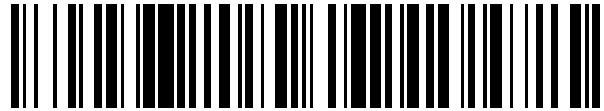


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 643**

51 Int. Cl.:

G01N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2006 E 06447087 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 1744145**

54 Título: **Material de referencia para un analizador de partículas**

30 Prioridad:

12.07.2005 JP 2005203279

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

07.10.2015

73 Titular/es:

**SYSMEX CORPORATION (100.0%)
5-1, WAKINOHAMA-KAIGANDORI 1-CHOME
CHUO-KU KOBE-SHI, HYOGO 651-0073, JP**

72 Inventor/es:

KAWATE, YASUNORI

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 547 643 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

Material de referencia para un analizador de partículas

5 Antecedentes de la invención**1. Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a material de referencia para un analizador de partículas, que se usa para el control de calidad y similares en un analizador de partículas.

2. Descripción de la Técnica Relacionada

15 Se ha conocido un analizador de partículas, que tiñe partículas en una muestra biológica tal como orina y sangre usando un tinte fluorescente e irradia las partículas con luz de tal manera que las partículas se clasifican y se cuentan midiendo la fluorescencia y la luz dispersada frontal emitida por las partículas.

20 En un analizador de partículas tal, es necesario controlar la calidad del analizador de tal manera que siempre obtenga resultados precisos de las medidas. En otras palabras, un material de referencia para el control de calidad se mide por el analizador de partículas, y si no se obtiene un valor medido preciso, el analizador de partículas necesita calibrarse de tal manera que el valor medido del material de referencia se mantenga en un intervalo predeterminado.

25 La Patente de EE.UU. n° 5.888.823 ha desvelado un fluido de referencia para usar en un citómetro de flujo que está provisto de una parte de preparación de la muestra de medida que lleva a cabo un tratamiento de tinción por fluorescencia en componentes de partículas en orina usando un tinte y un detector de fluorescencia que detecta la fluorescencia de los componentes de partículas que se han teñido por fluorescencia. Este fluido de referencia contiene partículas de referencia. Las partículas de referencia son partículas que pueden teñirse a través del tratamiento de tinción por fluorescencia de tal manera que muestren la misma intensidad de fluorescencia que los componentes de partículas a medirse. En el caso de que ocurra cualquier problema en la parte de preparación de la muestra de medida del citómetro de flujo que cause un fallo llevando a cabo correctamente el proceso de tinción, puede detectarse una anomalía en el mecanismo de tinción midiendo las partículas de referencia.

35 En el caso en que se lleve a cabo una operación de control de calidad en un analizador de partículas usando el fluido de referencia desvelado en la Patente de EE.UU. n° 5.888.823, incluso si el valor medido resultante (intensidad de fluorescencia) está fuera de un intervalo predeterminado, por ejemplo, la sensibilidad del detector de fluorescencia se ajusta de tal manera que se lleve a cabo un proceso de calibrado para obtener un valor medido adecuado.

40 Sin embargo la Patente de EE.UU. n° 5.888.823 no ha desvelado nada sobre una técnica para medir un material de referencia usando un analizador de partículas para juzgar cualquier porción anormal en el analizador.

45 El documento WO 91/00509 desvela métodos para alinear, compensar y/o calibrar un citómetro de flujo para la medida posterior de una muestra seleccionada haciendo uso de poblaciones de microesferas de tamaño altamente uniforme. Las poblaciones consisten en una población de partículas (microesferas) en blanco y/o autofluorescentes que tienen el mismo espectro e intensidad de fluorescencia que la muestra, antes de marcar, y una o más poblaciones de partículas (microesferas) calibradas que se marcan con al menos dos tipos de tintes fluorescentes y que se caracterizan por que, antes de marcar, tienen el mismo espectro e intensidad de fluorescencia que la población de partículas en blanco y/o autofluorescentes.

50 El documento US 5084394 desvela métodos para calibrar un citómetro de flujo usando una combinación de poblaciones de microesferas calibradas con una o más poblaciones celulares biológicas calibradas, donde el espectro de fluorescencia de las microesferas, de las células y de las muestras celulares son todos los mismos. El uso de esta combinación de poblaciones permite corregir los factores que están relacionados con el instrumento o las microesferas.

55 Vogt et al. ("Model systems evaluating fluorescein-labeled microbeads as internal standards to calibrate fluorescence intensity on flow cytometers"; Cytometry: 10, 3(1): 294-302; 1989) desvela un sistema modelo para medir núcleos celulares de timos fluoresceinados usando esferas marcadas con fluoresceína de referencia como medio de calibrado.

60 El documento EP0774655 desvela un fluido de referencia para un citómetro de flujo que contiene partículas, que muestra, después de teñir, casi la misma intensidad de fluorescencia y la intensidad de luz dispersada que aquellas de las células a ensayar.

65

El documento US 2003/219850 se refiere a métodos para analizar células de la médula ósea nucleadas, que se subdividen en dos poblaciones, concretamente una primera población tratada con un primer agente de lisado y una primera solución de tinción y una segunda población tratada con un segundo agente de lisado y una segunda solución de tinción. El método comprende medir muestras en un citómetro de flujo usando luz dispersada y fluorescencia que permite la clasificación de las células y calcular el número de células mieloides y la relación de células mieloides y eritroides.

Sin embargo, los métodos desvelados en el documento WO 91/00509, el documento US 5084394, Vogt et al. (1989), el documento EP0774655 o el documento US 2003/219850 comprenden etapas de calibrado que usan partículas pre-teñidas o partículas sin teñir, que se mantienen sin teñir durante la etapa de medida de la muestra.

Sumario de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método y un analizador que puedan juzgar una porción anormal en un analizador de partículas usando un material de referencia tal.

La solicitud desvela métodos para juzgar una porción anormal en un analizador de partículas que comprende una unidad de preparación de muestra de medición para preparar una muestra de medición mezclando una muestra biológica con un primer tinte de fluorescencia, una fuente de luz para irradiar la muestra de medición con luz y un detector de fluorescencia para detectar la fluorescencia de la muestra de medición, que comprende las etapas de: detectar la primera fluorescencia de las primeras partículas de referencia y la segunda fluorescencia de las segundas partículas de referencia usando el analizador de partículas; y juzgar la porción anormal del analizador de partículas basándose en la primera fluorescencia y en la segunda fluorescencia.

De esta manera, un primer aspecto de la presente invención proporciona métodos para juzgar la presencia de cualquier anomalía en una unidad de preparación de muestra de medición y un detector de fluorescencia en un analizador de partículas, donde la unidad de preparación de la muestra de medición es adecuada para preparar una muestra de medición mezclando una muestra biológica con un tinte fluorescente, donde el detector de fluorescencia es adecuado para detectar la fluorescencia en un analizador de partículas y donde el analizador de partículas comprende un detector de luz dispersada frontal, comprendiendo los métodos las etapas de:

- a) suministrar un material de referencia para la unidad de preparación de la muestra de medición; conteniendo el material de referencia las primeras y las segundas partículas de referencia; las primeras partículas siendo teñibles prácticamente de la misma manera que las partículas de medición en la muestra de medición; las segundas partículas preparándose preliminarmente de tal manera que contengan un tinte fluorescente y que no sean teñibles
- b) añadir un tinte de fluorescencia al material de referencia
- c) obtener las intensidades de fluorescencia y de luz dispersada frontal de las partículas en el material de referencia
- d) analizar las intensidades de fluorescencia y de luz dispersada frontal para obtener las primeras intensidades de fluorescencia de las primeras partículas de referencia y las segundas intensidades de fluorescencia de las segundas partículas de referencia
- e) comparar la media de las primeras intensidades de fluorescencia con un intervalo predeterminado y comparar la media de las segundas intensidades de fluorescencia con un intervalo predeterminado, y
- f) juzgar la presencia de cualquier anomalía en la unidad de preparación de la muestra de medición y del detector de fluorescencia.

En realizaciones particulares, los métodos de la presente invención comprenden adicionalmente una etapa de preparar la muestra de medición mezclando el primer tinte de fluorescencia con un material de referencia que contiene las primeras partículas de referencia y las segundas partículas de referencia y detectándose la primera fluorescencia y la segunda fluorescencia a partir de las primeras partículas de referencia y de las segundas partículas de referencia contenidas en la muestra de medición.

En realizaciones particulares adicionales, los métodos de la presente invención comprenden adicionalmente las etapas de preparar primero la primera muestra de medición mezclando el primer tinte de fluorescencia con un primer material de referencia que contiene las primeras partículas de referencia; y segundo preparar la segunda muestra de medición mezclando el primer tinte de fluorescencia con un segundo material de referencia que contiene las segundas partículas de referencia; y donde la etapa de detección detecta la primera fluorescencia de las primeras partículas de referencia contenidas en la primera muestra de medición y detecta la segunda fluorescencia de las segundas partículas de referencia contenidas en la segunda muestra de medición.

En realizaciones particulares todavía adicionales, los métodos de la presente invención comprenden adicionalmente las etapas de primero comparar la primera fluorescencia con una primera condición; y segundo comparar la segunda fluorescencia con una segunda condición; y donde la etapa f) incluye juzgar la anomalía del detector de fluorescencia basándose en el segundo resultado de comparación obtenido en la etapa e) y juzgar la anomalía en

la unidad de preparación de la muestra basándose en el primer resultado de comparación y el segundo resultado de comparación obtenido en la etapa e).

5 De acuerdo con ciertas realizaciones de los métodos de la invención, el analizador de partículas comprende un detector de luz dispersada para detectar la luz dispersada de la muestra de medición y la etapa f) comprende adicionalmente juzgar la anormalidad del detector de luz dispersada basándose en la primera luz dispersada y en la segunda luz dispersada.

10 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a los analizadores de partículas que comprenden:

10 una unidad de preparación de muestras de medición para preparar una muestra de medición mezclando un material de referencia que contiene las primeras partículas de referencia que pueden teñirse con fluorescencia por el tratamiento de tinción de fluorescencia y las segundas partículas de referencia que han contenido preliminarmente un tinte de fluorescencia con un primer tinte de fluorescencia;
 15 una fuente de luz para irradiar la muestra de medición con luz;
 un detector de fluorescencia para detectar la primera fluorescencia de las primeras partículas de referencia y una segunda fluorescencia de las segundas partículas de fluorescencia, contenidas en la muestra de medición;
 un detector de luz dispersada frontal para detectar la luz dispersada frontal; y
 20 una unidad de análisis para juzgar una porción anormal en el analizador de partículas basándose en la primera fluorescencia y en la segunda fluorescencia, caracterizada por que la porción anormal se detecta usando los métodos de acuerdo con la presente invención.

La presente invención se refiere adicionalmente a los analizadores de partículas que comprenden:

25 una unidad de preparación de muestras de medición para preparar una primera muestra de medición mezclando un primer material de referencia que contiene las primeras partículas de referencia que pueden teñirse con fluorescencia por el tratamiento de tinción de fluorescencia con un primer tinte de fluorescencia y preparar una segunda muestra de medición a partir de un segundo material de referencia que contiene las segundas partículas de referencia que han contenido preliminarmente un segundo tinte de fluorescencia;
 30 una fuente de luz para irradiar la primera y la segunda muestras de medición;
 un detector de fluorescencia para detectar la primera fluorescencia de las primeras partículas de referencia contenidas en la primera muestra de referencia y una segunda fluorescencia de las segundas partículas de fluorescencia contenidas en la segunda muestra de medición;
 un detector de luz dispersada frontal (49) para detectar la luz dispersada frontal; y
 35 una unidad de análisis para juzgar una porción anormal en el analizador de partículas basándose en la primera fluorescencia y en la segunda fluorescencia, caracterizada por que la porción anormal se detecta usando los métodos de acuerdo con la presente invención.

