

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 125**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2014.01)

G01N 21/05 (2006.01)

G01N 15/10 (2014.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2018 PCT/FR2018/051605**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2019 WO19002787**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2018 E 18749842 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2024 EP 3646002**

54 Título: **Tanque de medición para contar y/o caracterizar células**

30 Prioridad:

28.06.2017 FR 1755974

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

04.11.2024

73 Titular/es:

**DIAGDEV (100.0%)
182 Avenue de la Bandido Immeuble le Serena
34160 Castries, FR**

72 Inventor/es:

MERCHEZ, BENOIT

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 985 125 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

Tanque de medición para contar y/o caracterizar células

5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere al campo técnico de la citometría de flujo, en particular a accesorios para citometría de flujo como tanques de medición y soportes para dichos tanques de medición.

10 Estado de la técnica

La citometría de flujo ahora permite determinar las características y propiedades de las células, por ejemplo sus tamaños, contenidos intracelulares, contenidos en ADN, etc. También permite el estudio de la variación y distribución de estas características dentro de una población de células, lo que conduce en última instancia a la identificación de subpoblaciones entre células, como por ejemplo la diferenciación de las diferentes células que componen la sangre.

Por otro lado, la citometría de flujo es un método rápido. Típicamente, se caracterizan varios miles de células por minuto. Por tanto, permite la enumeración y caracterización de subpoblaciones raras de células. La rareza de estas subpoblaciones generalmente no permite su observación y caracterización mediante microscopía, particularmente por la imposibilidad de obtener un número estadísticamente aceptable de mediciones realizadas en estas subpoblaciones.

Además, gracias a la mejora en los últimos años de los sensores ópticos y, en particular, a su capacidad para detectar señales cada vez más débiles en intensidad, es posible medir tanto el volumen de una célula como obtener información sobre su contenido celular gracias a una medición de impedancia por un lado y a una medición óptica por otro.

La citometría de flujo consiste principalmente en hacer pasar células de forma individual a través de una vena de líquido de gran sección transversal en relación al tamaño de las células. Esta vena de líquido termina en una boquilla que tiene un orificio dimensionado para impedir el paso simultáneo o demasiado cercano en el tiempo de dos o incluso varias células. Como el caudal es constante entre la vena de líquido y el orificio, el diámetro de la vena de líquido disminuye, la velocidad de las células aumenta y, a la salida de la boquilla, las células alcanzan velocidades del orden de varios miles por segundo en un chorro de líquido que tiene el diámetro de la boquilla.

La medición del volumen de células se lleva a cabo midiendo la impedancia a cada lado del orificio de la boquilla. En efecto, el volumen de una célula se correlaciona con una variación en la impedancia causada por su paso a través de un medio conductor (sistema Coulter), con la célula que se considera eléctricamente aislante. El volumen se determina de forma absoluta, cualquiera que sea la forma de la célula.

Por otro lado, el paso de las células a través del orificio de la boquilla asegura un cierto centrado hidrodinámico de las células y también su orientación. Por tanto, es posible posicionar con precisión el chorro que sale de la boquilla y que contiene las células en un haz de luz emitido por una fuente de excitación. Cuando una célula atraviesa el haz de luz, difunde un cierto número de señales ópticas que el citómetro puede utilizar para determinar las propiedades de la célula. Estas señales ópticas incluyen:

- la reflexión de la luz en la célula, debido a la diferencia de índices entre el líquido y la célula, pero también entre los diferentes componentes de la célula, dando como resultado la reflexión de parte de un rayo de luz incidente;
- la refracción de la luz en la célula, lo que provoca una desviación del rayo de luz que penetra en la célula; y
- la difracción de la luz en la célula, principalmente en un ángulo sólido que va desde unos pocos grados hasta un ángulo sólido de 360°.

Todas estas señales son recogidas por un sistema de recogida óptica, que a continuación se separan según su longitud de onda (ancho a media altura de entre 20 y 50 nm, o incluso de 30 a 40 nm) a través de un sistema de filtros ópticos y finalmente llegar a diferentes sensores de luz. Estos diferentes sensores se pueden adaptar para:

- medir la dispersión en ángulos pequeños (*forward scatter* en inglés) de la célula;
- medir la dispersión en ángulos grandes (*side scatter* en inglés) de la célula;
- medir la absorbancia de la célula; y
- medir la fluorescencia de la célula.

La difracción en ángulos pequeños se debe a la dispersión de parte de la luz incidente que llega a la superficie de la membrana celular por parte de esta última. La parte de la luz dispersada tiene la misma longitud de onda que la luz incidente. Se captura en el eje de la luz incidente. Da información sobre el tamaño y el índice de refracción medio de la célula.

La difracción en ángulos grandes se debe a la dispersión en todas las direcciones del espacio de la parte de la luz incidente que ha atravesado la membrana celular por los orgánulos intracelulares. Puede ser capturada por un fotomultiplicador o un fotodiodo de efecto de avalancha. Poniendo en juego las propiedades de refracción y reflexión,

proporciona información sobre la fina heterogeneidad del contenido celular.

La absorbancia requiere una fuente de excitación estable. Es proporcional al diámetro de la célula y al índice de absorción de los orgánulos intracelulares.

5 En el caso de que la célula esté marcada por uno o más fluorocromos, estos últimos emiten, durante su excitación, fluorescencia en una o más longitudes de onda mayores que la de la fuente de excitación en todas las direcciones espaciales. Los filtros de interferencia permiten la separación de diferentes longitudes de onda de fluorescencia (generalmente en espectros con un ancho a la mitad como máximo de 20 a 50 nm, incluso de 30 a 40 nm), cada uno
10 enviado a un fotomultiplicador. La intensidad de la fluorescencia medida depende del número de moléculas de fluorocromo unidas a la célula. Por ejemplo, en el caso del uso del marcador DRACQ 5, que es un fluorocromo que atraviesa pasivamente la membrana citoplasmática de las células y se une específicamente al ADN, es posible extraer información sobre células nucleadas. El marcador DRACQ 5 tiene dos máximos de absorción a 622 nm y 676 nm y
15 entre dos en la región ultravioleta a 240 nm y 314 nm. Emite fluorescencia roja a longitudes de onda comprendidas entre 665 nm y 800 nm. El filtro utilizado generalmente es un filtro de tipo dicróico que refleja a 90° del haz incidente todos los componentes espectrales por debajo de 650 nm y transmite los componentes espectrales por encima de 650 nm. Considerando la definición de fuente de luz, el primer filtro está centrado naturalmente en la longitud de onda de la fuente de luz con un ancho de banda de alrededor de 50 nm. Por tanto, en este montaje, es posible medir tres cantidades físicas para cada partícula: una medida eléctrica representativa del volumen de la partícula, una medida
20 de extinción ligada a la refracción de la célula, y finalmente una medición de fluorescencia ligada al contenido de ácido nucleico de la célula analizada.

La citometría de flujo se utiliza ventajosamente para el estudio de la hematología permitiendo el diagnóstico y seguimiento terapéutico de diferentes virus, infecciones y parásitos, así como el estudio funcional de células sanas.
25 Usando citometría de flujo, es posible contar y caracterizar los diferentes tipos de células sanguíneas.

Por ejemplo, la citometría de flujo aplicada a los leucocitos permite conocer su número total y diferenciarlos según su morfología y clasificarlos en tres tipos diferentes gracias a una medición del volumen celular por impedancia y una medición de la absorción.

30 Un primer tipo es el de los monocitos, que son células grandes (de 20 a 40 µm de diámetro). La forma de su núcleo puede ser redondeada, ovalada, con forma de riñón o francamente irregular; el caso más común es la forma de riñón. Su cromatina no es muy densa, no moteada, y de estructura regular. El tiempo de residencia de los monocitos en la sangre es de 2 días antes de su paso al tejido y el tiempo de tránsito en la médula ósea es de 1 a 2 días. Cuando se activan, se convierten en macrófagos. Son capaces de fagocitar bacterias, células enteras, así como diversas
35 partículas denominadas contaminantes, como el polvo.

