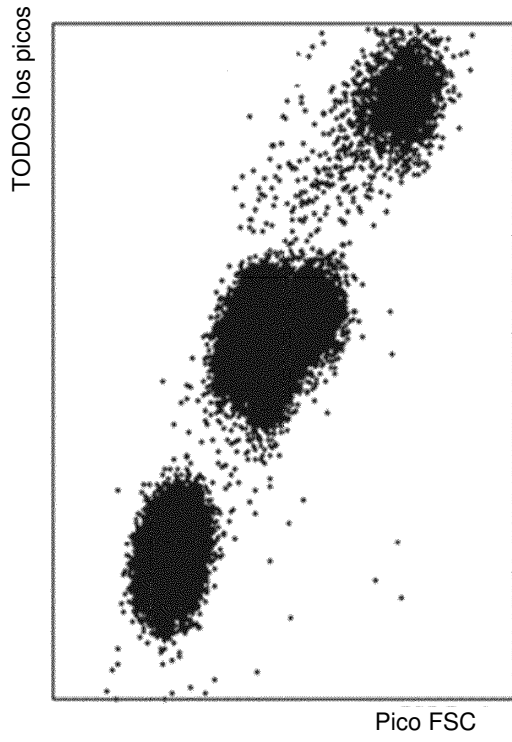


Figura 8

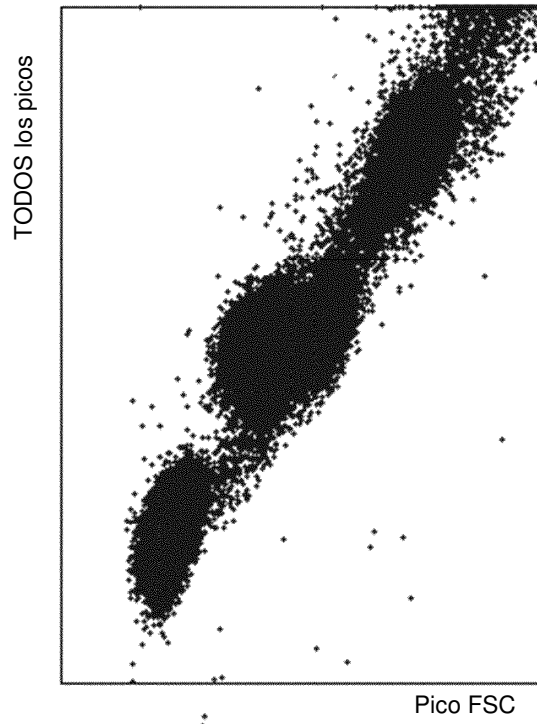


Figura 9