40 En algunas realizaciones, el analizador de partículas de la presente invención comprende una unidad de análisis, que obtiene un primer resultado de comparación comparando la primera fluorescencia con una primera condición y un segundo resultado de comparación comparando la segunda fluorescencia con una segunda condición, que juzga la anormalidad en el detector de fluorescencia basándose en el segundo resultado de comparación y la anormalidad en la unidad de preparación de la muestra de medición basándose en el primer resultado de comparación y en el segundo resultado de comparación.

45 En algunas realizaciones, el analizador de partículas de la presente invención comprende un detector de luz dispersada, que detecta la primera luz dispersada de las primeras partículas de referencia y una segunda luz dispersada de las segundas partículas de referencia y comprende una unidad de análisis, que juzga la anormalidad en el detector de luz dispersada basándose en la primera luz dispersada y en la segunda luz dispersada.

50 De acuerdo con realizaciones particulares del analizador de partículas de la presente invención, las segundas partículas realmente no se tiñen con el primer tinte de fluorescencia.

Breve descripción de los dibujos

55 La Figura 1 es un dibujo que muestra la apariencia de un analizador para analizar componentes de partículas en urea.
 La Figura 2 es un dibujo esquemático que muestra la estructura interna del analizador para analizar componentes de partículas en urea.
 60 La Figura 3 es un dibujo que explica un citómetro de flujo que sirve como una unidad de detección del analizador para analizar componentes de partículas en urea.
 La Figura 4 es un dibujo que indica los resultados de las medidas en bacterias por el analizador para analizar componentes de partículas en urea.
 La Figura 5 es un dibujo que indica los resultados de las medidas en células sanguíneas blancas por el analizador para analizar componentes de partículas en urea.
 65 La Figura 6 es un dibujo que indica los resultados de las medidas en partículas de referencia para bacterias con

respecto a una realización de la presente invención por el analizador para analizar componentes de partículas en urea.

La Figura 7 es un dibujo que indica los resultados de las medidas de las partículas de referencia para las células sanguíneas blancas con respecto a la realización de la presente invención por el analizador para analizar componentes de partículas en urea.

La Figura 8 es un diagrama de flujo que muestra los procesos de juicio de cualquier porción anormal en el analizador para analizar componentes de partículas en urea.

La Figura 9 es otro diagrama de flujo que muestra los procesos de juicio de cualquier porción anormal en el analizador para analizar componentes de partículas en urea.

Descripción de las realizaciones preferidas

El material de referencia se usa para un analizador de partículas que lleva a cabo un tratamiento de tinción por fluorescencia en partículas de medición contenidas en una muestra biológica usando un tinte y analiza las partículas de medición que se han teñido por fluorescencia. El material de referencia contiene primeras partículas de referencia que se tiñen por fluorescencia por el tratamiento de tinción por fluorescencia y segundas partículas de referencia que se preparan de tal manera que contengan preliminarmente un tinte fluorescente. Las primeras partículas de referencia se tiñen por fluorescencia en el tratamiento de tinción por fluorescencia en el analizador de partículas y se deja que muestren una intensidad de fluorescencia. Por el contrario, las segundas partículas de referencia, que contienen preliminarmente el tinte fluorescente, muestran una intensidad predeterminada de fluorescencia, aunque no están realmente teñidas. Las partículas de medición son partículas que se contienen en una muestra biológica tal como orina y sangre y han de medirse en el analizador de partículas. Los ejemplos de las partículas de medición incluyen, pero no se limitan a, células sanguíneas blancas, células sanguíneas rojas, células epiteliales, células columnares y bacterias.

Tras la medida del material de referencia por el analizador de partículas, los valores medidos de las primeras y de las segundas partículas de referencia que tienen diferentes características se detectan respectivamente de tal manera que cualquier anomalía en el analizador puede detectarse con mayor precisión en comparación con los materiales de referencia convencionales. Más específicamente, se vuelve posible presumir una porción en la que está ocurriendo cualquier anomalía en el analizador de partículas. En consecuencia, tras calibrar el analizador, se llevan a cabo adecuadamente un procedimiento de mantenimiento y similares en el mecanismo o similares que requieren el calibrado de tal manera que es posible prevenir preliminarmente cualquier posible problema que pueda ocurrir en el futuro.

Con respecto a las primeras partículas de referencia, las partículas, que se tiñen en el tratamiento de tinción por fluorescencia de tal manera que muestren el mismo grado de intensidad de fluorescencia que las partículas de medición, se usan preferentemente. Además, con respecto a las segundas partículas de referencia, las partículas, que se ha preparado preliminarmente de tal manera que contengan un tinte fluorescente usando un método adecuado para mostrar el mismo grado de intensidad de fluorescencia que las partículas de medición, se usan preferentemente.

La siguiente descripción analizará un material de referencia que puede usarse en los métodos y en los analizadores de partículas de la invención. Sin embargo, la presente invención no ha de entenderse que se limite solamente por la presente realización.

El material de referencia se usa para realizar el control de calidad o para calibrar un analizador de partículas para analizar partículas contenidas en una muestra biológica. El material de referencia contiene las primeras partículas de referencia que se tiñen por fluorescencia por el tratamiento de tinción por fluorescencia y las segundas partículas de referencia que se preparan de tal manera que contengan preliminarmente un tinte fluorescente. Las segundas partículas de referencia, que contienen el tinte fluorescente, muestran una intensidad de fluorescencia predeterminada.

Con respecto al analizador de partículas configurado para usar en los métodos de la presente invención al que se aplican las partículas de referencia, los ejemplos del mismo incluyen un analizador que tiene una parte de preparación de muestra de medición para preparar una muestra de medición teñiendo una muestra biológica tal como orina y sangre usando un tinte fluorescente. El analizador prepara la muestra de medición, suministra la muestra de medición preparada a un citómetro de flujo, irradia partículas en la muestra de medición que pasa por el citómetro de flujo con luz y detecta la fluorescencia de las partículas teñidas con un detector de fluorescencia. Por ejemplo, el analizador puede incluir un analizador para analizar células sanguíneas y un analizador para analizar componentes de partículas en urea (sedimento urinario).

La siguiente descripción analizará un analizador para analizar componentes de partículas en urea, que es un ejemplo de un analizador de partículas configurado para usar en los métodos de la presente invención a los que se aplican las partículas de referencia de la presente realización. En el presente documento, el presente analizador puede medir células sanguíneas blancas, células sanguíneas rojas, células epiteliales, células columnares y bacterias, como partículas contenidas en la orina. En particular, el presente analizador ha mejorado la precisión de

medición para bacterias el tamaño de las cuales es más pequeño entre las partículas de medición. En el presente analizador, con respecto a las bacterias, se aplican un fluido de dilución para la medición de bacterias y un fluido de tinción usado para las medición de bacterias y con respecto a las cuatro partículas distintas de bacterias (células sanguíneas blancas, células sanguíneas rojas, células epiteliales y células columnares), se usan un fluido de dilución y un fluido de tinción usados para medir las cuatro partículas para llevar a cabo las mediciones. En la siguiente descripción, el fluido de dilución usado para medir las cuatro partículas se denomina un primer fluido de dilución, el fluido de tinción usado para medir las cuatro partículas se denomina un primer fluido de tinción, el fluido de dilución usado para medir las bacterias se denomina un segundo fluido de dilución y el fluido de tinción usado para medir bacterias se denomina un segundo fluido de tinción.

La figura 1 muestra la apariencia de un analizador para analizar componentes de partículas en urea. El presente analizador para analizar componentes de partículas en la urea está provisto de un dispositivo de cuerpo principal 1, un suministro de potencia láser 2 y un suministro de presión de aire 3. El dispositivo de cuerpo principal 1 está provisto de un interruptor de suministro de potencia 4, una unidad de transporte 6 que transporta un tubo de muestra que lleva orina que es una muestra biológica y automáticamente lo suministra a una unidad de succión 5, la unidad de succión 5 usada para succionar la orina del tubo de muestra, un interruptor de inicio 7 usado para iniciar el proceso de succión de la orina por la unidad de succión 5 y una pantalla de cristal líquido tipo panel táctil 8 que recibe entradas para las instrucciones funcionales del usuario y muestra información tal como los resultados del análisis de la orina.

Como se muestra en la Figura 2, el dispositivo de cuerpo principal 1 está provisto de una unidad de preparación de muestras 11, una unidad de detección 41 y una unidad de análisis 56. Una muestra biológica (orina) en el tubo de ensayo 14 se succiona a través de una pipeta de succión 16 por la función de una bomba de jeringa 15. La muestra biológica succionada de esta manera se mide cuantitativamente por la válvula de muestreo 17 y se suministra y se distribuye respectivamente a las cámaras de reacción 18 y 19. En otras palabras, cantidades predeterminadas de la muestra biológica se envían y se suministran respectivamente a las cámaras de reacción 18 y 19 desde la misma muestra biológica original. Un contenedor 20 que lleva el segundo fluido de dilución (fluido de dilución para bacterias) y un contenedor 21 que lleva el segundo fluido de tinción (fluido de tinción para bacterias) están conectados a la cámara de reacción 18 de tal manera que se suministran respectivamente cantidades predeterminadas del segundo fluido de dilución y del segundo fluido de tinción a la cámara de reacción 18 mediante las bombas de jeringa 22 y 23 a través de tubos; de esta manera, se prepara una muestra usada para medir bacterias (en lo sucesivo, denominada muestra de medición B). Además, un contenedor 24 que lleva el primer fluido de dilución (fluido de dilución para las cuatro partículas) y un contenedor 25 que lleva el primer fluido de tinción (fluido de tinción para las cuatro partículas) están conectados a la cámara de reacción 19 de tal manera que se suministran respectivamente cantidades predeterminadas del primer fluido de dilución y del primer fluido de tinción a la cámara de reacción 19 mediante las bombas de jeringa 26 y 27 a través de tubos; de esta manera, se prepara una muestra usada para medir las cuatro partículas (en lo sucesivo, denominada muestra de medición A).

La unidad de detección 41 se usa para detectar información óptica tal como fluorescencia y luz dispersada de las partículas respectivas contenidas en la muestra de medición y está comprendida por un citómetro de flujo. El citómetro de flujo está provisto de una celda de flujo 42 que permite que la muestra de medición fluya, una fuente de luz láser 47 que irradia la muestra de medición que fluye a través de la celda de flujo 42 con una luz láser, un tubo foto-multiplicador 52 que recibe fluorescencia lateral emitida por las partículas en la muestra de medición y un fotodiodo 49 que recibe luz dispersada frontal.

La Figura 3 muestra el citómetro de flujo en detalle. Como se muestra en la Figura 2, las cámaras de reacción 18 y 19 se conectan a la celda de flujo 42. La celda de flujo 42, que permite que la muestra de medición fluya, forma una porción a la que se dirige la luz láser y está provista de una porción de orificio 43 en la que se estrecha un camino de flujo interno, una boquilla 44 que descarga la muestra de medición hacia arriba hacia la porción de orificio, un puerto de suministro de envoltura fluida 45 y un puerto de fluido de deshecho 46. La fuente de luz láser 47 es una fuente de luz láser semiconductor roja que emite luz láser que tiene una longitud de onda de 633 nm. La unidad de detección 31 está provista de una lente condensadora 48 que condensa la luz láser aplicada desde la fuente de luz láser 47 en la celda de flujo 42, un fotodiodo 49 que recibe la luz dispersada frontal emitida por las partículas en la muestra de medición irradiada con la luz láser y convierte la luz dispersada en una señal eléctrica, una lente colectora 50 y un poro 51 usado para condensar la luz dispersada frontal en el fotodiodo 49, un tubo foto-multiplicador 52 que recibe la fluorescencia emitida por las partículas de la muestra de medición irradiada con la luz láser y la convierte en una señal eléctrica, una lente colectora 53, un filtro 54 y un poro 55 que se usan para condensar la fluorescencia en el tubo foto-multiplicador 52 y amplificadores 57 y 58 que amplifican las señales eléctricas de salida del fotodiodo 49 y del tubo foto-multiplicador 52 y emiten las señales resultantes a una unidad de análisis 56 como una señal de luz dispersada frontal y una señal de fluorescencia. Cuando la muestra de medición se deja fluir a la celda de flujo 42, se genera fluorescencia y luz dispersada, cada momento que las partículas contenidas en la muestra de medición cruzan el área de irradiación de la luz láser aplicada por la fuente de luz láser 47. El tubo foto-multiplicador 52 y el fotodiodo 49 respectivamente reciben y convierten foto-eléctricamente la fluorescencia lateral y la luz dispersada frontal y emiten las señales resultantes a la unidad de análisis 56 como señales de foto-detección tales como una señal de fluorescencia lateral y una señal de luz dispersada frontal.