Un segundo tipo es el de los linfocitos que tienen un papel importante en el sistema inmunológico. Se pueden separar en dos grupos de diferentes tamaños:

- 40
- linfocitos pequeños (de 7 a 9 µm de diámetro) que tienen un núcleo redondeado u ovalado, a veces con forma de riñón y citoplasma pequeño, claro o ligeramente basófilo y con mayor frecuencia que se extiende a un lado del núcleo; y
 - linfocitos de mayor tamaño (de 9 a 15 µm de diámetro), que tienen un núcleo centrado o ligeramente excéntrico
45 con un citoplasma más extenso que el de los linfocitos pequeños y que rodean completamente el núcleo.

Un tercer tipo, el de los granulocitos o también llamados células polinucleares, y cuya función principal es la protección contra infecciones, se puede diferenciar en tres subcategorías.

50 En primer lugar, los neutrófilos son los granulocitos más abundantes (alrededor del 96 %). Tienen forma redondeada y un diámetro de 12 a 14 µm. Se caracterizan por la forma multilobulada de su núcleo (de 3 a 5 lóbulos). Tienen un tiempo de residencia en sangre de 2 días antes de su paso al tejido y un tiempo de tránsito medular de los precursores granulares de 10 a 14 días. Hay un compartimento medular de reserva de neutrófilos. Son muy eficaces para destruir bacterias y predominan durante la inflamación aguda. Su función esencial es la defensa del organismo contra
55 microorganismos extraños, como bacterias y levaduras. Sus funciones excretoras promueven reacciones inflamatorias locales en los tejidos y contribuyen a su defensa.

A continuación, los basófilos son muy escasos y representan solo aproximadamente el 0,5 % de los leucocitos. Tienen un diámetro de 10 a 14 µm. Su núcleo bilobulado está enmascarado por granulaciones específicas, bastante numerosas y dispersas por toda la célula. Su tiempo de residencia en la sangre es de 12 a 24 horas, sin paso tisular conocido. El tiempo de tránsito medular sería idéntico al de los neutrófilos. Una función importante de los basófilos es atraer a los eosinófilos.

60 Finalmente, los eosinófilos representan aproximadamente del 2 al 5 % de los leucocitos circulantes (aproximadamente 350 elementos por milímetro cúbico). Se trata de células de 12 a 14 µm de diámetro caracterizadas por un núcleo bilobulado y especialmente por el aspecto de las granulaciones esféricas (de 0,5 a 1,5 µm de diámetro). Contienen
65

gránulos azurófilos. Los eosinófilos son células clave en la inflamación alérgica y la defensa antiparasitaria. Su distribución es principalmente tisular, la fracción circulante representa solo el 1 % del número total de eosinófilos. Su tiempo de tránsito en la sangre es de 3 a 8 horas después de salir de la médula y hasta su depósito en los tejidos (principalmente los intestinos, los pulmones, la piel y el útero) donde tendrán una vida útil de unos diez días.

5 Otro ejemplo, es posible determinar el número total de eritrocitos y plaquetas, diferenciarlas según su morfología y clasificarlas mediante una medida de volumen celular por impedancia y una medida de absorción.

10 Otras aplicaciones de la citometría de flujo son de evidente interés diagnóstico gracias a la caracterización y/o enumeración de diferentes tipos de células sanguíneas como los reticulocitos, eritroblastos, células inmaduras y precursores de leucocitos, linfocitos activados o incluso plaquetas reticuladas.

15 Para medir el volumen de una célula por impedancia se utiliza un dispositivo que comprende un tanque cuya base tiene un orificio de un diámetro de aproximadamente 50 μm que permite el paso individual de una célula en un flujo de líquido. Aguas arriba del orificio, el flujo de líquido está formado por un chorro de muestra que comprende las células que se van a caracterizar y un chorro de revestimiento (generalmente agua salada) que rodea el chorro de muestra que permite el hidrofoco del chorro de muestra. Los terminales de un voltímetro están conectados eléctricamente a electrodos, uno de los cuales está colocado aguas arriba del orificio y el otro aguas abajo, siendo necesarias juntas tóricas para asegurar la estanqueidad a estos niveles. La variación de voltaje que se observa cuando pasa una célula es representativa de su volumen.

20 La base del tanque se compone generalmente de un disco de unos pocos milímetros de diámetro y algunos micrómetros de espesor elaborado con piedras preciosas como el carísimo rubí sintético. El orificio de paso se mecaniza en este disco y a continuación el disco se engarza manualmente en el extremo de una boquilla. La operación de engarzado no está exenta de riesgos porque pueden aparecer microfisuras, creando así una modificación de la resistividad entre los electrodos positivo y negativo, distorsionando así la medida de la impedancia.

25 En cuanto a las medidas ópticas, estas utilizan otro dispositivo que comprende un tanque formado por una base plana que tiene en su centro un orificio cuyo diámetro de 80 μm permite el paso individual de una célula en un flujo de líquido y un recinto transparente presionado contra la base. Entre el recinto y la base, una junta asegura el sellado entre estas dos partes. Una entrada de revestimiento secundaria en la parte inferior del recinto, cerca de la base, permite la llegada de un chorro de revestimiento para envolver el flujo de muestra y acompañarlo a lo largo de una longitud de 400 μm donde el flujo de muestra cruza un haz de luz emitido por la fuente de excitación. Es necesaria una segunda junta para garantizar la estanqueidad en la parte superior del tanque.

30 Para realizar mediciones de volumen y mediciones ópticas al mismo tiempo, es posible combinar los dos dispositivos en un solo dispositivo utilizando la base del dispositivo de medición de volumen como base para el dispositivo de medición óptico. Sin embargo, una disposición de este tipo requiere el uso de cuatro juntas. Por otro lado, no se puede garantizar la ausencia de fugas entre los diferentes elementos.

35 El documento US 2010/290041 A1 presenta un tanque de medición con un tanque de una sola pieza adecuado tanto para la medición de impedancia como para la medición óptica.

40 El documento FR 3 022 998 A1 presenta un tanque de medición con un orificio montado en el cuerpo de la boquilla.

45 **Objeto de la invención**

Uno de los objetivos de la presente invención es superar al menos una de las desventajas de la técnica anterior. La invención se expone en el juego de reivindicaciones adjunto.

50 Por eso, la invención propone un tanque de medición para el recuento y/o caracterización de células, particularmente células sanguíneas, el tanque de medición que comprende una base y un recinto lateral transparente que se extiende desde la base para formar con la misma una cámara de medición óptica; teniendo la base un orificio de paso de 30 a 100 μm de diámetro para el paso de las células, caracterizado porque la base y el recinto lateral transparente forman un tanque de una sola pieza adecuado tanto para la medición de impedancia como para la medición óptica.

55 Gracias a este tanque de medición de una sola pieza, es posible prescindir de tres de las cuatro juntas necesarias hasta ahora para un tanque de medición que permite tanto la medición del volumen celular como las mediciones ópticas. En efecto, debido a su naturaleza monobloque, el tanque de medición ya no necesita juntas entre el orificio de paso y la cámara de medición óptica, así como entre el electrodo positivo y la parte utilizada para evacuar los diferentes líquidos (líquido de revestimiento, lisis, etc.). Por otro lado, este tanque de medición permite la medición de volumen por impedancia y mediciones ópticas en la misma célula con unos microsegundos de diferencia.

60 La base tiene una superficie superior que es la combinación de una superficie lateral y una superficie con el radio más pequeño de un cono truncado, pasando el orificio de paso a través de la base en una parte de la misma correspondiente a la superficie de radio más pequeño de la superficie superior.

La base puede tener una superficie inferior que es la combinación de una superficie lateral y una superficie con el radio más pequeño de un cono truncado, pasando el orificio de paso a través de la base en una parte de la misma correspondiente a la superficie de radio más pequeño de la superficie inferior.

