
Octrooiraad



Nederland

⑩ A Terinzagelegging ⑪ 8201971

⑲ NL

- ⑤4 **Inrichting voor het verkrijgen van een enkele laag.**
- ⑤1 **Int.Cl³: G02B 21/34, G01N 35/00, G01N 1/28.**
- ⑦1 **Aanvrager: Coulter Electronics Inc. te Hialeah, Florida, Ver. St. v. Am.**
- ⑦4 **Gem.: Ir. F.X. Noz c.s.
Algemeen Octrooibureau
Boschdijk 155
5612 HB Eindhoven.**

-
- ②1 **Aanvraag Nr. 8201971.**
- ②2 **Ingediend 13 mei 1982.**
- ③2 **Vorrang vanaf 14 mei 1981.**
- ③3 **Land van voorrang: Ver. St. v. Am. (US).**
- ③1 **Nummer van de voorrangsaanvraag: 263712 .**
- ⑥2 **--**

-
- ④3 **Ter inzage gelegd 1 december 1982.**

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

Korte aanduiding: Inrichting voor het verkrijgen van een enkele laag.

De uitvinding heeft betrekking op een inrichting voor het verkrijgen van een enkele laag om cellen uit een vloeibare suspensie aan te brengen op een plaatje dat moet worden onderzocht. Met name heeft de uitvinding betrekking op de bereiding van vloeibare cellulaire monsters op microscoopplaatjes of dergelijke substraten voor het daarop volgend onderzoek onder een microscoop.

Celpreparaten bestaande uit een enkele laag zijn gewoonlijk vereist voor geautomatiseerde analyses van cellen en zijn ook vaak gewenst voor visuele analyse. Preparaten bestaande uit een enkele laag worden met name verkregen door het verzamelen van cellen in een vloeibare suspensie en het vervolgens vervaardigen van cellagen op een microscoopplaatje. Bij de uiteindelijke plaatsing van de cellen op het plaatje moet ervoor worden gezorgd dat men bijvoorbeeld de gewenste celconcentratie heeft in de vloeibare suspensie en de juiste viscositeit van de suspensie. Er worden een aantal inrichtingen gebruikt bij de bekende stand van de techniek om de cellen te verspreiden op het plaatje. Dergelijke inrichtingen omvatten roteerorganen, bevestigingsorganen of centrifugale houders. De centrifugale houders zijn echter moeilijk te automatiseren en met name de rotatieorganen en de bevestigingsorganen geven vaak niet geschikte preparaten.

Onlangs is nader onderzoek verricht naar het filtreren van celsuspensies op een filter en het overbrengen van de cellen van het filter op het microscoopplaatje door het filter hiermee in contact te brengen of door een oplosbewerking, zoals vermeld in de volgende artikelen:

1) G.L. Garcia en W.E. Tolles, "Ultrasonic disaggregation of cell clusters", J. Histochem. Cytochem., 25:508, 1977, en

2) D.L. Rosenthal, E. Stern, C. McLatchie, L.D. Lagasse, R. Wall en K.R. Castleman, "A simple method of producing a monolayer of cervical cells for digital image processing", Anal. Quant. Cytol., 1:84, 1979.

De onderhavige uitvinding is gericht op een inrichting voor het verkrijgen van enkele lagen voor het aanbrengen van cellen op een plaatje dat met behulp van een microscoop of een dergelijke optische inrichting moet worden onderzocht, welke inrichting hierdoor wordt gekenmerkt, dat deze bestaat uit afmeetorganen ter verkrijging van een hoeveelheid vloeibare suspensie met hierin een gewenst aantal cellen, een vatvormig toepassingsorgaan bij een eerste station voor het ont-

vangen van de hoeveelheid vloeistof en met een raam gevormd aan de onderkant voor het ontvangen van de hoeveelheid vloeistof, een filtreerband om de vloeistof van de vloeibare suspensie door te voeren waarbij de cellen achterblijven, lage drukorgaan, gekoppeld aan het vatvormig toepassingsorgaan voor het afzuigen van vloeistof uit de vloeibare suspensie door de band waarbij de cellen worden aangebracht op een bandgedeelte van de filtreerband, voortbewegingsorganen voor het voortbewegen van het bandgedeelte met de cellen van het eerste station naar een tweede station en aanbrengorganen om het bandgedeelte met de cellen tegen het plaatje bij het tweede station zodat de cellen aan het plaatje hechten.