La unidad de análisis 56 en la Figura 3 está constituida por circuitos que amplifican una señal de foto-detección para cada una de las partículas detectadas en la unidad de detección 41 y eliminan ruidos y por un ordenador constituido por una CPU, ROM, RAM y similares. La unidad de análisis 56 almacena una señal de foto-detección detectada por la unidad de detección 41 para cada una de las partículas. Además, la unidad de análisis 56 analiza la señal de foto-detección almacenada en la misma y forma un diagrama de distribución bidimensional de tal manera que las partículas contenidas en la muestra de medición se cuentan. La intensidad de señal se obtiene del nivel pico de pulsos en la señal de foto-detección. La intensidad de la señal de fluorescencia indica la intensidad de la fluorescencia detectada de cada una de las partículas en la muestra de medición y forma un parámetro que indica el grado de tinción por el tinte fluorescente. La intensidad de la luz dispersada frontal corresponde a una intensidad de la luz dispersada frontal detectada de cada una de las partículas en la muestra de medición y forma un parámetro que indica el tamaño de cada partícula. Combinando estos parámetros, se forma el diagrama de distribución bidimensional. Las partículas que aparecen en el diagrama de distribución se calculan como puntos de partículas que aparecen en las áreas que se ajustan de acuerdo con las posiciones de aparición respectivas de las partículas contenidas en la muestra de medición de tal manera que se obtienen los resultados de las mediciones.

En el presente documento, como se muestra en la Figura 2, la unidad de análisis 56 está conectada a la pantalla de cristal líquido de tipo panel táctil 8. Los resultados de las medidas obtenidas por el análisis en la unidad de análisis 56 se muestran en la pantalla de cristal líquido de tipo panel táctil 8.

La siguiente descripción analizará el material de referencia para un analizador para analizar componentes de partículas en urea por medio de ejemplos. El material de referencia está comprendido por partículas de referencia que corresponden a partículas de medición y por un disolvente usado para dispersar las partículas de referencia. Las partículas de referencia incluyen las primeras partículas de referencia que pueden teñirse con un tinte prácticamente de la misma manera que las partículas de medición y las segundas partículas de referencia que se preparan preliminarmente de tal manera que contengan un tinte fluorescente. En el presente documento, las primeras partículas de referencia teñidas por el tinte se deja que muestren una intensidad de fluorescencia que está en el intervalo de distribución de la intensidad de fluorescencia detectada a partir de las partículas de medición que se han teñido con el tinte. Además, las segundas partículas de referencia, que realmente no se han teñido por el tinte, también se dejan mostrar una intensidad de fluorescencia que está en el intervalo de distribución de la intensidad de fluorescencia detectada a partir de las partículas de medición que se han teñido con el tinte.

En la siguiente descripción, se prepara un ejemplo de un material de referencia en el que se usan partículas de referencia para las células sanguíneas blancas, que hacen frente a las células sanguíneas blancas, se usan como las primeras partículas de referencia, mientras que las partículas de referencia para las bacterias, que hacen frente a las bacterias, se usan como las segundas partículas de referencia y este material de referencia se mide por el analizador 1 anteriormente mencionado para analizar componentes de partículas en urea.

(Partículas de referencia)

Con respecto a las partículas de referencia para las bacterias, se usaron partículas de látex fluorescente que tienen un tamaño de partícula medio de 1 μm (DUKE4010A + 1,0 % de fluorescencia, fabricado por Duke Co., Ltd.). Aquí, se usaron partículas de polímero de acetato de vinilo que tienen un tamaño de partícula medio de 7 μm como las partículas de referencia para las células sanguíneas blancas.

(Preparación de la solución tampón 1 y la solución tampón 2)

Se añadieron a 1 l de agua refinada un 0,3 % de cloruro sódico, un 0,08 % de un agente antiséptico y un 0,035 % de ácido acético de tal manera que se preparó una solución tampón 1. Además, se añadió cloruro sódico a esta solución tampón 1 de tal manera que la concentración final se ajustó al 1,65 % y a esto se añadió además glicerina de tal manera que la concentración final se ajustó al 9,0 %; de esta manera, se preparó una solución tampón 2.

(Preparación de la suspensión de partículas de referencia para bacterias)

Se añadió a 250 μl de partículas de látex fluorescentes (500 partículas/ μl) 1 ml de solución de alcohol polivinílico al 6 % y ésta se agitó usando un vórtex de tal manera que se suspendieron las partículas de látex fluorescentes. Un aparato de ultrasonidos que tiene un diámetro de dispositivo de 8 mm se ajustó a 50 mW durante 30 segundos y las partículas de látex fluorescentes en la suspensión se recubrieron con alcohol polivinílico. A esta suspensión se añadió una cantidad adecuada de la solución tampón 1 para lavar y ésta se centrifugó a 12000 rpm de tal manera que se retiró un fluido sobrenadante. Después de que este proceso de lavado se hubiera repetido dos veces, se añadieron 2 ml de la solución tampón 2 a esto de tal manera que se preparó una suspensión de partículas de referencia para bacterias.

(Preparación de la suspensión de partículas de referencia para células sanguíneas blancas)

Se añadió a 250 μl de partículas de polímero de acetato de vinilo (200 partículas/ μl) una cantidad adecuada de la solución tampón 1 para lavar y ésta se centrifugó a 3000 rpm de tal manera que se retiró un fluido sobrenadante.

Después de que este proceso de lavado se hubiera repetido dos veces, se añadieron 2 ml de la solución tampón 2 a esto de tal manera que se preparó una suspensión de partículas de referencia para células sanguíneas blancas.

- 5 La suspensión de partículas de referencia para bacterias y la suspensión de partículas de referencia para células sanguíneas blancas, preparadas por los procesos anteriormente mencionados, se mezclaron y se usaron como un material de referencia.

(Preparación del fluido de dilución para medir las cuatro partículas (primer fluido de dilución))

- 10 Se mezclaron HEPES (50 mM), EDTA-3K (0,40 %), 2-fenoxietanol (0,75 %), propionato sódico (0,6 %), hidróxido sódico (0,052%), Tomicida S (350 ppm), Proxel GX-L (350 ppm) y agua refinada (1 l) para preparar un primer fluido de dilución.

(Preparación del fluido de dilución para medir bacterias (segundo fluido de dilución))

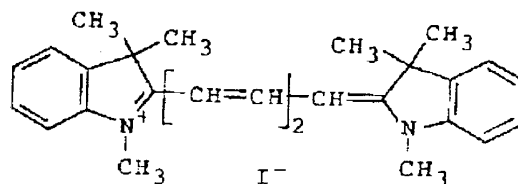
- 15 Se mezclaron ácido cítrico (100 mM), sulfato sódico (90 mM), amida de ácido sulfúrico (100 mM), bromuro de tetradeciltrimetilamonio (0,1 %) e hidróxido sódico la cantidad del que se había ajustado a pH 2,5 para preparar un segundo fluido de dilución.

- 20 (Preparación del fluido de tinción para medir las cuatro partículas (primer fluido de tinción))

- 25 NK-529 (fabricado por Nippon Kankoh-Shikiso Kenkyusho Co., Ltd.) que sirve como un tinte fluorescente representado por la siguiente fórmula química 1 (240 ppm) y NK-136 (fabricado por Nippon Kankoh-Shikiso Kenkyusho Co., Ltd.) que sirve como un tinte fluorescente representado por la siguiente fórmula química 2 (25,2 ppm) se disolvieron en etilenglicol de tal manera que se preparó un primer fluido de tinción.

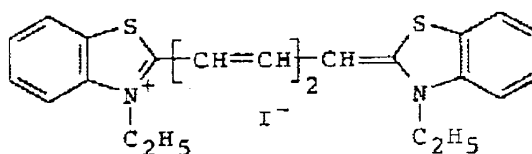
Fórmula 1

NK-529



Fórmula 2

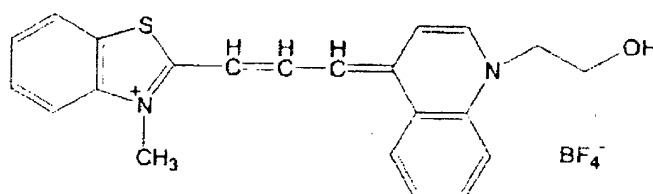
NK-136



- 30 (Preparación del fluido de tinción para medir bacterias (segundo fluido de tinción))

Un tinte fluorescente representado por la siguiente fórmula química 3 se disolvió en etilenglicol para ajustarse a 40 ppm de tal manera que se preparó una segunda solución de tinción.

Fórmula 3



En el analizador 1 para analizar componentes de partículas en urea, primero, el segundo fluido de dilución se ajustó en un contenedor 20, el segundo fluido de tinción se ajustó en un contenedor 21, el primer fluido de dilución se ajustó en un contenedor 24 y el primer fluido de tinción se ajustó en un contenedor 25, respectivamente, y se midió una muestra de orina. Las Figuras 4 y 5 muestran diagramas de distribución en los que la intensidad de la luz dispersada frontal, detectada por el fotodiodo 49, se representó en el eje de las ordenadas y la intensidad de la fluorescencia lateral, detectada por el tubo foto-multiplicador 52, se representó en el eje de las abscisas. En el presente documento, la Figura 4 es un diagrama de distribución en el que la intensidad de luz dispersada frontal se eleva en comparación con la de la Figura 5.

La Figura 4 muestra los resultados de las mediciones obtenidas de la muestra de orina y de la muestra de medición B preparada por el segundo fluido de dilución y el segundo fluido de tinción. En el diagrama de distribución de la Figura 4, la sensibilidad de la luz dispersada frontal se eleva de tal manera que se miden las bacterias contenidas en la muestra de orina y las bacterias se observaron en un área A (intensidad de la luz dispersada frontal: de aproximadamente 70 a 110 canales, intensidad de fluorescencia: de aproximadamente 100 a 160 canales) en la Figura.

La Figura 5 muestra los resultados de las mediciones obtenidas de la muestra de orina y de la muestra de medición A preparada por el primer fluido de dilución y el primer fluido de tinción. En el diagrama de distribución de la Figura 5, la sensibilidad de la luz dispersada frontal se ajusta a un nivel inferior en comparación con la de la Figura 4 de tal manera que las bacterias se observaron en un área C, mientras que las células sanguíneas blancas se observaron en un área B (intensidad de la luz dispersada frontal: de aproximadamente 170 a 230 canales, intensidad de fluorescencia: de aproximadamente 30 a 170 canales) en la Figura.

Después, se llevaron a cabo mediciones en el material de referencia usando el analizador 1 para analizar componentes de partículas en urea. Las Figuras 6 y 7 muestran los diagramas de distribución resultantes. La Figura 6 muestra los resultados de las mediciones obtenidas del material de referencia y de la muestra de medición B preparada por el segundo fluido de dilución y el segundo fluido de tinción. La Figura 7 muestra los resultados de las mediciones obtenidas del material de referencia y de la muestra de medición A preparada por el primer fluido de dilución y el primer fluido de tinción. Las Figuras 6 y 7 muestran diagramas de distribución en los que la intensidad de la luz dispersada frontal se representó en el eje de las ordenadas y la intensidad de la fluorescencia lateral se representó en el eje de las abscisas. De la misma manera que las Figuras 4 y 5, la Figura 6 es un diagrama de distribución en el que la intensidad de luz dispersada frontal se eleva en comparación con la de la Figura 7.