5 La base puede presentar, en la parte correspondiente a la superficie de menor radio, un espesor de entre 40 y 100 μm .

El tanque puede comprender además una entrada de fluido que tiene un orificio de entrada que conduce hacia la cámara de medición, estando el orificio de entrada más bajo que el orificio de paso.

10 El recinto puede tener una superficie exterior esférica cuyo centro está en la salida y cerca del orificio de paso. El centro de la superficie exterior esférica puede estar situado entre 200 y 600 μm desde la salida del orificio de paso.

15 El tanque puede comprender además una carcasa de junta en una superficie superior del recinto.

El tanque también puede incluir un zócalo debajo de la base, formando el zócalo con la base y el recinto el tanque de una sola pieza; en el que el zócalo tiene una superficie lateral que comprende elementos de centrado en forma de V.

20 La presente invención también proporciona un sistema para caracterizar células, particularmente células sanguíneas, que comprende el tanque de medición como se ha descrito anteriormente y un soporte de tanque.

El soporte de tanque puede tener dos ranuras que se cruzan en una intersección y cuyo perfil transversal es una V, formando la intersección un asiento para el tanque de medición.

25 Descripción de las figuras

Otros objetivos, características y ventajas aparecerán de la lectura de la descripción que sigue y que se ofrece con fines ilustrativos y no limitativos con referencia a los dibujos adjuntos, entre los cuales:

- 30 - la figura 1 es una vista de tres cuartos de un tanque de medición según la invención;
- la figura 2 es una vista en sección a lo largo del plano P del tanque de medición de la figura 1;
- la figura 3 es una vista ampliada del orificio de paso ilustrado en la figura 2;
- la figura 4 es una vista en sección a lo largo del plano P de una preforma que conduce al tanque de medición de la figura 2;
- 35 - la figura 5 es una vista de tres cuartos del tanque de medición de la figura 1 sobre su soporte de tanque;
- la figura 6 es una vista de tres cuartos de un sistema de medición que comprende el tanque de medición y el soporte de tanque de la figura 5 así como las diferentes ópticas necesarias para las mediciones ópticas; y
- la figura 7 es una vista en sección a lo largo del plano P indicado en la figura 6 y que pasa por el centro óptico del sistema de medición;
- 40 - la figura 8 es un diagrama de flujo que muestra las etapas de un proceso de fabricación para el tanque de medición de la figura 1.

Descripción detallada de la invención

45 A lo largo de esta presentación, los términos espaciales se determinan en relación con el tanque de medición en su posición normal de uso.

Tanque de medición. Un tanque de medición **1** para el recuento y/o caracterización de células según la presente invención se describirá a continuación con referencia a las figuras 1 a 4.

50 El tanque de medición **1** incluye una base **11** y un recinto lateral transparente **12** que se extiende desde la base **11** para formar con la misma una cámara de medición óptica **13**; teniendo la base un orificio de paso **111** de 30 a 100 μm de diámetro para el paso de células. La base **11** y el recinto **12** forman un tanque de una sola pieza adecuado tanto para la medición de impedancia como para la medición óptica.

55 El orificio de paso **111** ventajosamente tiene un diámetro medio de 40 a 80 μm , o incluso de 50 a 60 μm . El orificio de paso **111** es ventajosamente cilíndrico con una base circular. Esta última forma tiene la ventaja de no alterar las mediciones. En efecto, los orificios obtenidos mediante micromecanizado mediante un láser comercial tienen una conicidad natural debido al perfil energético gaussiano del haz emitido por el láser. O, un orificio troncocónico modifica, a veces considerablemente, la forma de los pulsos que crea una célula al pasar por el orificio troncocónico, modificando principalmente la anchura del pulso.

60 La base **11** también puede tener una superficie superior **112** que es la combinación de una superficie lateral **1121** y una superficie de menor radio **1122** de un cono truncado, preferiblemente un cono de revolución, también llamado cono circular recto. El ángulo en la parte superior del cono correspondiente está preferentemente entre 20° y 60°. El radio más pequeño puede estar comprendido entre 0,5 y 1,5 mm, preferiblemente de alrededor de 1 mm. El orificio de

- 5 paso **111** luego cruza la base **11** al nivel de una parte de la misma correspondiente a la superficie de menor radio **1122** de la superficie superior **112**. Por tanto, la superficie superior **112** de la base **11** entra en la cámara de medición óptica **13**. La penetración en la superficie superior **112** de la base **11** en la cámara de medición óptica **13** permite realizar las mediciones en un espacio abierto a diferencia de los tanques en los que las mediciones se realizan en un espacio reducido correspondiente a la sección del orificio de paso. La realización de mediciones en un espacio abierto tiene la ventaja de facilitar la limpieza del área de medición mediante enjuague. La pendiente del cono truncado permite acomodar la abertura óptica acercando al máximo la salida al orificio de paso **111** de un punto de enfoque de los rayos de luz provenientes de una fuente de excitación (ver más abajo).
- 10 Adicional o alternativamente, la base **11** también puede tener una superficie inferior **113** que es la combinación de una superficie lateral **1131** y una superficie de menor radio **1132** de un cono truncado, preferiblemente un cono de revolución. El ángulo en la parte superior del cono correspondiente está preferentemente entre 20° y 60°. El orificio de paso **111** en este caso cruza la base **11** en una parte de la misma correspondiente a la superficie de menor radio **1131** de la superficie inferior **113**. Por tanto, la superficie inferior **113** de la base **11** define una cámara convergente **114**
- 15 desde una entrada representada por la base del radio mayor del cono truncado hasta el orificio de paso **111**. Dicha configuración permite contar y/o caracterizar el revestimiento de un flujo de muestra que contiene células y dirigirlo centralmente hacia el orificio de paso **111** mediante un flujo de revestimiento inyectado lateralmente hacia la superficie de radio más pequeño **1132** asegurando así un centrado hidrodinámico preciso del chorro de muestra. Esta configuración se conoce como "hidroenfoque".
- 20 Cuando la base **11** presenta a la vez una superficie superior **112** y una superficie inferior **113** como se ha descrito anteriormente, estas están centradas entre sí para que la entrada al orificio de paso **111** en la superficie inferior **113** y la salida del orificio de paso **111** en la superficie superior **112** están ubicadas en su eje longitudinal común.
- 25 Preferentemente, la base **11** presenta, en las proximidades del orificio de paso **111**, un espesor de entre 40 y 100 μm , particularmente en la parte correspondiente a las superficies de menor radio **1122**, **1132** de sus superficies superior **112** e inferior **113**. Ventajosamente, este espesor está comprendido entre 50 y 80 μm , entre 55 y 70 μm , o es de aproximadamente 60 μm .
- 30 El recinto **12** puede tener una superficie interior **121** cuya forma es la de la superficie lateral de un cilindro recto de base cuadrada. El lado del cuadrado que forma la base de la superficie lateral se selecciona preferentemente entre 3 y 7 mm, o incluso entre 4 y 6 mm, o incluso entre 4,5 y 5,5 mm, preferiblemente de alrededor de 5 mm. Se pueden seleccionar otras formas para la base, como circular, triangular, etc. Preferiblemente la forma de la base es una figura geométrica regular, *es decir*, que presenta al menos un elemento de simetría, preferiblemente un centro de simetría o un eje de simetría.
- 35 Adicional o alternativamente, el recinto **12** tiene una superficie exterior **122** esférica cuyo centro de la esfera correspondiente está situado en la salida y cerca del orificio de paso **111**.
- 40 La combinación de una superficie exterior **122** esférica y con una superficie interior **121** cilíndrica recta con base cuadrada forma tres o incluso cuatro lentes convergentes **123**, cada una correspondiente a una cara de la superficie interior **121** y cuyo punto focal es el centro de la esfera correspondiente a la superficie exterior **122** esférica. Por tanto, el tanque de medición **1** integra estas lentes en su estructura, lo que permite reducir el coste total del sistema de medición al eximir al usuario de tener que disponer de lentes convergentes entre, por un lado, el tanque de medición y, por otro, la fuente de excitación y los sensores, y tener que hacer los ajustes correspondientes. Por otro lado, dicha estructura reduce significativamente la aberración esférica del sistema de medición, garantizando la máxima potencia en el punto de medición. Además, se puede obtener una apertura numérica del orden de 0,5 sin el uso de objetivos, a diferencia de los dispositivos del mercado.
- 45 Por otro lado, la disposición del punto focal de las lentes **123** en la salida y cerca de la abertura del paso **111** permite realizar mediciones ópticas en la célula mientras acaba de salir de ella y el centrado del flujo de muestra es mejor. En efecto, cuanto más se aleja de la salida del orificio de paso, más incierta es la posición de la célula y mayor es el riesgo de que sea excéntrica con respecto al chorro de muestra.
- 50 Por tanto, el centro de la superficie exterior **122** esférica se sitúa preferentemente entre 200 y 600 μm , incluso entre 300 y 500 μm , incluso entre 350 y 450 μm , preferiblemente alrededor de 400 μm , desde la salida del orificio de paso **111** en la dirección del flujo de la muestra, en particular paralelo al eje longitudinal de las superficies superior **112** e inferior **113** de la base **11** cuando estas corresponden a combinaciones de superficies laterales y el radio más bajo del cono truncado de revolución.
- 55 Por otro lado, el recinto **12** puede comprender en una superficie superior **124** del mismo una carcasa de junta **15** para la recepción de una junta, preferiblemente tórica.
- 60 El tanque de medición **11** puede incluir además una entrada de fluido **16** que tiene un orificio de entrada que conduce hacia la cámara de medición **13**. El orificio de entrada está ubicado más bajo que el orificio de paso **111**. Esta entrada de fluido permite un segundo revestimiento del flujo de muestra a la salida del orificio de paso **111**. Además, esta
- 65