De uitvinding zal nader worden toegelicht aan de hand van de volgende beschrijving, waarbij ter toelichting is verwezen naar de bijgevoegde tekening, waarbij:

fig. 1 een algemeen, schematisch overzicht geeft van de inrichting volgens de uitvinding en

fig. 2 een alternatieve uitvoeringsvorm geeft ter verkrijging van het gewenste aantal cellen in het vatvormig toepassingsorgaan zoals aangegeven in fig. 1.

Een inrichting voor het verkrijgen van een enkele laag, is in fig. 1 in het algemeen aangegeven met verwijzingscijfer 10. Biologische cellen worden op een bekende wijze verwerkt om samenklontering van cellen te verwijderen. De afzonderlijke, afgescheiden cellen, die normaal worden gesuspenderd in een suspenderoplossing zoals een isotone oplossing worden vervolgens in een monsterbad 12 aangebracht. Een drukbron 14 geeft een positieve druk aan vat 12 via leiding 16. De positieve druk die wordt uitgeoefend op bad 12 geeft een monstersuspensie 17 die cellen bevat die bewegen door een leiding 18 naar een conventionele celvoeler 20. De celvoeler 20 is bij voorkeur een eenvoudige deeltjesdetector die in staat is om de afzonderlijke deeltjes te detecteren onder toepassing van het principe van Wallace Coulter zoals beschreven in het Amerikaanse octrooischrift 2.656.508. Met name is de celsensor van een type waarin een elektrische stroom wordt geleid door een gevoelige zone samen met de afzonderlijk vastgehouden deeltjes zodat elk deeltje een deeltjespuls geeft. Elke deeltjespuls uit de celsensor 20 wordt met behulp van een geleider 22 toegevoerd aan een conventionele pulsdetector en teller 24, zoals vermeld in het Amerikaanse octrooischrift 2.656.508. Een controle-eenheid 26 maakt het in het begin mogelijk dat de drukbron 14 start door middel van

- geleider 25, waardoor een positieve druk wordt verkregen, die op zijn beurt het monster doorvoert naar de celsensor. Ook wordt de celtelling doorgegeven aan de controle-eenheid 26 vanaf de teller 24 via een elektrische geleider 30. Wanneer de celteller een tevoren bepaalde waarde krijgt en de controle-eenheid 26 desactiveert de drukbron 14, zal de stroom van de monstersuspensie naar de celsensor 20 worden gestopt. De controle-eenheid 26 kan de vorm hebben van een eenvoudige microprocessor of anderzijds de vorm hebben van hardware in de vorm van een circuit, tel-aftakbepalingscircuit en desactiveringscircuit.
- 10 Dankzij de bovenvermelde structuur zal een monster houdende suspensie met een bekend aantal cellen worden toegevoerd vanuit een mondstuk 27 van de celsensor 20 naar een vatvormig toepassingsorgaan 28. Omdat het totaal aantal cellen dat wordt toegevoerd naar vat 28 gehouden wordt op een bepaald aantal kan de hoeveelheid vloeistof die in de monstersuspensie wordt doorgelaten, variëren, zonder dat dit enige nadelige invloed heeft op het verkrijgen van de enkelvoudige laag. Zodoende kan de celconcentratie in de suspensie van hoeveelheid 12 binnen een ruim gebied variëren. De monstersuspensie 17 in bad 12 moet echter voldoende verdund zijn om de toevallig optredende problemen bij het tellen van
- 15 cellen te verminderen, afhankelijk van het cellulaire materiaal dat wordt bewerkt, zodat de cellen niet gevouwen worden en om het bewerkingsoppervlak van de filterband 34 onder raam 32 te bevochtigen.
- Het vatvormig toepassingsorgaan 28 heeft een raam 32 aan de onderzijde die open uitmondt op en in contact is met een filterreestrip of
- 25 band 34. Met name sluit band 34 raam 32 af en het vatvormig toepassingsorgaan 28 en band 34 rusten op een afloop 36 met een bovenstuk 38. Het bovenstuk 38 heeft een vorm die zodanig is dat deze aansluit bij raam 32, ter verkrijging van een waterdichte afsluiting. Wanneer de monstersuspensie wordt toegevoerd aan vat 28 of nadat het totale volume van de monstersuspensie toestroomt aan vat 28, maakt de controle-eenheid
- 30 26 een bron 40 ter verkrijging van een verlaagde druk mogelijk, zodat een afzuiging wordt bewerkstelligd in afvoer 36. Deze negatieve druk zuigt de vloeistof van de monstersuspensie door band 34 in de richting van pijl 42, zodat de cellen achterblijven op het bovenoppervlak van band 34.
- 35 Na een bepaalde tijd die voldoende is voor het afvoeren van alle vloeistof uit het vatvormig toepassingsorgaan 28 desactiveert de controle-eenheid 26 via geleider 43 de bron 40 voor de verlaagde druk. De opbrenging van de cellen door het vatvormig toepassingsorgaan 28 geeft