En la Figura 6, las partículas de referencia para las bacterias (partículas de látex fluorescentes) se observaron en el área A que era un área de aparición de bacterias. El intervalo de distribución de las partículas de referencia para bacterias se posicionó prácticamente en el medio del área de aparición A de bacterias y se observó con la intensidad de la luz dispersada frontal ajustándose en aproximadamente 81 a 88 canales y la intensidad de fluorescencia ajustándose en aproximadamente 110 a 140 canales. En el presente documento, las partículas de referencia para las bacterias eran partículas que realmente no se tiñeron por el segundo fluido de tinción.

En la Figura 7, las partículas de referencia para las células sanguíneas blancas (partículas de polímero de acetato de vinilo) se observaron en el área B que era un área de aparición de células sanguíneas blancas. El intervalo de distribución de las partículas de referencia para células sanguíneas blancas se observó, con la intensidad de la luz dispersada frontal ajustándose en aproximadamente 200 a 220 canales y la intensidad de fluorescencia ajustándose en aproximadamente 30 a 140 canales. Además, las partículas de referencia para bacterias se observaron en un área C. En el presente documento, las partículas de referencia para las células sanguíneas blancas eran partículas que realmente no se tiñeron por el primer fluido de tinción.

En la Figura 7, se indican el área de aparición de las partículas de referencia para las células sanguíneas blancas (partículas de polímero de acetato de vinilo) y el área de aparición de las partículas de referencia para las bacterias (partículas de látex fluorescentes); por el contrario, en la Figura 6, el área de aparición de las partículas de referencia para las células sanguíneas blancas no se indica claramente. Esto es porque la Figura 6 es un diagrama de distribución en el que la sensibilidad de la luz dispersada frontal se eleva para poder medir las bacterias en la muestra. Como se describe anteriormente, hay una gran diferencia en el tamaño de partícula entre las partículas de referencia para bacterias y las partículas de referencia para células sanguíneas blancas. Ya que la luz dispersada frontal forma un parámetro que refleja el tamaño de las partículas, la intensidad de la luz dispersada frontal obtenida a partir de las partículas de referencia para bacterias y la intensidad de la luz dispersada frontal obtenida a partir de las partículas de referencia para células sanguíneas blancas son diferentes entre sí en sus tamaños. Por lo tanto, con respecto a la Figura 6, formando un diagrama de distribución con una sensibilidad reducida de la luz dispersada frontal, el área de aparición de las partículas de referencia para células sanguíneas blancas puede confirmarse.

Tras analizar una muestra de orina usando el analizador 1 para analizar componentes de partículas en la urea, la intensidad de fluorescencia de las partículas a detectarse se determina por los siguientes factores:

- (1) Condiciones de la unidad de detección 41: por ejemplo, la sensibilidad (salida de voltaje) de un detector de fluorescencia (tubo foto-multiplicador 52), y

(2) Condiciones de la unidad de preparación de muestras 11: por ejemplo, la cantidad de suministro del fluido de tinción.

5 En el presente documento, se supone que la media de la intensidad de fluorescencia obtenida por las mediciones de las partículas de referencia se compara con un intervalo predeterminado de intensidad de fluorescencia y que los resultados se juzgan y se clasifican en \pm (valores dentro de un intervalo normal), + (valores mayores que el intervalo normal por 10 canales) y - (valores menores que el intervalo normal por 10 canales). Por ejemplo, en el caso en el que los resultados de juzgar las primeras partículas de referencia y las segundas partículas de referencia obtenidas a partir de la muestra de medición A se indiquen por los valores de la siguiente Tabla 1, puede juzgarse que hay cualquier anomalía en la unidad de detección 41 y en la unidad de preparación de muestras 11 (particularmente, 10 en una porción con respecto a la preparación de la muestra de medición A).

Tabla 1

	Resultados del Juicio	Porción con anomalía (Ejemplo de Posible Causa)
Primeras Partículas de Referencia	+	Unidad de preparación de la muestra (Mucha cantidad de fluido de tinción, etc.)
Segundas Partículas de Referencia	\pm	
Primeras Partículas de Referencia	+	Unidad de detección (Alta sensibilidad del detector de fluorescencia, etc.)
Segundas Partículas de Referencia	+	
Primeras Partículas de Referencia	\pm	Unidad de preparación de la muestra y Unidad de detección (Mucha cantidad de fluido de tinción, baja sensibilidad del detector de fluorescencia, etc.)
Segundas Partículas de Referencia	-	
Primeras Partículas de Referencia	-	Unidad de preparación de la muestra (Menos cantidad de fluido de tinción, etc.)
Segundas Partículas de Referencia	\pm	
Primeras Partículas de Referencia	-	Unidad de detección (Baja sensibilidad del detector de fluorescencia, etc.)
Segundas Partículas de Referencia	-	
Primeras Partículas de Referencia	-	Unidad de preparación de la muestra y Unidad de detección (Menos cantidad de fluido de tinción, alta sensibilidad del detector de fluorescencia, etc.)
Segundas Partículas de Referencia	+	

15 Además, de la misma manera, con respecto a los resultados del juicio de las primeras partículas de referencia y de las segundas partículas de referencia obtenidas a partir de la muestra de medición B, llevando a cabo las exámenes anteriormente mencionadas, puede juzgarse si hay cualquier anomalía en la unidad de detección 41 y en la unidad de preparación de muestras 11 (particularmente en una porción con respecto a la preparación de la muestra de medición B). En el presente documento, el analizador 1 para analizar componentes de partículas en urea con respecto a la presente realización se diseña para llevar a cabo automáticamente el juicio anteriormente mencionado en cualquier porción anormal. Con referencia a la Figura 8, la siguiente descripción analizará las funciones en este caso.

20 En primer lugar, el usuario ajusta un material de referencia que contiene las primeras partículas de referencia y las segundas partículas de referencia en una posición predeterminada y cuando se presiona un interruptor de inicio 7, se inicia el proceso de succión del material de referencia.

25 Etapa 1 (S1): En S1, se preparan la muestra de medición A y la muestra de medición B.

30 En primer lugar, el material de referencia en un tubo de ensayo 14 se succiona a través de una pipeta de succión 16 por el funcionamiento de una bomba de jeringa 15. El material de referencia succionado de esta manera se mide cuantitativamente por una válvula de muestreo 17 y se suministra separadamente a las cámaras de reacción 18 y 19. Una cantidad predeterminada del segundo fluido de dilución en un contenedor 20 se suministra a la cámara de reacción 18 a través de un tubo por una bomba de jeringa 22. Una cantidad predeterminada del segundo fluido de tinción en un contenedor 21 se suministra a la cámara de reacción 18 a través de un tubo por una bomba de jeringa 23. De esta manera, se prepara la muestra de medición B. Una cantidad predeterminada del primer fluido de dilución en un contenedor 24 se suministra a la cámara de reacción 19 a través de un tubo por una bomba de jeringa 26. Una cantidad predeterminada del primer fluido de tinción en un contenedor 25 se suministra a la cámara de reacción 19 a través de un tubo por una bomba de jeringa 27. De esta manera, se prepara la muestra de medición A.

Etapa 2 (S2): En S2, la intensidad de fluorescencia y la intensidad de la luz dispersada frontal se obtienen basándose en las primeras partículas de referencia y las segundas partículas de referencia contenidas en las respectivas muestras de medición.

5 En primer lugar, la muestra de medición A en la cámara de reacción 19 se descarga en una celda de flujo a través de la boquilla 44. Simultáneamente, se descarga un fluido de envoltura en una celda de flujo de envoltura desde el puerto de suministro de fluido de envoltura 45. De esta manera, la muestra de medición A se rodea por un fluido de envoltura en la celda de flujo y adicionalmente se estrecha muy fino por la porción de orificio 43 y se deja fluir. Un haz de luz láser emitido desde la fuente de luz láser 47 se condensa por la lente condensadora 48 y se dirige a la muestra de medición A que fluye a través de la porción de orificio 43. La luz dispersada frontal, liberada de las primeras partículas de referencia y de las segundas partículas de referencia en la muestra de medición A tras la recepción del haz de luz láser, se recibe por el fotodiodo 49 y se convierte en foto-eléctrica para emitirse como una señal de luz dispersada frontal. La fluorescencia lateral, emitida por las primeras partículas de referencia y de las segundas partículas de referencia en la muestra de medición A, se recibe por el foto-multiplicador 52 y se convierte en foto-eléctrica para emitirse como una señal de fluorescencia lateral. Las respectivas señales se emiten a la unidad de análisis 56. La unidad de análisis 56 analiza la señal de luz dispersada frontal y la señal de fluorescencia lateral detectadas por la unidad de detección 41 de tal manera que se obtienen una intensidad de luz dispersada frontal y una intensidad de fluorescencia. De esta manera, la primera intensidad de fluorescencia y la primera intensidad de luz dispersada frontal se obtienen de las primeras partículas de referencia de la muestra de medición A. Además, la segunda intensidad de fluorescencia y la segunda intensidad de luz dispersada frontal se obtienen de las segundas partículas de referencia de la muestra de medición A.

De la misma manera, la muestra de medición B en la cámara de reacción 18 se descarga en una celda de flujo a través de la boquilla 44 y se deja fluir a través de la celda de flujo. La luz dispersada frontal, liberada de las primeras partículas de referencia y de las segundas partículas de referencia en la muestra de medición B tras la recepción del haz de luz láser, se recibe por el fotodiodo 49 y se convierte en foto-eléctrica para emitirse como una señal de luz dispersada frontal. La fluorescencia lateral, emitida por las primeras partículas de referencia y de las segundas partículas de referencia en la muestra de medición B, se recibe por el tubo foto-multiplicador 52 y se convierte en foto-eléctrica para emitirse como una señal de fluorescencia lateral. Las respectivas señales se emiten a la unidad de análisis 56. La unidad de análisis 56 analiza la señal de luz dispersada frontal y la señal de fluorescencia lateral detectadas por la unidad de detección 41 de tal manera que se obtienen una intensidad de luz dispersada frontal y una intensidad de fluorescencia. De esta manera, la tercera intensidad de fluorescencia y la tercera intensidad de luz dispersada frontal se obtienen de las primeras partículas de referencia de la muestra de medición B. Además, la cuarta intensidad de fluorescencia y la cuarta intensidad de luz dispersada frontal se obtienen de las segundas partículas de referencia de la muestra de medición B.

Etapa 3 (S3): En S3, la unidad de análisis 56 almacena la intensidad de luz dispersada frontal y la intensidad de fluorescencia obtenidas en S2.

40 Etapa 4 (S4): En S4, la unidad de análisis 56 obtiene los resultados del juicio de la intensidad de fluorescencia de las primeras partículas de referencia y los resultados del juicio de la intensidad de fluorescencia de las segundas partículas de referencia y basándose en los resultados del juicio, juzga cualquier porción anormal basándose en los mismos criterios como se muestra en la Tabla 1.

45 En primer lugar, con respecto a la primera intensidad de fluorescencia obtenida de esta manera, la unidad de análisis 56 calcula un valor medio de la misma (en lo sucesivo, denominado valor medio X). En el presente documento, cuando el valor medio X resultante está en un intervalo entre los valores predeterminados del límite superior y del límite inferior, la unidad de análisis 56 juzga este estado como \pm (valor dentro de un intervalo normal); cuando excede el valor límite superior, la unidad de análisis 56 juzga este estado como + (valor mayor que el intervalo normal); y cuando va por debajo del valor límite inferior, la unidad de análisis 56 juzga este estado como - (valor menor que el intervalo normal). De la misma manera, con respecto a la segunda intensidad de fluorescencia, la tercera intensidad de fluorescencia y la cuarta intensidad de fluorescencia, la unidad de análisis 56 calcula respectivamente los valores medios y lleva a cabo los mismos procesos de juicio.

55 De esta manera, se obtienen los resultados del juicio con respecto a la intensidad de fluorescencia de las primeras partículas de referencia (la primera intensidad de fluorescencia y la tercera intensidad de fluorescencia) y los resultados del juicio con respecto a la intensidad de fluorescencia de las segundas partículas de referencia (la segunda intensidad de fluorescencia y la cuarta intensidad de fluorescencia) y basándose en los resultados del juicio, se juzga cualquier porción anormal basándose en los mismos criterios como se muestra en la Tabla 1.