entrada de fluido permite evitar la formación de volumen de recirculación barriendo la zona, impidiendo que una célula salga del chorro de muestra aguas abajo y lejos de la salida del orificio de paso **111** donde el revestimiento es menos efectivo, recircule en un bucle y dificulte así las mediciones ópticas realizadas en las células posteriores. Por otro lado, la combinación entre la entrada de fluido **16** y una superficie superior **112** de la base **11** correspondiente a la combinación de superficies laterales **1121** y radio más pequeño **1122** de cono truncado tiene la ventaja de guiar el segundo fluido de revestimiento hacia la salida del orificio de paso **111**.

El tanque de medición **1** puede incluir además un zócalo **14** debajo de la base **11**. El zócalo **14** forma con base **11** y el recinto **12** el tanque de una sola pieza. El zócalo **14** tiene un agujero **143** que conduce hacia la cámara convergente **114**. En el lado exterior **1431** del agujero, se puede proporcionar un hombro **142** para recibir una junta tórica.

El diámetro del agujero **143** en su lado exterior **1431** puede ser mayor que el diámetro del círculo que forma la base del cono truncado de la superficie inferior **113** de la base **11**, por ejemplo, puede estar comprendido entre 400 y 700 μm , entre 450 y 650 μm , preferiblemente alrededor de 550 μm . El diámetro del agujero **143** disminuye entonces gradualmente hasta alcanzar el del círculo que forma la base del cono truncado de la superficie inferior **113** de la base **11**.

Por otro lado, el zócalo **14** tiene una superficie lateral que comprende elementos de centrado en forma de V **141**. Estos elementos de centrado en forma de V **141** cooperan con las ranuras de un soporte de tanque descrito más adelante. Preferentemente, la superficie lateral del zócalo incluye dos elementos de centrado en forma de V **141** cuyos planos medios se cruzan, de forma preferible perpendicularmente. Ventajosamente, la superficie lateral del zócalo incluye dos pares de elementos de centrado en forma de V **141**. Los planos medios de dos elementos de centrado en V del mismo par son paralelos, mientras que los planos medios de dos elementos de centrado en V de diferentes pares se cruzan, de forma preferible perpendicularmente. Ventajosamente, los planos medios de un par de elementos de centrado en V **141** son paralelos a dos caras opuestas de la superficie interior **121** cilíndrica recta con base cuadrada.

Estos elementos de centrado en forma de V **141** son elementos salientes con la punta de la V apuntando hacia abajo, es decir en la dirección orientada desde el recinto hacia la base. Preferentemente, la punta de la V está cepillada. El cepillado de la punta de la V evita un posicionamiento incorrecto del tanque de medición **1** debido a una posible rebaba en la punta durante la fabricación del tanque de medición **1**.

Ventajosamente, el tanque de una sola pieza tiene preferentemente un índice de refracción comprendido entre 1,4 y 1,6. Por otro lado, el plástico se selecciona preferentemente de manera que tenga una transmisión superior al 90 % de la longitud de onda operativa, preferiblemente de baja birrefringencia y baja distorsión por calor.

Por otro lado, el material del tanque de una sola pieza se selecciona ventajosamente de manera que presente una baja resistencia a la absorción de agua (por ejemplo inferior al 0,01 %). Además, el material tiene preferiblemente una constante dieléctrica baja (por ejemplo, un máximo de 3 F/m) a frecuencias inferiores a 3 mHz, o incluso inferiores a 1 mHz, para garantizar un buen aislamiento eléctrico entre los electrodos a ambos lados del orificio de paso.

Ventajosamente, el material del tanque de una sola pieza es plástico. Por tanto, el tanque de una sola pieza se obtiene por moldeo, lo que permite reducir drásticamente el coste del tanque de medición en comparación con los tanques de medición de la técnica anterior. El material del tanque de una sola pieza puede comprender principalmente una resina de policicloolefina, en particular más del 95 % en peso de esta resina, o incluso más del 99,5 % en peso de esta resina. Un ejemplo de dicha resina es Zeonex E48R (2015) de Zeon®. Dicha resina es muy líquida en forma fundida que puede inyectarse a muy alta presión con muy poca contracción y permite un control preciso de las dimensiones del tanque de una sola pieza y la rugosidad de la superficie de calidad óptica.

Sistema de medición. A continuación se describe un sistema de medición para contar y/o caracterizar células según la invención con referencia a las figuras 5 a 7.

El sistema de medición **10** incluye el tanque de medición **1** como se ha descrito anteriormente.

Además, el sistema de medición **10** incluye un soporte de tanque **2** para recibir el tanque de medición **1** y su mantenimiento durante las mediciones. El soporte de tanque **2** puede presentar ventajosamente, cuando el tanque de medición **1** presenta elementos de centrado en forma de V **141**, dos ranuras **21**, **22** que se cruzan, de forma preferible perpendicularmente, en una intersección y cuyo perfil transversal es una V correspondiente a la forma de los elementos de centrado en forma de V **141** del tanque de medición **1**. La intersección forma un asiento para el tanque de medición **1**. El ángulo de intersección entre las dos ranuras **21**, **22** corresponde al ángulo de intersección de los planos medios de los elementos de centrado en forma de V **141**.

Por otro lado, el soporte de tanque **2** presenta a nivel de la intersección un orificio **23** para recibir el chorro de revestimiento y el chorro de muestra. Este orificio **23** está adaptado para estar en comunicación fluida con la cámara convergente **114** cuando el tanque de medición **1** se coloca sobre el soporte de tanque **2**. Además, el sistema de medición **10** puede incluir una junta tórica **3** para colocar entre el tanque de medición **1** y el soporte de tanque **2**.

El sistema de medición **10** puede incluir además un conjunto de medición de impedancia que incluye un electrodo positivo y un electrodo negativo para la medición de impedancia.

5 El sistema de medición **10** puede comprender además un conjunto de mediciones ópticas que comprenden una fuente de excitación **4** para emitir luz hacia el tanque de medición **1**. Un eje óptico **A** se define a partir de la fuente de excitación **4** como la dirección promedio de los rayos de luz **41** que emite. La disposición de la fuente de excitación **4** se selecciona de modo que el eje óptico **A** pasa por el centro **O** de la superficie exterior esférica **122** del recinto **12** cuando el tanque de medición **1** está en su lugar.