een eerste station of toepassingsstation 44, hetgeen de eerste bewerkings-trap is voor band 34.

Nadat de cellen zijn aangebracht op band 34 wordt het vatvormig toepassingsorgaan 28 omhoog gebracht vanaf band 34 in de richting van
5 pijl 45. Dit wordt uitgevoerd met behulp van controle-eenheid 26 waarmee een signaal wordt verkregen via geleider 46 aan een motorisch overbreng-mechanisme 48. Anderzijds kan afvoer 36 worden verlaagd en de negatieve druk van bron 40 voor het verkrijgen van de verlaagde druk worden gehand-
haafd, zodat band 34 naar beneden wordt getrokken van vat 28. Daarna
10 wordt band 34 bewogen naar een tweede station 50. Deze beweging wordt uitgevoerd onder invloed van controle-eenheid 26, waarbij via geleider 52 een motor 54 wordt bekrachtigd gedurende een bepaalde tijd. De motor 54 bekrachtigt een haspel 56 zodat band 34 wordt opgewonden. Band 34
wordt eerst gewonden rond een haspel 58. Zodoende komt band 34 vrij van
15 haspel 58, loopt door onder een paar rollen 60 en 62 zodat deze de eerste een tweede stations 44 en 50 passeert en wordt vervolgens opgewonden rond haspel 56.

Zoals eerder aangegeven wordt het deel van band 34 met de hierop aangebrachte cellen vooruit bewogen vanaf het eerste station 44 naar een
20 tweede station 50. Bij het tweede station 50 is een plaatje 64 aangebracht in een houder 65 voor een plaatje, op afstand ten opzichte van band 34. Een harde spons 66 is aangebracht aan de bovenkant van een blok 68 met een uitstekend gedeelte 70. Nadat de band 34 is bewogen zal de controle-eenheid 26 door middel van geleider 72 een motorisch overbrengmechanisme
25 74 in staat stellen om de harde spons 66 tegen band 34 te drukken, waarbij band 34 drukt tegen plaatje 64. Voordat deze stap wordt uitgevoerd werd een fixeermiddel verspreid over spons 66. Zodoende wordt het fixeermiddel op zijn beurt aangebracht op de cellen, waardoor niet alleen de cellen worden gefixeerd maar waardoor deze ook beter hechten op plaatje
30 64. Een voorbeeld van een bekend fixeermiddel dat kan worden toegepast volgens de uitvinding bevat in een liter: 95%-ige ethanol (107,7 ml), gedestilleerd water (995,2 ml), natriumchloride (7,7 g) en thymol (0,25 g). Zodra spons 66 naar voren wordt bewogen wordt het overbrengmechanisme 74 in richting omgekeerd door middel van controle-eenheid 26, zodat band 34
35 en spons 66 worden verwijderd vanaf het plaatje 64. Daarna wordt het plaatje met de hand verwijderd. De geautomatiseerde organen voor het op de plaats brengen van het plaatje en het daarna verwijderen van de plaatjes kan echter ook worden uitgevoerd met behulp van op zich bekende organen. Zodoende worden bij dit tweede station de cellen overgebracht

van band 34 naar plaatje 64 waar het fixeermiddel de cellen doet hechten aan plaatje 64.