60 Etapa 5 (S5): En S5, los resultados del juicio de cualquier porción anormal en S4 se emiten a la pantalla de cristal líquido tipo panel táctil 8.

65 Como se describe anteriormente, el uso de las partículas de referencia de acuerdo con la presente invención hace posible detectar una anomalía como es el caso de una reducción de la propiedad de tinción por fluorescencia en la parte de preparación de muestras con una sensibilidad aumentada en el detector de fluorescencia, que no se ha

detectado por la técnica anterior. Además, ya que puede detectarse una porción que tenga una anomalía, se hace posible llevar a cabo fácilmente el proceso de mantenimiento correspondiente para el dispositivo de forma adecuada.

5 En la descripción anterior, se ha dado la explicación ejemplificando un caso en el que se detecta cualquier porción anormal midiendo la intensidad de la fluorescencia de las partículas de referencia; sin embargo, la detección de cualquier porción anormal también puede llevarse a cabo midiendo la anchura del pulso de fluorescencia. Además, la presencia de cualquier anomalía en el detector de luz dispersada puede confirmarse midiendo no solamente la fluorescencia de las partículas de referencia, sino también la luz dispersada (intensidad o anchura del pulso) de las
10 mismas.

En la descripción anterior, se ha explicado un proceso de medición en el que se usan el material de referencia que contiene las primeras partículas de referencia y las segundas partículas de referencia; sin embargo, la presente invención no está destinada a limitarse por este proceso. Por ejemplo, pueden usarse el primer material de referencia que contiene las primeras partículas de referencia y el segundo material de referencia que contiene las segundas partículas de referencia. Con referencia a la Figura 9, la siguiente descripción analizará las funciones en este caso.
15

En primer lugar, el usuario ajusta un primer material de referencia que contiene las primeras partículas de referencia y un segundo material de referencia que contiene las segundas partículas de referencia en posiciones predeterminadas y cuando se presiona un interruptor de inicio 7, se inician sucesivamente los procesos de succión del primer material de referencia y del segundo material de referencia.
20

Etapa 6 (S6): En S6, la primera muestra de medición A y la primera muestra de medición B se preparan a partir del primer material de referencia. Con respecto a los funcionamientos de los dispositivos con respecto a la preparación de las muestras de medición respectivas, se llevan a cabo las mismas funciones que aquellas de la anteriormente mencionada S1.
25

Etapa 7 (S7): En S7, la intensidad de fluorescencia y la intensidad de luz dispersada frontal se obtienen de las primeras partículas de referencia y de las segundas partículas de referencia contenidas en las respectivas muestras de medición obtenidas en la anteriormente mencionada S6. Con respecto a los funcionamientos de los dispositivos usados para adquirir la intensidad de fluorescencia y la intensidad de luz dispersada frontal, se llevan a cabo las mismas funciones que aquellas de la anteriormente mencionada S2. De esta manera, la primera intensidad de fluorescencia y la primera intensidad de luz dispersada frontal se obtienen de las primeras partículas de referencia en la primera muestra de medición A preparada en la anteriormente mencionada S6. Además, la tercera intensidad de fluorescencia y la tercera intensidad de luz dispersada frontal se obtienen de las primeras partículas de referencia en la muestra de medición B.
30
35

Etapa 8 (S8): En S8, la unidad de análisis 56 almacena la intensidad de luz dispersada frontal y la intensidad de fluorescencia obtenidas en S7.
40

Etapa 9 (S9): En S9, la segunda muestra de medición A y la segunda muestra de medición B se preparan a partir del segundo material de referencia. Con respecto a los funcionamientos de los dispositivos con respecto a la preparación de las muestras de medición respectivas, se llevan a cabo las mismas operaciones que aquellas de la anteriormente mencionada S1.
45

Etapa 10 (S10): En S10, la intensidad de fluorescencia y la intensidad de luz dispersada frontal se obtienen de las primeras partículas de referencia y de las segundas partículas de referencia contenidas en las respectivas muestras de medición obtenidas en la anteriormente mencionada S9. Con respecto a los funcionamientos de los dispositivos usados para adquirir la intensidad de fluorescencia y la intensidad de luz dispersada frontal, se llevan a cabo las mismas funciones que aquellas de la anteriormente mencionada S2. De esta manera, la segunda intensidad de fluorescencia y la segunda intensidad de luz dispersada frontal se obtienen de las primeras partículas de referencia en la segunda muestra de medición A preparada en la anteriormente mencionada S9. Además, la cuarta intensidad de fluorescencia y la cuarta intensidad de luz dispersada frontal se obtienen de las primeras partículas de referencia en la muestra de medición B.
50
55

Etapa 11 (S11): En S11, la unidad de análisis 56 almacena la intensidad de luz dispersada frontal y la intensidad de fluorescencia obtenidas en la anteriormente mencionada S10.

Etapa 12 (S12): En S12, la unidad de análisis 56 obtiene los resultados del juicio de la intensidad de fluorescencia de las primeras partículas de referencia y los resultados del juicio de la intensidad de fluorescencia de las segundas partículas de referencia y basándose en los resultados del juicio, juzga cualquier porción anormal basándose en los mismos criterios como se muestra en la Tabla 1. Con respecto a los funcionamientos de los dispositivos con respecto al juicio de los resultados de detección y el juicio de cualquier porción anormal, se llevan a cabo las mismas funciones que aquellas de la anteriormente mencionada S4. De esta manera, se obtienen los resultados del juicio con respecto a la intensidad de fluorescencia de las primeras partículas de referencia (la primera intensidad de
60
65

fluorescencia y la tercera intensidad de fluorescencia) y los resultados del juicio con respecto a la intensidad de fluorescencia de las segundas partículas de referencia (la segunda intensidad de fluorescencia y la cuarta intensidad de fluorescencia) y basándose en los resultados del juicio, se juzga cualquier porción anormal basándose en los mismos criterios como se muestra en la Tabla 1.

5 Etapa 13 (S13): En S13, los resultados del juicio de cualquier porción anormal en S12 se emiten a la pantalla de cristal líquido tipo panel táctil 8.

10 En el presente documento, en S5 o en S13, no solamente los resultados del juicio de cualquier porción anormal, sino también el estado de las primeras partículas de referencia y de las segundas partículas de referencia, esto es, \pm , + o -, pueden mostrarse en la pantalla de cristal líquido tipo panel táctil 8.

15 En la realización anteriormente mencionada, las partículas de referencia para las células sanguíneas blancas se usan como las partículas de referencia que corresponden a las primeras partículas de referencia, mientras que las partículas de referencia para las bacterias se usan como las partículas de referencia que corresponden a las segundas partículas de referencia; sin embargo, la presente invención no se limita por esta disposición. Por ejemplo, además de las partículas de referencia para las células sanguíneas blancas, pueden usarse partículas de referencia para células sanguíneas rojas, partículas de referencia para células epiteliales, partículas de referencia para células columnares y similares como las primeras partículas de referencia.

20 Con respecto a las partículas de referencia para las células sanguíneas blancas que hacen frente a las células sanguíneas blancas pueden usarse, por ejemplo, partículas de polímero de acetato de vinilo y partículas de sílice porosa. Estas partículas de referencia son partículas que permiten mostrar prácticamente la misma intensidad de fluorescencia que la de las células sanguíneas blancas, cuando se tiñen usando un tinte. Además, estas partículas de referencia se preparan preferentemente como partículas que muestran prácticamente la misma intensidad de luz dispersada que la de las células sanguíneas blancas y el tamaño de partícula medio se ajusta preferentemente en un intervalo de 5 a 15 μm , más preferentemente de 7 a 12 μm .

30 Con respecto a las partículas de referencia para las células epiteliales que hacen frente a las células epiteliales pueden usarse materiales tales como partículas de poliacrilamida, gel de celulosa y gel de polímero de vinilo hidrófilo. Estas partículas de referencia son partículas que permiten mostrar prácticamente la misma intensidad de fluorescencia que la de las células epiteliales, cuando se tiñen usando un tinte. Además, estas partículas de referencia se preparan preferentemente como partículas que muestran prácticamente la misma intensidad de luz dispersada que la de las células epiteliales y el tamaño de partícula medio se ajusta preferentemente en un intervalo de 20 a 150 μm , más preferentemente de 45 a 90 μm .

40 Con respecto a las partículas de referencia para las células columnares que hacen frente a las células columnares pueden usarse materiales tales como partículas de polímero de vinilo hidrófilo y gel de agarosa reticulado. Estas partículas de referencia son partículas que permiten mostrar prácticamente la misma intensidad de fluorescencia que la de las células columnares, cuando se tiñen usando un tinte. Además, estas partículas de referencia se preparan preferentemente como partículas que muestran prácticamente la misma intensidad de luz dispersada que la de las células columnares y el tamaño de partícula medio se ajusta preferentemente en un intervalo de 5 a 60 μm , más preferentemente de 10 a 40 μm .

45 Con respecto a las partículas de referencia para las células sanguíneas rojas que hacen frente a las células sanguíneas rojas pueden usarse materiales tales como partículas de látex y partículas de sílice de alta pureza. Estas partículas de referencia son partículas que permiten mostrar prácticamente la misma intensidad de fluorescencia que la de las células sanguíneas rojas, cuando se tiñen usando un tinte. Además, estas partículas de referencia se preparan preferentemente como partículas que muestran prácticamente la misma intensidad de luz dispersada que la de las células sanguíneas rojas y el tamaño de partícula medio se ajusta preferentemente en un intervalo de 3 a 20 μm , más preferentemente de 5 a 10 μm .

50 Con respecto a las partículas de referencia para las bacterias que hacen frente a las bacterias, pueden usarse por ejemplo, partículas de látex fluorescente. Estas partículas de referencia se preparan preferentemente como partículas que realmente no se tiñen con un tinte usado en el analizador de partículas. Además, se usan preferentemente esas partículas que muestran prácticamente la misma intensidad de fluorescencia que la de las bacterias teñidas por fluorescencia con el tinte. Además, se usan preferentemente esas partículas que muestran prácticamente la misma intensidad de luz dispersada que la de las bacterias y el tamaño de partícula medio se ajusta preferentemente en un intervalo de 0,5 a 5 μm , más preferentemente de 0,8 a 3 μm .

60 En la presente realización, se usan partículas de látex fluorescente como las partículas de referencia que corresponden a las bacterias y esas partículas que se tiñen por fluorescencia por el tratamiento de tinción por fluorescencia en el analizador de partículas se usan como las partículas de referencia que corresponden a las células sanguíneas blancas; sin embargo, la presente invención no está destinada a limitarse por esta disposición. Por ejemplo, esas partículas que se tiñen por fluorescencia prácticamente de la misma forma que las bacterias con

un tinte pueden usarse como las partículas de referencia que corresponden a bacterias y las partículas fluorescentes, preparadas preliminarmente de forma que contengan un tinte fluorescente, pueden usarse como las partículas de referencia que corresponden a las células sanguíneas blancas, a las células sanguíneas rojas, a las células epiteliales o a las células columnares. En el presente documento, para mejorar la propiedad de dispersión de las partículas de látex y similares usadas como las partículas de referencia, las partículas de látex pueden recubrirse con alcohol polivinílico.

Con respecto a un disolvente usado para el material de referencia, puede usarse un disolvente acuoso y se usa preferentemente una solución tampón. Para mejorar la propiedad de dispersión de las partículas de referencia, puede añadirse un agente de mejora de la dispersabilidad tal como un tensioactivo a la solución tampón.

Con respecto a los reactivos que se mezclan con una muestra de orina para preparar una muestra de medición, como se describe en la realización anteriormente mencionada, el primer fluido de tinción y el primer fluido de dilución usados para medir células sanguíneas blancas, células sanguíneas rojas, células epiteliales y células columnares, así como el segundo fluido de tinción y el segundo fluido de dilución usados para medir bacterias, respectivamente se usan con preferencia. Esto es porque, ya que las bacterias son minúsculas en comparación con las otras partículas, se aplican el fluido de dilución y el fluido de tinción usados exclusivamente para medir bacterias de tal manera que pueda mejorarse la precisión de medición de las bacterias.