10 La fuente de excitación **4** es preferiblemente una fuente no coherente. Por tanto, la conformación de los rayos de luz **41** es más fácil y a un menor coste en comparación con los sistemas anteriores que requerían láser. En efecto, el flujo de muestra tiene una anchura de unos pocos micrómetros. La célula con un diámetro inferior a la anchura del flujo de muestra puede situarse en cualquier punto de esta anchura. La utilización de una fuente de excitación **4** de baja coherencia permite la formación de una zona iluminada homogéneamente en el punto de medición, que es el centro **O** de la superficie exterior esférica **122** del recinto **12**, que comprende la anchura del flujo de muestra. Por tanto, la señal óptica que llega al sensor será la misma independientemente de la posición de la célula en el flujo de muestra.

15 La fuente de excitación **4** se puede seleccionar entre: un diodo emisor de luz y una lámpara incandescente. La fuente de excitación presenta preferentemente un espectro de emisión centrado en una longitud de onda comprendida entre **20** 620 y 680 nm, 635 y 665 nm, ventajosamente alrededor de 650 nm.

El conjunto de mediciones ópticas puede comprender además ópticas de conformación de entrada **5** en el eje óptico **A**. Esta óptica de conformación de entrada **5** se debe colocar entre la fuente de excitación **4** y el tanque de medición **1**. La óptica de conformación **5** convierte los rayos de luz **41** emitidos radialmente en relación con la fuente de **25** excitación **4** y que llegan a la primera óptica de conformación **5** en rayos de luz paralelos al eje óptico **A**. Para ello incluye un primer grupo óptico **51** que forma una lente convergente. Para mejorar la focalización de los rayos de luz en el centro **O** de la superficie exterior esférica **122** del recinto **12**, también se puede prever un segundo grupo óptico **52** que forma una lente convergente para conseguir una primera convergencia de los rayos de luz hacia el centro **O** de la superficie exterior esférica **122** del recinto **12**. La combinación del segundo grupo óptico **52** y lentes convergentes **30** **123** del tanque **1** permite garantizar a la vez una mínima aberración esférica en el centro **O** de la superficie exterior esférica **122** del recinto **12**, una potencia máxima en este punto **O** y una apertura numérica máxima. La integración de una lente **123** al tanque de medición **1** permite ahorrar costes; sin esta lente **123**, habría sido necesario integrarla en la óptica de conformación. El primer grupo óptico, **51**, y en su caso también el segundo grupo óptico **52**, está contenido preferiblemente en una carcasa **53** generalmente de forma cilíndrica con una base circular para facilitar el **35** posicionamiento en altura y angular en la ranura **21** del soporte de tanque **2**.

La óptica de conformación **5** en la entrada también está adaptada para formar la imagen de una retícula en las proximidades de la salida del orificio de paso **111** cuando el tanque de medición **1** está en su lugar. Llegado el caso, **40** la imagen de la retícula se forma en un plano que incluye el centro **O** de la superficie exterior esférica **122** del recinto **12**. Por eso, el conjunto de medición óptica comprende además una retícula rectangular entre la fuente de excitación **41** y la óptica de conformación de entrada **5**. Preferentemente, el factor de aspecto (relación entre longitud y anchura) es menor o igual a 3. La óptica de conformación de entrada está adaptada, por ejemplo, para formar una retícula rectangular con una longitud de aproximadamente 100 μm y una anchura de aproximadamente 30 μm.

45 Preferentemente, la óptica de conformación de entrada **5** está adaptada para que los rayos de luz **41** convergentes formen un ángulo sólido significativo, por ejemplo de entre 30° y 50°. Gracias a esta gran apertura posible en particular debido a la forma troncocónica de la superficie superior **112** de la base del tanque de medición **1**, es posible recoger un máximo de luz de salida.

50 El conjunto de medición óptica puede comprender un módulo de medición de absorbancia que comprende un sensor adaptado para medir la absorbancia de la célula y una primera óptica de recepción **6** en la salida para hacer converger los rayos de luz que pasan a través del tanque de medición **1** y que llegan a la primera óptica de recepción **6** hacia el sensor. Preferentemente, el sensor y la primera óptica de recepción **6** están dispuestos en el eje óptico **A** en el lado opuesto de la fuente de excitación **41** con respecto al tanque de medición **1**, la primera óptica de recepción **6** debe **55** colocarse entre el tanque de medición **1** y el sensor. En algunos casos, el sensor y la primera óptica de recepción **6** pueden disponerse fuera del eje óptico **A**, en ese caso, hay dispuesto un deflector en el eje óptico **A** y en el camino de los rayos de luz **41** entre el tanque de medición **1** y la primera óptica de recepción **6**. El sensor es preferentemente un fotodiodo.

60 Aunque no es obligatorio, preferentemente, la primera óptica de recepción **6** tiene la misma apertura que la óptica de conformación de entrada **5** para minimizar los costes al simetrizar el sistema.

El conjunto de medición óptica puede comprender un módulo de medición de dispersión que comprende un sensor adaptado para medir la dispersión en ángulos grandes de la célula y una segunda óptica de recepción **7** en la salida **65** para hacer converger los rayos de luz **41** dispersados por el tanque y que llegan a la segunda óptica de recepción **7**, hacia el sensor. Preferentemente, el sensor y la segunda óptica de recepción **7** están dispuestos sobre un eje

perpendicular al eje óptico **A**, paralelo al soporte de tanque y que pasan por el centro **O** de la superficie exterior esférica **122** del recinto **12** cuando el tanque de medición **1** está en su lugar. En algunos casos, el sensor y la segunda óptica de recepción **7** se pueden disponer fuera del eje perpendicular al eje óptico, en ese caso, hay dispuesto un deflector en el eje perpendicular al eje óptico **A** y en el camino de los rayos de luz **41** entre el tanque de medición **1** y la segunda óptica de recepción **7**. Preferiblemente, el sensor es un fotodiodo de efecto de avalancha.

El conjunto de mediciones ópticas puede comprender un módulo de medición de fluorescencia que comprende un sensor adaptado para medir la fluorescencia de la célula y una tercera óptica de recepción (no mostrada) en la salida para hacer converger los rayos de luz difundidos por el tanque y que llegan a la tercera óptica de recepción, hacia el sensor. Preferentemente, el sensor y la tercera óptica de recepción están dispuestos sobre un eje perpendicular al eje óptico, paralelo al soporte de tanque y que pasan por el centro de la superficie exterior esférica del recinto cuando la célula de medición está en su lugar. En algunos casos, el sensor y la tercera óptica de recepción pueden estar dispuestos fuera del eje perpendicular al eje óptico, en ese caso, hay dispuesto un deflector en el eje perpendicular al eje óptico y en el camino de los rayos de luz entre el soporte de tanque y la tercera óptica de recepción. Preferiblemente, el sensor es un fotodiodo de efecto de avalancha.

En caso de que el conjunto de medición óptica incluya tanto un módulo de medición de dispersión de gran ángulo como un módulo de medición de fluorescencia, uno puede estar en el eje perpendicular al eje óptico y el otro en el exterior. En ese caso, el deflector correspondiente es un espejo dicroico.

Alternativamente, los dos módulos pueden estar fuera del eje perpendicular al eje óptico. En ese caso, el deflector más cercano al soporte de tanque es un espejo dicroico. El deflector más alejado puede ser un espejo semirreflectante, o un espejo real.

Siempre como alternativa, se puede añadir un espejo dicroico al módulo de medición de dispersión de ángulos grandes para permitir la medición de una o más fluorescencias mientras se utilizan los mismos componentes del sistema de medición **10**. El espejo dicroico se sitúa entre el soporte de tanque y la segunda óptica de recepción. Por otro lado, se pueden proporcionar filtros ópticos dicroicos para separar señales de fluorescencia óptica de diferentes longitudes de onda, generalmente en espectros con una anchura a media altura de 20 a 50 nm, o incluso de 30 a 40 nm. En ese caso, están dispuestos entre el espejo dicroico y el sensor de fluorescencia.