Na het overbrengen van de cellen op het plaatje kan het bovenvermelde procédé opnieuw worden herhaald. De controle-eenheid 26 beweegt door
5 het omkeren van het motorische overbrengmechanisme 48 vat 28 terug in contact met een nieuw gedeelte van band 34. De controle-eenheid 26 brengt teller 24 opnieuw op nul door middel van een elektrische geleider 75. De controle-eenheid 26 activeert vervolgens de drukbron 14 om het gehele procédé opnieuw te beginnen.

10 Elke van de bovenvermelde trappen die wordt uitgevoerd met behulp van controle-eenheid 26 kan eveneens met de hand worden uitgevoerd door een operator, waarbij de noodzakelijkheid van de controle-eenheid 26 achterwege blijft. De ondersteuning voor de elementen van fig. 1 is
15 in het algemeen weergegeven door de ondersteunende delen 76, die diverse vormen kunnen hebben en die in feite een aantal dragers, haken en staanders kunnen omvatten, doch voor de eenvoud zullen deze verder worden beschreven als een enkelvoudige draagstructuur. De haspels 56 en 58 worden roteerbaar ondersteund door ondersteuningsorganen 76. De van een
20 motor voorziene overbrengmechanismen 48 en 74 die beurtelings in richting worden omgekeerd, zijn stevig gefixeerd op de dragerorganen 76 zodat het vat 28 en blok 68 respectievelijk op en neer bewegen ten opzichte van draaggedeelte 76. De celsensor 20, de afvoer 36, motor 54 en de houder voor het plaatje 65 zijn verbonden met het dragerorgaan 76. Desgewenst kan de houder door het plaatje 65 worden aangepast zodat dit is gekoppeld
25 aan een geautomatiseerd orgaan voor het doen bewegen van diverse plaatjes.

Fig. 2 geeft een nadere toelichting op een alternatieve uitvoeringsvorm voor het aanbrengen van een aantal cellen in vat 28. In tegenstelling tot de eerste uitvoeringsvorm zoals weergegeven in fig. 1, waarbij het totale aantal deeltjes wordt geteld, wordt in deze appara-
30 tuur de snelheid bepaald waarmee de cellen worden aangebracht in vat 28 en ingesteld op een gewenste snelheid, zodat het juiste aantal cellen wordt afgegeven na een bepaalde tijdsperiode dat de vloeistofstroom door de celsensor 20 stroomt. Bij deze apparatuur wordt een in de handel beschikbare microprocessor gebruikt zoals de ISBC 86/12A, vervaardigd door
35 Intel Corporation, Santa Clara, Californië, waarmee een aandrijforgaan 78 voor een spuit wordt geregeld. Binnen eenheid 78 is een tweetal spuiten 80 en 82 geplaatst. Spuit 80 bevat het monster en spuit 82 bevat een verdunningsmiddel zoals een isotone zoutoplossing. Een aandrijforgaan 84 bewerkstelligt een positieve verplaatsing van de afzonderlijke spuiten

80 en 82, zodat een gewenste verhouding wordt verkregen tussen de vloeistofstromen uit de twee spuit. De stroomsnelheid uit de twee spuit. 80 en 82 en zodoende de verhouding van de twee stromen wordt bepaald door de controle-eenheid 26 via de respectieve geleiders 86 en 88. Bij deze opbouw is de controle-eenheid 26 een microprocessor en kan ook dienen als bekrachtigings-en desactiveringsfunctie zoals het controle-orgaan 26 toegepast in de eerste uitvoeringsvorm. Hoewel hetzelfde verband aanwezig is tussen de controle-eenheid 26 en diverse onderdelen van het systeem zoals weergegeven in fig. 1, en deze ook van toepassing zijn bij deze opbouw, zijn deze niet weergegeven in fig. 2. Bij het in werking zijn van de controle-eenheid 26 worden de tellingen weergegeven, verkregen door de pulsdetector en teller 24 om de snelheid te bepalen waarmee de deelpulsen worden geteld. De controle-eenheid 26 wordt geprogrammeerd zodat deze in het geheugen een gewenste telsnelheid heeft die wordt vergeleken met de bepaalde telsnelheid. Wanneer de bepaalde telsnelheid afwijkt van de gewenste telsnelheid worden de stroomsnelheden uit de spuit. 80 en 82 op overeenkomstige wijze opnieuw ingesteld. De stromen uit de spuit. 80 en 82 lopen door een paar respectieve leidingen 90 en 92 zodat deze worden gemengd op het mengpunt 94. Daarna wordt het mengsel toegevoerd via een leiding 96 aan een sensor 20. De rest van inrichting 10 is weergegeven in fig. 1. Met de in beeld gebrachte stroom via de celsensor 20 met de gewenste telsnelheid zal de controle-eenheid 26 de aandrijvende werking van het aandrijforgaan 84 op een bepaald tijdstip stoppen. Dit tevoren bepaalde tijdstip is zodanig vastgesteld dat bij de gewenste telsnelheid het juiste aantal cellen aanwezig is in het vatvormig toepassingsorgaan 28 op het einde van elke bewerkingscyclus.