Por ejemplo, la muestra de urea normalmente incluye las denominadas impurezas, esto es, fibras mucosas, cristales, sales no cristalinas, fragmentos de células y similares y debido a los tamaños similares, se interponen en las medidas de las bacterias. La intensidad de la luz dispersada frontal detectada de las impurezas se superpone con la intensidad detectada de las bacterias, haciendo difícil distinguirlas. Por esta razón, es preferible preparar un segundo fluido de dilución tal que pueda suprimir que las impurezas se tiñan y que también pueda disolver las impurezas.

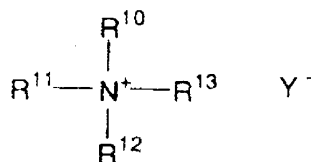
Para mejorar la propiedad de la tinción de las bacterias, suprimir que las impurezas se tiñan y disolver las impurezas en un cierto grado, se prepara el segundo fluido de dilución preferentemente con un intervalo de pH de 2,0 a 4,5, preferentemente, de 2,0 a 3,0.

Con el fin de mantener la propiedad del pH del segundo fluido de dilución, puede usarse un ácido o un agente tamponante de pKa de 1 a 5. Aunque no se limita particularmente mientras pueda mantenerse el intervalo de pH anteriormente mencionado, los ejemplos preferibles de los mismos incluyen: sal de ácido cítrico, sal de ácido fosfórico, sal de ácido ftálico, glicina, ácido succínico, ácido láctico, β-alanina, ácido ε-aminocaproico y ácido fumárico. La cantidad de uso se ajusta preferentemente para mantener el intervalo de pH anteriormente mencionado y varía de 10 a 500 mM.

Añadiendo un tensioactivo, más preferentemente, un tensioactivo catiónico, al segundo fluido de dilución, la membrana celular de las bacterias se daña para permitir que el tinte se introduzca en las mismas más fácilmente. Como resultado, las bacterias se tiñen más eficazmente para distinguirse más fácilmente de las impurezas. Además, las fibras mucosas, las células sanguíneas rojas, los fragmentos de células y similares se disuelven o se dejan contraerse de tal manera que pueden reducirse los efectos adversos de la detección de bacterias.

Con respecto al tensioactivo catiónico, aunque no se limita particularmente, se usa preferentemente la sal de amonio cuaternario indicada por la siguiente fórmula química 4. En el presente documento, en la fórmula química 4, R¹⁰ representa un grupo alquilo que tiene de 6 a 18 átomos de carbono o (C₆H₅)-CH₂-, cada uno de R¹¹, R¹² y R¹³ representa un grupo alquilo o un grupo bencilo que tiene de 1 a 3 átomos de carbono e Y⁻ representa un ion halógeno. En el presente documento, R¹¹, R¹² y R¹³ pueden ser el mismo o diferentes entre sí.

Fórmula química 4



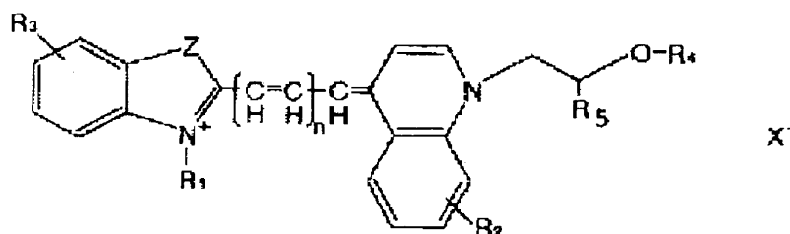
Por ejemplo, pueden usarse preferentemente al de amonio de deciltrimetilo, sal de amonio de dodeciltrimetilo, sal de amonio de tetradeciltrimetilo, sal de amonio de hexadeciltrimetilo y sal de amonio de octadeciltrimetilo. La cantidad de uso de las mismas se establece preferentemente en un intervalo de 10 a 30000 mg/l, más preferentemente, de 100 a 3000 mg/l.

Con respecto al tinte a usarse para el tratamiento de tinción por fluorescencia de las bacterias, no se limita particularmente, y el tinte puede usarse mientras que tiñan las bacterias dentro del intervalo de pH anteriormente

mencionado. Con respecto a la concentración, aunque cada tinte tiene una concentración preferible diferente, puede ajustarse, por ejemplo, en un intervalo de 0,1 a 100 ppm (concentración final). En el presente documento, desde el punto de vista de la capacidad de detección de las bacterias, el tinte a usarse se prepara preferentemente como un tinte fluorescente que se combina con al menos uno de los componentes que forman a las bacterias y emite fluorescencia.

Más específicamente, se usa preferentemente el tinte indicado por la siguiente fórmula química 5. En la fórmula química 5, R_1 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 3 átomos de carbono, cada uno de R_2 y R_3 representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo que tiene de 1 a 3 átomos de carbono o un grupo alcoxi que tiene de 1 a 3 átomos de carbono, R_4 representa un átomo de hidrógeno, un grupo acilo o un grupo alquilo que tiene de 1 a 3 átomos de carbono, R_5 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 3 átomos de carbono que puede sustituirse, Z representa un átomo de azufre, un átomo de oxígeno o un átomo de carbono sustituido con un grupo alquilo que tiene de 1 a 3 átomos de carbono, n indica un entero de 1 o 2 y X⁻ representa un anión.

Fórmula química 5



En el presente documento, el fluido de dilución (primer fluido de dilución), que se usa para medir los cuatro tipos de partículas distintos de las bacterias, esto es, células sanguíneas blancas, células sanguíneas rojas, células epiteliales y células columnares, en una muestra de orina, se ajusta preferentemente en un intervalo de presión osmótica y en un intervalo de pH tales para no hemolizar las células sanguíneas rojas.

Para ajustar el primer fluido de dilución en un intervalo de presión osmótica y en un intervalo de pH tales para no someter a las células sanguíneas rojas a hemólisis, es preferible añadir un agente tamponante y un agente de compensación de la presión osmótica al primer fluido de dilución. El pH del primer fluido de dilución se establece preferentemente en un intervalo de 3,8 a 10,5, más preferentemente, de 6,3 a 8,5. Este intervalo se establece porque, cuando el pH del primer fluido de dilución muestra una propiedad altamente alcalina, las células sanguíneas rojas tienden a hemolizarse y porque en el intervalo ácido, el cambio de pH en un espécimen de orina se vuelve mayor y causa daños en las células sanguíneas rojas y el deterioro de la propiedad de la tinción de las partículas de orina en su conjunto.

Con respecto al agente tamponante a añadirse al primer fluido de dilución, pueden usarse esos agentes convencionalmente conocidos. Por ejemplo, pueden usarse los agentes tamponantes de Good y similares, tales como Tris, MES, Bis-Tris, ADA, PIPES, ACES, MOPSO, BES, MOPS, TES, HEPES, DIPSO, TAPSO, POPSO, HEPPSO, EPPS, Tricina, Bicina y TAPS. La concentración del agente tamponante a usarse normalmente se ajusta en un intervalo de 20 a 500 mM, más preferentemente de 50 a 200 mM.

Con respecto al agente de compensación de la presión osmótica a añadirse al segundo fluido de dilución, pueden usarse sales inorgánicas, sales orgánicas tales como sal de ácido propiónico y azúcares. Con respecto a las sales inorgánicas, se usan cloruro sódico, cloruro potásico, bromuro sódico y similares. Con respecto a la sal de ácido propiónico de sales inorgánicas se usan propionato sódico, propionato potásico, propionato de amonio y similares. Con respecto a las otras sales orgánicas, se usan sales de ácido oxálico, sales de ácido acético y similares. Con respecto a los azúcares, se usan sorbitol, glucosa, manitol y similares. El agente de compensación de la presión osmótica se añade para prevenir la hemólisis de las células sanguíneas rojas y para obtener una intensidad de fluorescencia estable. La presión osmótica de la orina se distribuye a lo largo de un amplio intervalo de 50 a 1300 mOsm/kg. Cuando la presión osmótica de un reactivo de análisis es demasiado baja, la hemólisis de las células sanguíneas rojas avanza más rápido, mientras, cuando la presión osmótica del mismo es demasiado alta, las partículas de la muestra de orina se dañan gravemente; por lo tanto, la presión osmótica se ajusta preferentemente a un intervalo de 100 a 600 mOsm/kg, más preferentemente, de 150 a 500 mOsm/kg.

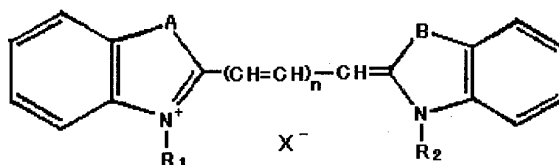
Además, para reducir los efectos adversos de las sales no cristalinas que aparecen en una muestra de orina (por ejemplo, fosfato amónico, fosfato magnésico, carbonato cálcico), puede añadirse un agente quelante usado para disolverlas al fluido de dilución para las cuatro partículas. Con respecto al agente quelante, no limitado particularmente en los tipos, puede usarse cualquier agente quelante mientras sirva como agente descalcificante o agente desmagnesificante. Los ejemplos de los mismos incluyen: sal de EDTA, CyDTA, DHEG, DPTA-OH, EDDA,

EDDP, GEDTA, HDTA, HIDA, Metil-EDTA, NTA, NTP, NTPO y EDDPO. Más preferentemente, se usan sal de EDTA, CyDTA y GEDTA. La concentración de los mismos se ajusta a un intervalo del 0,05 al 5 % p/p, más preferentemente, del 0,1 al 1 % p/p. En el presente documento, el agente descalcificante o el agente desmagnesificante se refiere a un agente que se combina con un ion calcio o con un ion magnesio para formar un compuesto soluble en agua.

Cuando aparecen hongos parecidos a levaduras en una muestra de orina, la intensidad de la luz dispersada frontal y la fluorescencia detectada de los hongos parecidos a levaduras se solapan con la intensidad de aquellas detectadas de las células sanguíneas rojas y hacen difícil distinguir a éstas. Por lo tanto, una sustancia que cause una diferencia entre los hongos parecidos a levaduras y las células sanguíneas rojas en la propiedad de tinción al tinte fluorescente puede añadirse al fluido de dilución para los componentes de partículas. Añadiendo una sustancia tal, se genera la diferencia entre las intensidades de fluorescencia derivadas de los hongos parecidos a levaduras y de las células sanguíneas rojas de tal manera que pueda mejorarse la precisión distinguiendo las células sanguíneas rojas. Con respecto a la sustancia, se usan esas sustancias que causan daños a las membranas celulares de los hongos parecidos a levaduras para acelerar la permeabilidad del tinte al interior de las células, sin causar daños a la membrana celular de las células sanguíneas rojas. Cuando la membrana celular de las células sanguíneas se daña, se provoca la hemólisis, haciendo difícil contar el número de células sanguíneas rojas. Con respecto a las sustancias que satisfacen las condiciones anteriormente mencionadas, se usan preferentemente compuestos orgánicos no iónicos que tienen un anillo de benceno. Los ejemplos de los mismos incluyen: alcoholes aromáticos, tales como alcohol bencílico, alcohol β -fenetílico, fenol, 1-fenoxi-2-propanol y 2-fenoxietanol, compuestos basados en tiazol tales como 2-aminobenzotiazol y benzotiazol y acetato de fenilo.

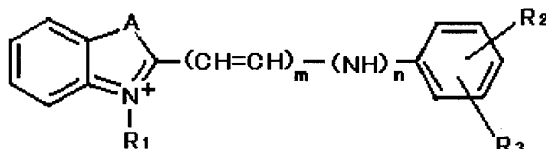
En el presente documento, en la presente realización, con respecto a las partículas que pueden teñirse y al tinte fluorescente usado para teñir los componentes de partículas en una muestra de orina, pueden usarse los derivados de benceno condensados representados por las siguientes Fórmula Química 6 y Fórmula Química 7.