A lo largo de esta presentación, los términos "óptica de conformación" y "óptica de recepción" deben entenderse en el sentido de designar una lente o un conjunto de lentes que permiten cambiar la dirección de los rayos de luz. Preferentemente, todas las ópticas de conformación y recepción son idénticas. Es decir, todas incluyen un primer grupo óptico y un segundo grupo óptico; este último debe colocarse más cerca del tanque de medición **1** que el primer grupo óptico.

Preferentemente, cada una de las ópticas de recepción **6, 7** presenta una carcasa de forma cilíndrica con base circular, al igual que la óptica de conformación **5**, para su posicionamiento en altura y ángulo sobre el soporte de tanque **2**. Estos elementos de centrado en forma de V pueden estar previstos para cooperar con ranuras **21, 22** correspondientes al soporte de tanque **2**, que pueden ser las mismas que las utilizadas para posicionar el tanque de medición **1**.

El tanque de medición **1** y/o el soporte de tanque **2** están adaptados ventajosamente de modo que una cara de la superficie interior cilíndrica recta con una base cuadrada del recinto sea normal al eje óptico. En ese caso, la óptica de conformación está dispuesta en el eje óptico, sobre un eje perpendicular a él y que pasa por el centro de la superficie exterior esférica del recinto cuando el tanque de medición está en su lugar.

Proceso de fabricación del tanque de medición. A continuación se describe un procedimiento de fabricación del tanque de medición con referencia a las figuras 2, 4 y 8.

El procedimiento incluye el moldeado de una preforma cuya forma es generalmente la del tanque de medición a excepción de la base (ver figura 4). De forma notable, el orificio de paso aún no está formado y el espesor de la zona de la base que rodea el futuro orificio de paso aún no ha alcanzado la finura deseada. El espesor circundante está comprendido entre 400 y 600 µm, incluso entre 450 y 550 µm, incluso entre 475 y 525 µm, preferiblemente alrededor de 500 µm.

El procedimiento incluye también la ablación de la zona de la base que rodea el futuro orificio de paso hasta una profundidad suficiente para dejar un espesor comprendido entre 40 y 100 µm, entre 50 y 80 µm, entre 55 y 70 µm, o aproximadamente 60 µm. La ablación se lleva a cabo mediante pulsos ultracortos. Ventajosamente, la ablación de la zona de la base circundante al futuro orificio de paso se realiza mediante un láser cuyo haz se envía preferentemente a la superficie inferior de la base. Preferentemente, la ablación da como resultado un círculo de ablación con un diámetro comprendido entre 0,6 y 1,4 mm. Controlar el espesor de esta zona (que es el espesor que rodea el orificio de paso) es importante desde el punto de vista dimensional para garantizar una medida de resistividad de calidad. En efecto, el espesor del orificio de paso está directamente relacionado con la anchura de los pulsos que crea una célula cuando pasa a través del orificio de paso. Si el espesor es demasiado grande y no está controlado, existe el riesgo de que varias células pasen por el orificio de paso al mismo tiempo y por tanto generen un artefacto de medición en las

linealidades.

5 El procedimiento incluye entonces producir el orificio de paso mediante micromecanizado láser, por ejemplo según el procedimiento descrito en el documento WO 2017/029210, permitiendo obtener un orificio perfectamente cilíndrico para la medición de impedancia.

10 El procedimiento puede incluir opcionalmente el posicionamiento de la preforma en una herramienta de posicionamiento entre las etapas de moldeo y ablación, permitiendo su mantenimiento durante las etapas de ablación y creación del orificio de paso. En particular, la herramienta de posicionamiento puede comprender un soporte de posicionamiento que presenta en su superficie superior una escotadura cuya forma es complementaria a la del tanque.

REIVINDICACIONES

1. Tanque de medición (1) para contar y/o caracterizar células, tanque de medición (1) que comprende una base (11) y un recinto lateral transparente (12) que se extiende desde la base (11) para formar con la misma una cámara de medición óptica (13); teniendo la base (11) un orificio de paso (111) de 30 a 100 μm de diámetro para el paso de células,
- 5 en el que la base (11) y el recinto lateral transparente (12) forman un tanque de una sola pieza (1) adecuado tanto para la medición de impedancia como para la medición óptica, y en el que la base (11) tiene una superficie superior (112) que es la combinación de una superficie lateral (1121) y una superficie de menor radio (1122) de un cono truncado, pasando el orificio de paso (111) a través de la base (11) en una parte de la misma correspondiente a la superficie de menor radio (1122) de la superficie superior (112), de modo que la superficie superior (112) de la base (11) entre en la cámara de medición óptica (13).
- 10
2. Tanque de medición (1) según la reivindicación 1, en el que la base (11) tiene una superficie inferior (113) que es la combinación de una superficie lateral (1131) y una superficie de menor radio (1132) de un cono truncado, pasando el orificio de paso (111) a través de la base (11) en una parte de la misma correspondiente a la superficie de menor radio (1132) de la superficie inferior (113), definiendo así la superficie inferior (113) de la base (11) una cámara convergente (114) desde una entrada representada por la base del radio mayor del cono truncado hasta el orificio de paso (111).
- 15
- 20
3. Tanque de medición (1) según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la base (11) presenta, en la parte correspondiente a la superficie de menor radio (1122, 1132), un espesor de entre 40 y 100 μm .
- 25
4. Tanque de medición (1) según una de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además una entrada de fluido (16) que tiene un orificio de entrada que conduce hacia la cámara de medición (13), estando el orificio de entrada más bajo que el orificio de paso (111).
- 30
5. Tanque de medición (1) según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el recinto (12) tiene una superficie exterior esférica (122) cuyo centro está en la salida y cerca del orificio de paso (111).
- 35
6. Tanque de medición (1) según la reivindicación 5, en el que el centro de la superficie exterior esférica (122) está situado entre 200 y 600 μm de la salida del orificio de paso (111).
- 40
7. Tanque de medición (1) según una de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además una carcasa de junta (15) en una superficie superior (124) del recinto.
- 45
8. Tanque de medición (1) según una de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además un zócalo (14) debajo de la base (11), formando el zócalo (14) con la base (11) y el recinto (12) el tanque de una sola pieza (1); en el que el zócalo (14) tiene una superficie lateral que comprende elementos de centrado (141) en forma de V.
9. Sistema (10) para caracterización celular, que comprende el tanque de medición (1) según una de las reivindicaciones 1 a 8 y un soporte de tanque (2).
10. Sistema (10) según la reivindicación 9, en el que el tanque de medición (1) es según la reivindicación 8, en el que el soporte de tanque (2) tiene dos ranuras (21, 22) que se cruzan en una intersección y cuyo perfil transversal es una V, formando la intersección un asiento para el tanque de medición (1).