Monsters op het plaatje, bereid op de bovenbeschreven wijze geven een hoge snelheid voor het overbrengen van cellen op een plaatje 64 en een goede hechting hierop. Bovendien is de inrichting 10 voor het verkrijgen van de enkelvoudige laag makkelijk te zuiveren en het gebruik van de filterband 34 helpt ter opheffing van het probleem van de verontreiniging evenals om het ontwerp met meerdere stations te vereenvoudigen. Het gebruik van deze inrichting kan voor diverse doeleinden plaatshebben, waarvan enkele toepassingen ter toelichting zijn cervicale celmonsters, urinemonsters en sputummonsters. Bovendien kan inrichting 10 ook worden gebruikt voor lichaamsvloeistoffen evenals voor gescheiden weefselfragmenten of monsters van weefselkweek.

Hoewel bepaalde uitvoeringsvormen volgens de uitvinding hierboven zijn toegelicht en beschreven moeten deze uitvoeringsvormen niet als een beperking worden opgevat. Het is mogelijk om modificaties, andere uitvoeringsvormen en dergelijke toe te passen en te gebruiken, die equivalent zijn aan de uitvoeringsvorm zoals in de uitvinding omvat.

5 Samengevat heeft de uitvinding dan ook betrekking op een inrichting voor het verkrijgen van een enkele laag, bestaande uit een opstelling die een celsensor omvat voor het ontvangen van een vloeistofsuspensie met cellen en voor het regelen van het aantal cellen dat door een toepassings-
10 vat stroomt, een filterband waarop het toepassingsvat is geplaatst bij een eerste station, een bron voor verlaagde druk voor het afzuigen van vloeistof uit de vloeistofsuspensie uit het toepassingsvat via de band, organen voor het doen bewegen van de band althans voor het doen bewegen van een deel van de band met hierop aangebrachte cellen van het
15 eerste station naar een tweede station waar een plaatje is geplaatst, en een spons met een fixeermiddel hierin, aangebracht op een blok voor het aanbrengen van de band tegen het plaatje zodat de cellen aan het plaatje zullen hechten.

CONCLUSIES

1. Inrichting voor het verkrijgen van een enkele laag om cellen uit een vloeibare suspensie aan te brengen op een plaatje dat moet
5 worden onderzocht, met het kenmerk, dat deze bestaat uit afmeetorganen 14, 20, 24, 26, 80, 82, 84 ter verkrijging van een hoeveelheid vloeibare suspensie met hierin een gewenst aantal cellen, vatvormig toepassingsorgaan 28, geplaatst bij een eerste station 44 voor het ontvangen van de hoeveelheid vloeistof, een filtreerband 34 voor het ontvangen
10 bij het eerste station 44 van de vloeibare suspensie 17 uit het vatvormig toepassingsorgaan 28, welke filtreerband in staat is om de vloeistof van de vloeibare suspensie verder te voeren, terwijl de cellen achterblijven, lage drukorgaan 40 gekoppeld aan het vatvormig toepassingsorgaan 28 voor het afzuigen van vloeistof uit de vloeibare
15 suspensie door de band, waarbij de cellen worden aangebracht op een bandgedeelte van de filtreerband, voortbewegingsorgaan 54, 56, 58 voor het voortbewegen van het bandgedeelte met de cellen van het eerste station 44 naar een tweede station 50 en aanbrengorganen 66, 68, 70, 74 om het bandgedeelte met de cellen aan te brengen tegen het
20 plaatje bij het tweede station 50 zodat de cellen aan het plaatje hechten.