Fórmula Química 6



En la Fórmula química 6, cada uno de R_1 y R_2 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que se sustituye por un grupo hidróxido. A y B representan azufre, oxígeno, nitrógeno o carbono que tiene un grupo alquilo inferior seleccionado de metilo y etilo. Además, n es un entero de 1 o 2 y X^- es un anión.

Fórmula Química 7



En la Fórmula química 7, R_1 representa un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. R_2 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alcoxi que tiene de 1 a 3 átomos de carbono. R_3 representa un grupo alcoxi que tiene de 1 a 3 átomos de carbono o un grupo amino dialquilo inferior sustituido por un grupo alquilo que tiene de 1 a 3 átomos de carbono o $N(CH_3)C_2H_4CN$. A representa azufre, oxígeno o carbono que tiene un grupo alquilo inferior seleccionado de metilo y etilo. Además, m es 1 o 2 y n es 0 o 1.

La descripción anterior ha analizado la realización en la que el material de referencia como se desvela en el presente documento se aplica al analizador 1 para analizar componentes de partículas en urea que prepara la mezcla de medición A usada para medir los cuatro tipos de partículas, esto es, células sanguíneas blancas, células sanguíneas rojas, células epiteliales y células columnares y la mezcla de medición B usada para medir bacterias usando una parte de preparación de la muestra y lleva a cabo los procesos de medición; sin embargo, la presente invención no está destinada a limitarse por la realización anteriormente mencionada. El material de referencia como se desvela en el presente documento puede aplicarse a cualquier analizador mientras sea un analizador de partículas provisto de una parte de preparación de muestras que lleve a cabo un tratamiento de tinción por fluorescencia en las partículas en una muestra biológica y un detector de fluorescencia. Por ejemplo, el analizador de partículas de este tipo se prepara como un analizador en el que, en el analizador 1 para analizar componentes de partículas en la urea, no están instaladas las partes de preparación de muestras usadas para medir bacterias

(contenedores 20 y 21, bombas de jeringa 22 y 23 y una cámara de reacción 18), usándose una única parte de preparación de muestras (contenedores 24 y 25, bombas de jeringa 26 y 27 y una cámara de reacción 19) para preparar una muestra de medición usada para medir células sanguíneas blancas, células sanguíneas rojas, células epiteliales y células columnares.

5

El material de referencia como se desvela en el presente documento se aplica eficazmente como un material de referencia a usarse para procesos de control de calidad o procesos de calibrado en un analizador de partículas automático.

REIVINDICACIONES

1. Un método para juzgar la presencia de cualquier anomalía en una unidad de preparación de muestras de medición (11) y un detector de fluorescencia (52) en un analizador de partículas (1), donde dicha unidad de preparación de muestras de medición (11) es adecuada para preparar una muestra de medición mezclando una muestra biológica con un tinte de fluorescencia, donde dicho detector de fluorescencia (52) es adecuado para detectar fluorescencia en un analizador de partículas (1) y donde dicho analizador de partículas (1) comprende un detector de luz dispersada frontal (49), dicho método comprendiendo las etapas de:
- a) suministrar un material de referencia para la unidad de preparación de la muestra de medición (11); conteniendo dicho material de referencia las primeras y las segundas partículas de referencia; dichas primeras partículas siendo teñibles prácticamente de la misma manera que las partículas de medición en la muestra de medición; dichas segundas partículas preparándose preliminarmente de tal manera que contengan un tinte fluorescente y que no sean teñibles,
 - b) añadir un tinte de fluorescencia al material de referencia,
 - c) obtener las intensidades de fluorescencia y de luz dispersada frontal de las partículas en el material de referencia,
 - d) analizar las intensidades de fluorescencia y de luz dispersada frontal para obtener las primeras intensidades de fluorescencia de las primeras partículas de referencia y las segundas intensidades de fluorescencia de las segundas partículas de referencia
 - e) comparar la media de dichas primeras intensidades de fluorescencia con un intervalo predeterminado y comparar la media de dichas segundas intensidades de fluorescencia con un intervalo predeterminado, y
 - f) juzgar la presencia de cualquier anomalía en la unidad de preparación de la muestra de medición (11) y del detector de fluorescencia (52).
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una etapa de preparar la muestra de medición mezclando el primer tinte de fluorescencia con un material de referencia que contiene las primeras partículas de referencia y las segundas partículas de referencia, y detectándose la primera fluorescencia y la segunda fluorescencia a partir de las primeras partículas de referencia y de las segundas partículas de referencia contenidas en la muestra de medición.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente las etapas de:
- primero preparar la primera muestra de medición mezclando el primer tinte de fluorescencia con un primer material de referencia que contiene las primeras partículas de referencia; y
 - segundo preparar la segunda muestra de medición mezclando el primer tinte de fluorescencia con un segundo material de referencia que contiene las segundas partículas de referencia; y donde la etapa de detección detecta la primera fluorescencia de las primeras partículas de referencia contenidas en la primera muestra de medición y detecta la segunda fluorescencia de las segundas partículas de referencia contenidas en la segunda muestra de medición.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente las etapas de:
- primero comparar la primera fluorescencia con una primera condición; y
 - segundo comparar la segunda fluorescencia con una segunda condición; y
 - donde la etapa f) incluye juzgar la anomalía del detector de fluorescencia (52) basándose en el segundo resultado de comparación obtenido en la etapa e) y juzgar la anomalía en la unidad de preparación de la muestra (11) basándose en el primer resultado de comparación y el segundo resultado de comparación obtenido en la etapa e).
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el analizador de partículas (1) comprende un detector de luz dispersada (49) para detectar la luz dispersada de la muestra de medición, y la etapa f) comprende adicionalmente juzgar la anomalía del detector de luz dispersada (49) basándose en la primera luz dispersada y en la segunda luz dispersada.
6. Un analizador de partículas (1) que comprende:
- una unidad de preparación de muestras de medición (11) para preparar una muestra de medición mezclando un material de referencia que contiene las primeras partículas de referencia que pueden teñirse con fluorescencia por el tratamiento de tinción de fluorescencia y las segundas partículas de referencia que han contenido preliminarmente un tinte de fluorescencia con un primer tinte de fluorescencia;
 - una fuente de luz (47) para irradiar la muestra de medición con luz;
 - un detector de fluorescencia (52) para detectar la primera fluorescencia de las primeras partículas de referencia y

una segunda fluorescencia de las segundas partículas de fluorescencia, contenidas en la muestra de medición; un detector de luz dispersada frontal (49) para detectar la luz dispersada frontal; y una unidad de análisis (56) para juzgar una porción anormal en el analizador de partículas (1) basándose en la primera fluorescencia y en la segunda fluorescencia, **caracterizada por que** la porción anormal se detecta usando los métodos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

7. Un analizador de partículas (1) que comprende:

una unidad de preparación de muestras de medición (11) para preparar una primera muestra de medición mezclando un primer material de referencia que contiene las primeras partículas de referencia que pueden teñirse con fluorescencia por el tratamiento de tinción de fluorescencia con un primer tinte de fluorescencia y preparar una segunda muestra de medición a partir de un segundo material de referencia que contiene las segundas partículas de referencia que han contenido preliminarmente un segundo tinte de fluorescencia; una fuente de luz (47) para irradiar la primera y la segunda muestras de medición; un detector de fluorescencia (52) para detectar la primera fluorescencia de las primeras partículas de referencia contenidas en la primera muestra de referencia y una segunda fluorescencia de las segundas partículas de fluorescencia contenidas en la segunda muestra de medición; un detector de luz dispersada frontal (49) para detectar la luz dispersada frontal; y una unidad de análisis (56) para juzgar una porción anormal en el analizador de partículas basándose en la primera fluorescencia y en la segunda fluorescencia, **caracterizada por que** la porción anormal se detecta usando los métodos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

8. El analizador de partículas (1) de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, donde la unidad de análisis (56) obtiene un primer resultado de comparación comparando la primera fluorescencia con una primera condición y un segundo resultado de comparación comparando la segunda fluorescencia con una segunda condición, y juzga la anormalidad en el detector de fluorescencia (52) basándose en el segundo resultado de comparación y la anormalidad en la unidad de preparación de la muestra de medición (11) basándose en el primer resultado de comparación y en el segundo resultado de comparación.

9. El analizador de partículas (1) de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, donde el detector de luz dispersada (49) detecta la primera luz dispersada de las primeras partículas de referencia y una segunda luz dispersada de las segundas partículas de referencia, y la unidad de análisis (56) juzga la anormalidad en el detector de luz dispersada (49) basándose en la primera luz dispersada y en la segunda luz dispersada.

10. El analizador de partículas (1) de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, donde las segundas partículas realmente no se tiñen con el primer tinte de fluorescencia.