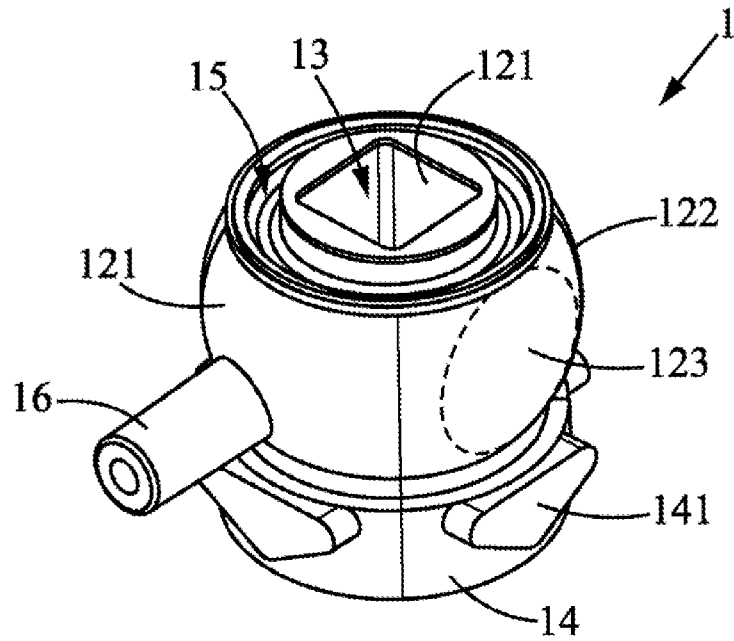


FIG. 1

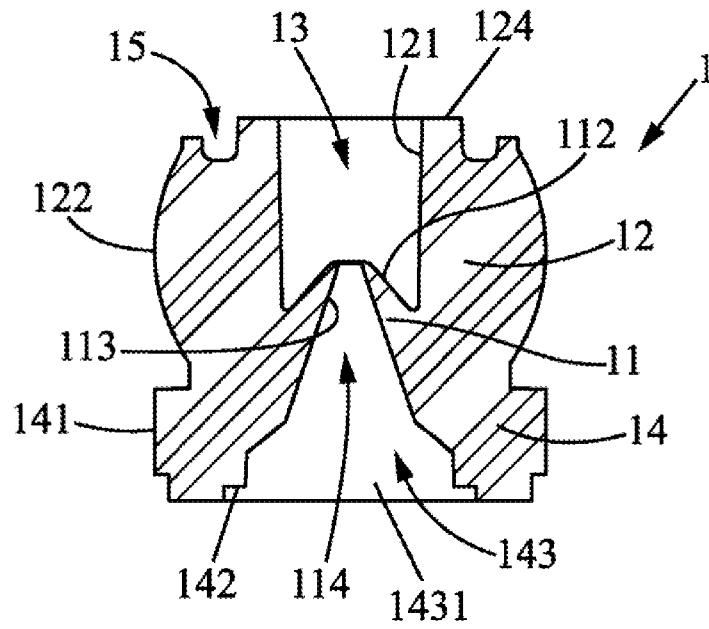


FIG. 2

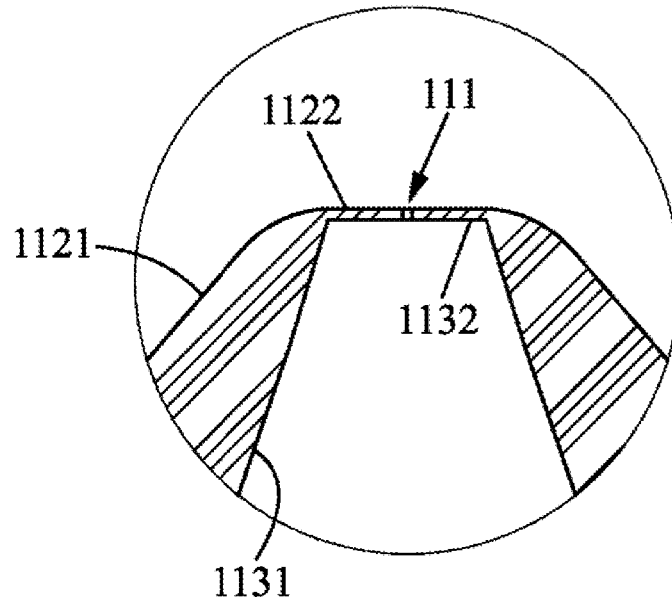


FIG. 3

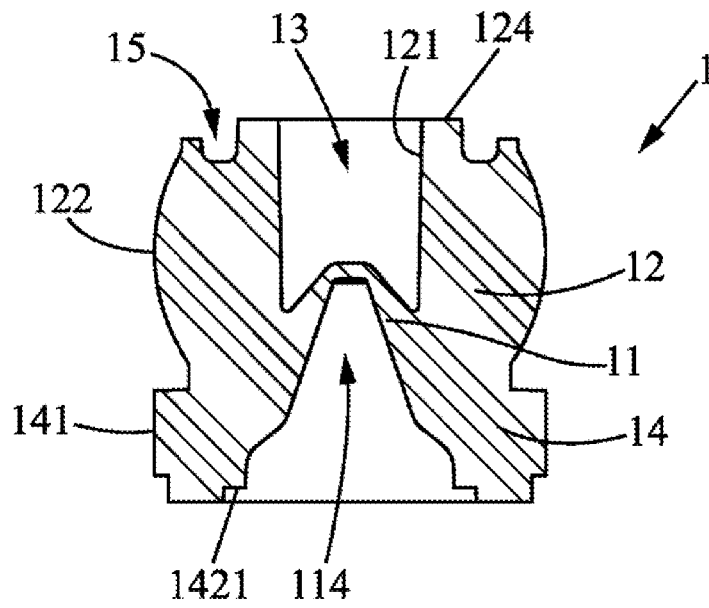


FIG. 4