2. Inrichting volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het vatvormig toepassingsorgaan 28 een raam 32 heeft tegenover de filtreerband 34 waardoor de vloeistofsuspensie 17 wordt toegevoerd op het bandgedeelte.
25

3. Inrichting volgens conclusies 1 of 2, met het kenmerk, dat het aanbrengorgaan bestaat uit een spons 66 die beweegbaar is gemonteerd op 68, 70, 74, die in contact kan komen met band 34 zodat de band tegen het plaatje 64 kan worden gedrukt.

30 4. Inrichting volgens conclusies 1-3, met het kenmerk, dat het aanbrengorgaan 66 een fixeermiddel hierop heeft, welk fixeermiddel kan worden aangebracht op de cellen wanneer het aanbrengorgaan in contact komt met de band.

35 5. Inrichting volgens conclusies 1-4, met het kenmerk, dat het meetorgaan een celteller 24 omvat.

6. Inrichting volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat het meetorgaan 14 bewegingsorganen omvat voor het doen bewegen van de vloeistofsuspensie in een vloeistofstroom en stoporganen 26 voor het doen stoppen van de vloeistofstroom nadat de celteller 24 een bepaald aantal cellen

heeft bepaald.

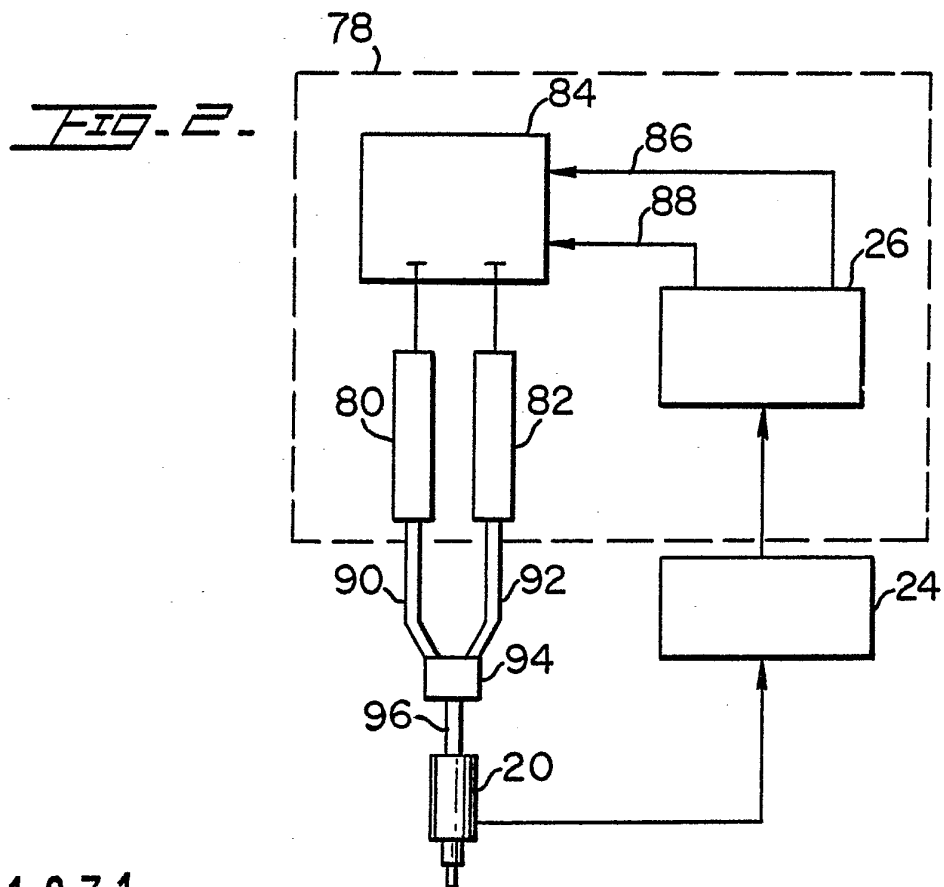
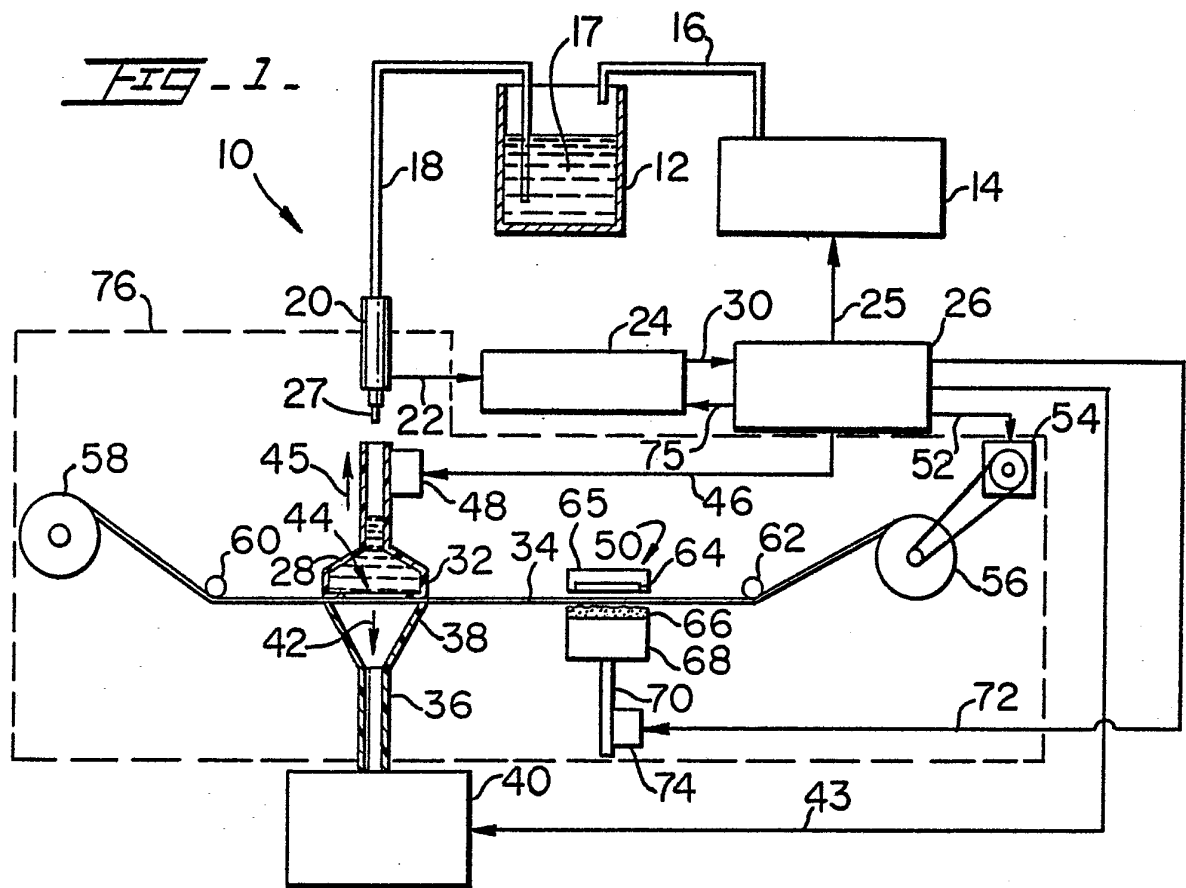
5 7. Inrichting volgens conclusies 1-5, met het kenmerk, dat de meetorganen 80, 82, 84 zo zijn opgesteld en ingericht dat een stroom wordt verkregen van een suspensie-vloeistof gedurende een bepaalde periode met een bij voorkeur toe te passen stroomsnelheid.

10 8. Inrichting volgens conclusies 5-7, met het kenmerk, dat controleorganen 26 voor de stroomsnelheid zijn toegepast die de telsnelheid weergeven door de celteller 24 en vervolgens de stroomsnelheid instellen van de vloeistofsuspensie zodat de telsnelheid een te voren bepaalde waarde geeft.

15 9. Inrichting volgens conclusies 1-8, met het kenmerk, dat de meetorganen omvatten mengorganen 94 voor het mengen van een verdunningsmiddel met de vloeibare suspensie en controleorganen 26 voor het variëren van de hoeveelheid van de vloeistofsuspensie ten opzichte van de hoeveelheid verdunningsmiddel.

Eindhoven, mei 1982

8201971



8201971