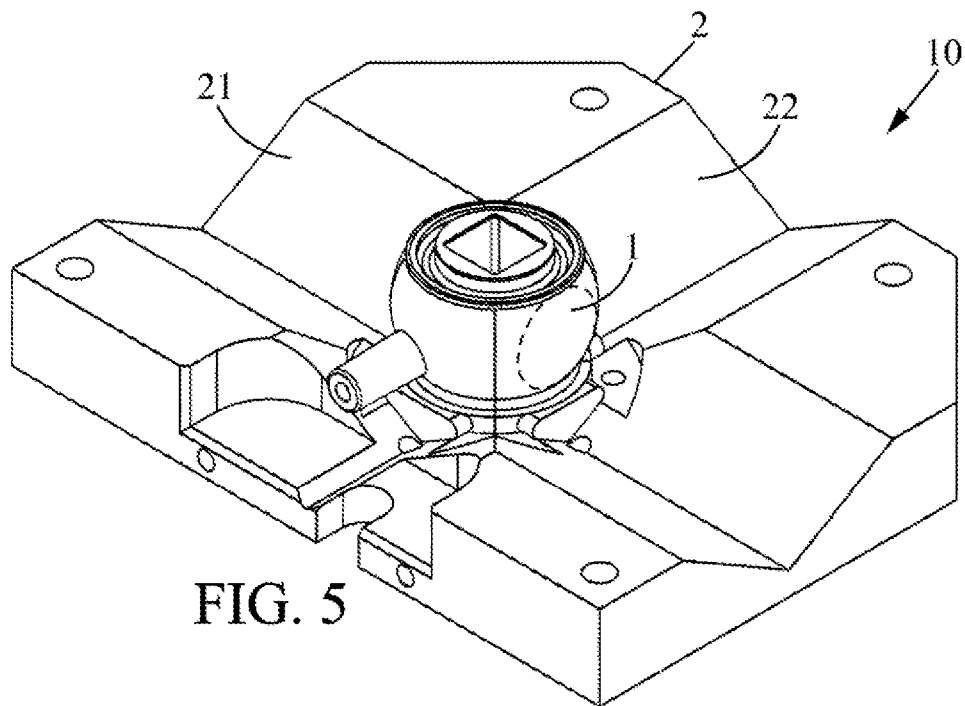


FIG. 5

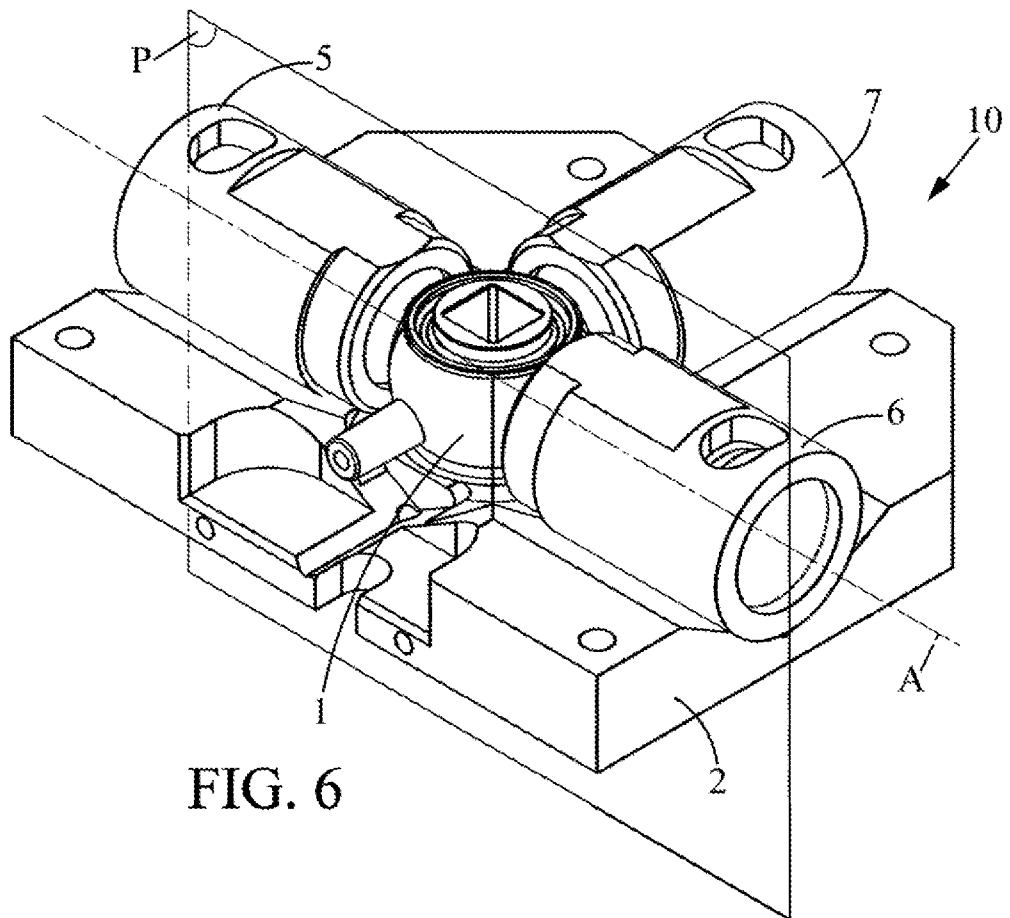


FIG. 6

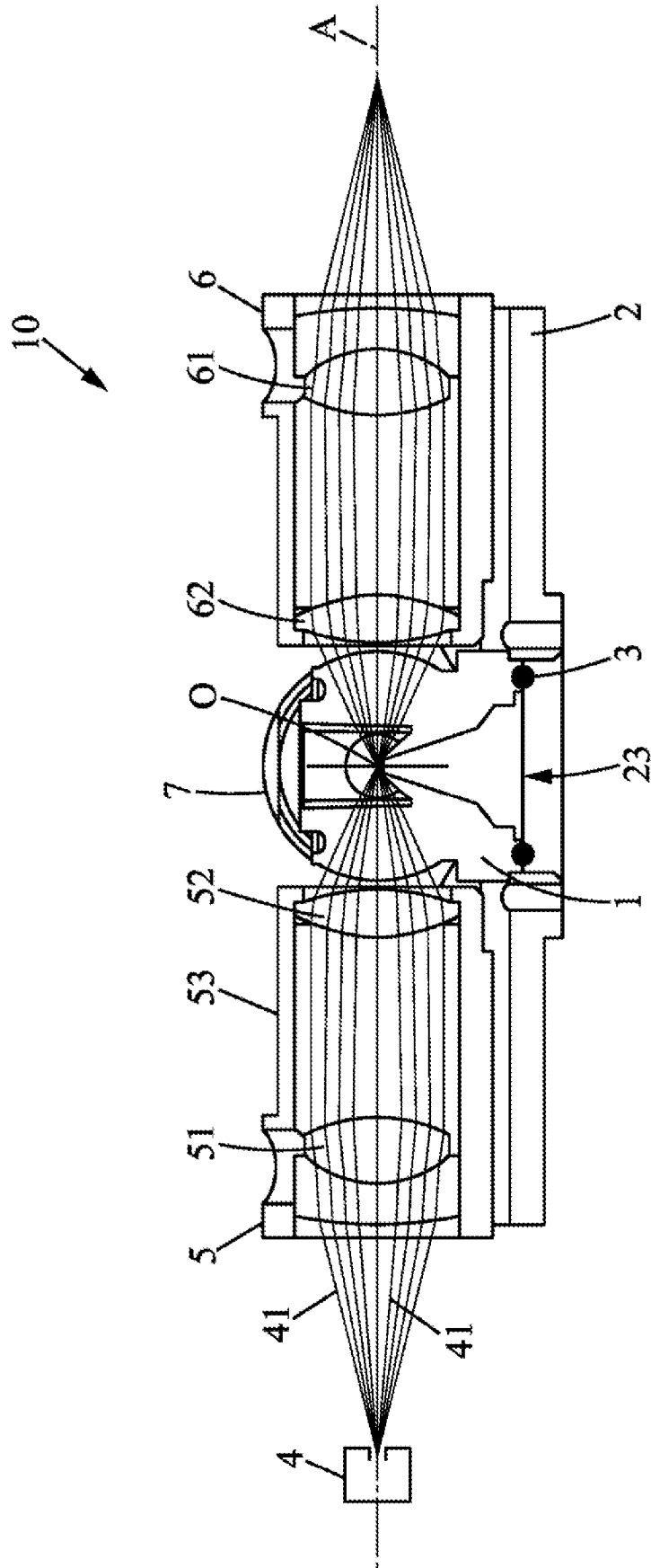


FIG. 7

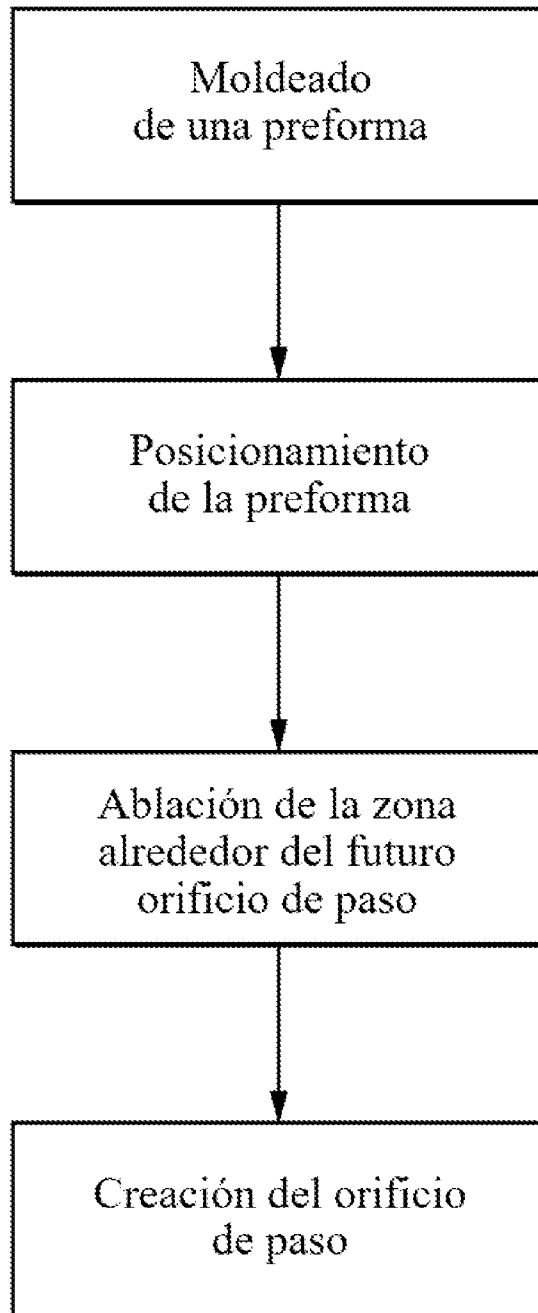


FIG. 8