FIG. 1

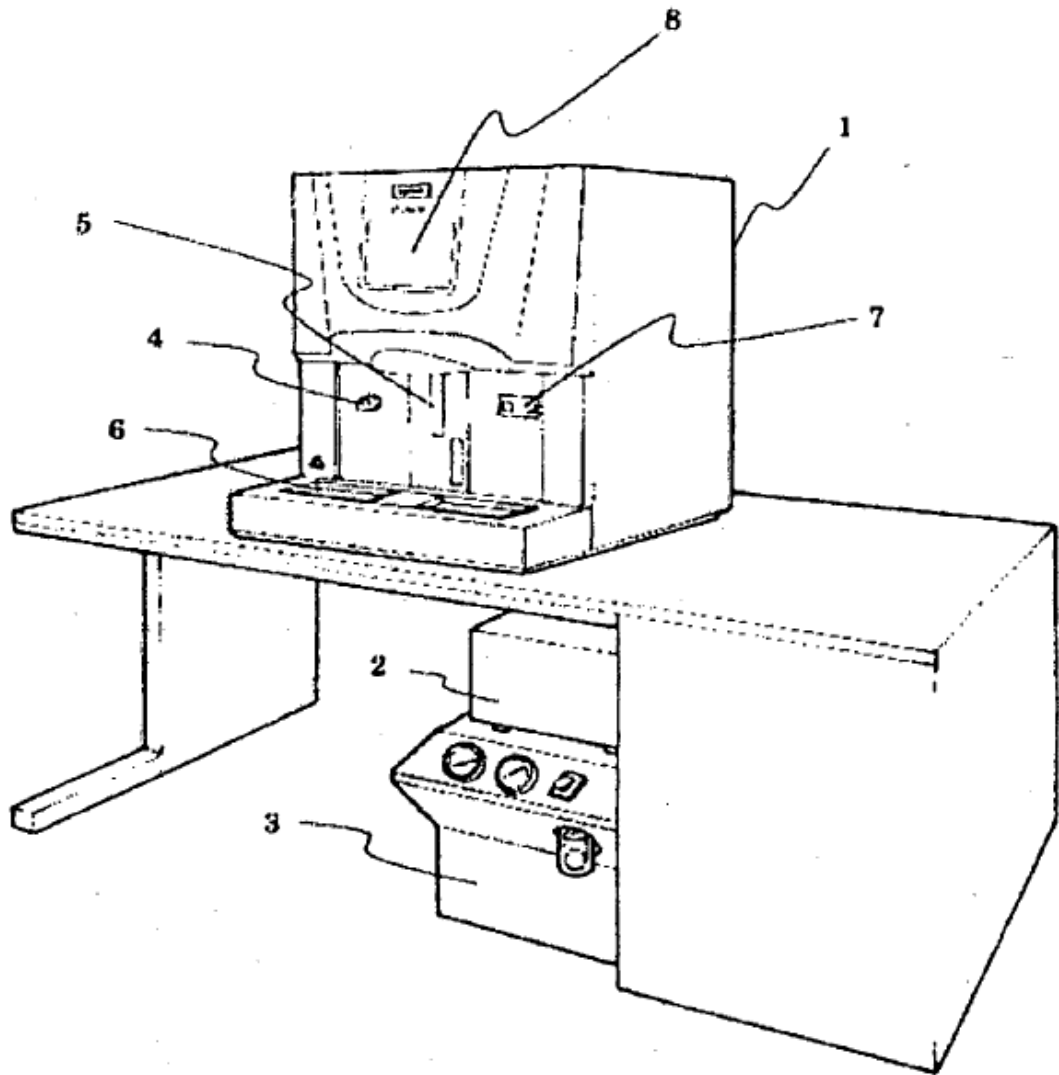


FIG. 2

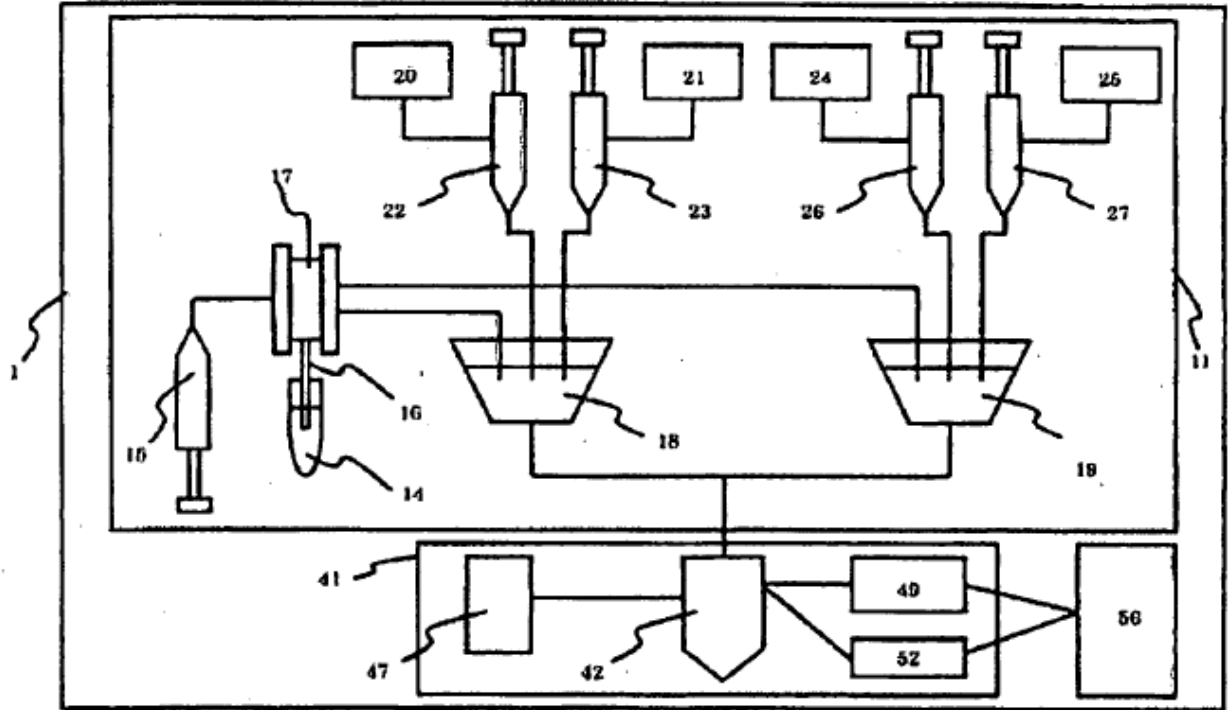


FIG. 3

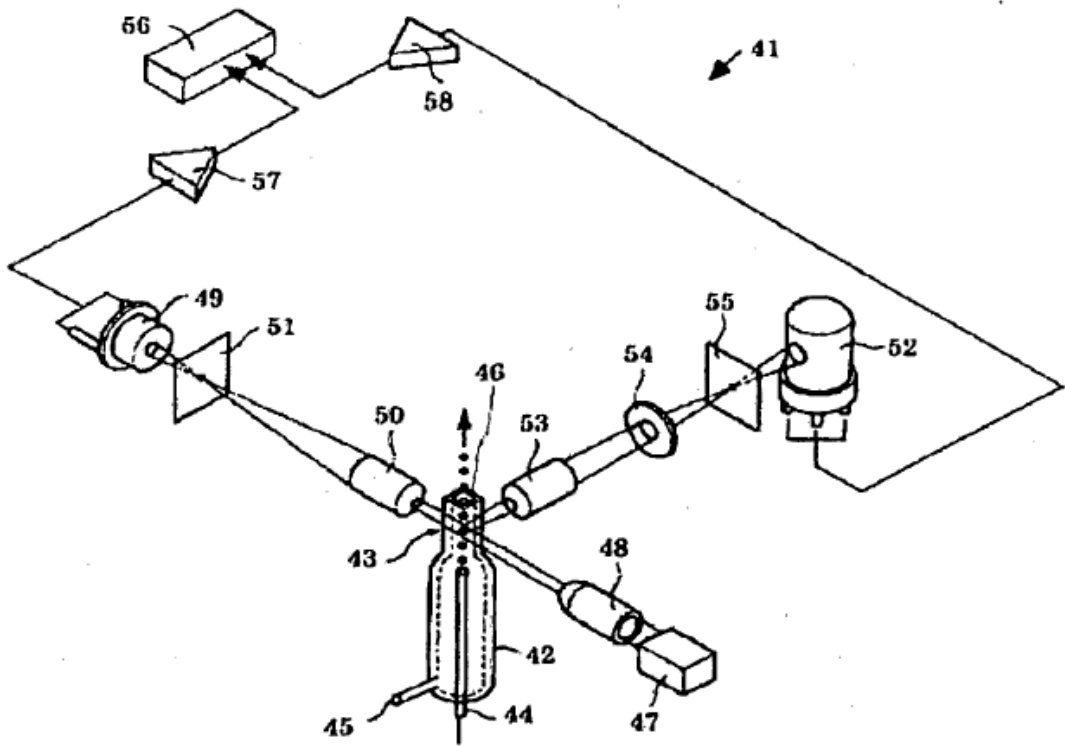


FIG. 4

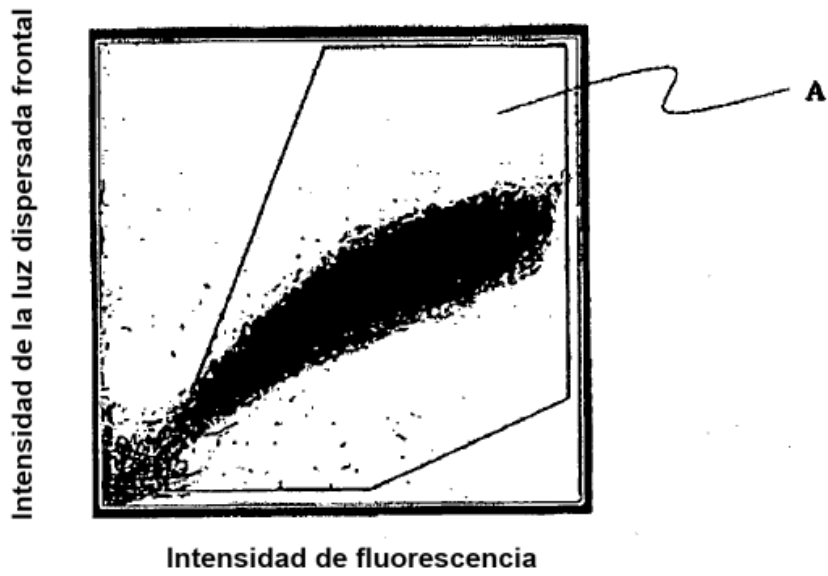


FIG. 5

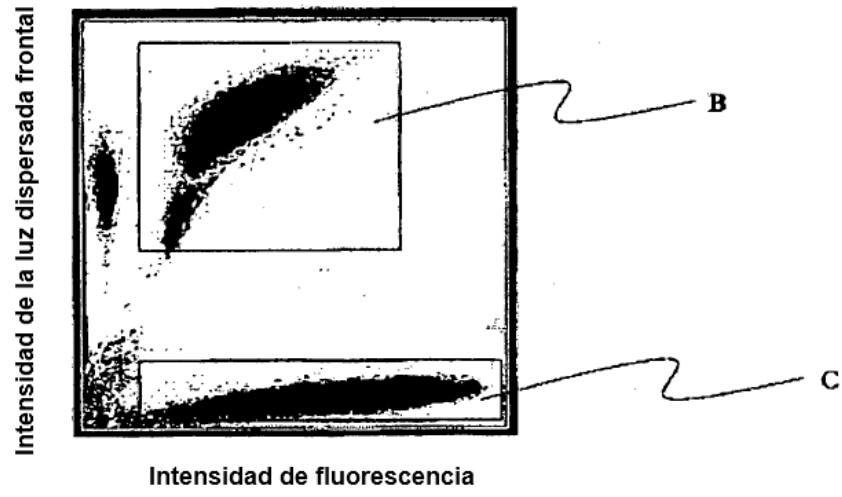


FIG. 6

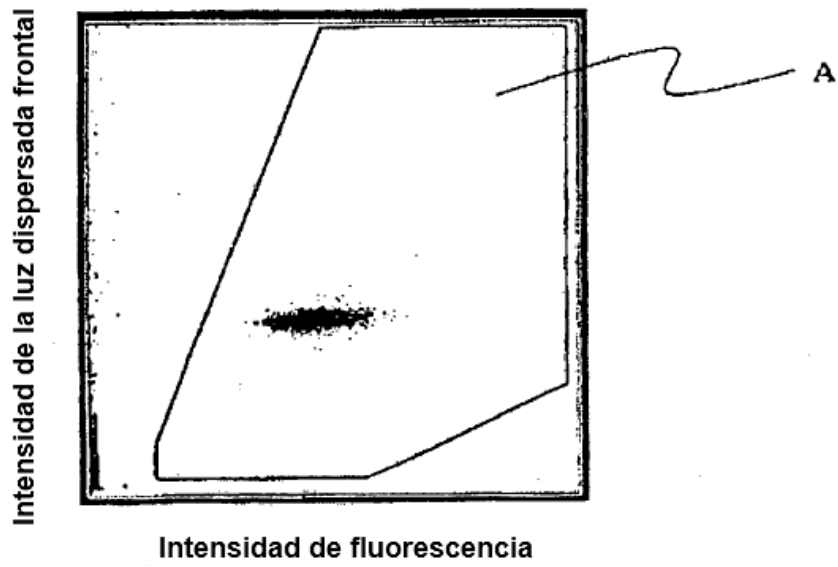


FIG. 7

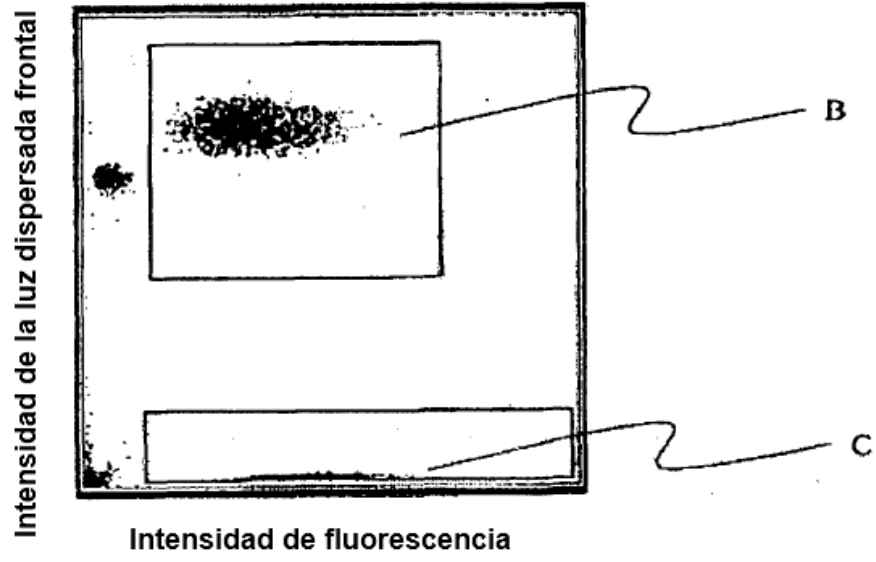


FIG. 8

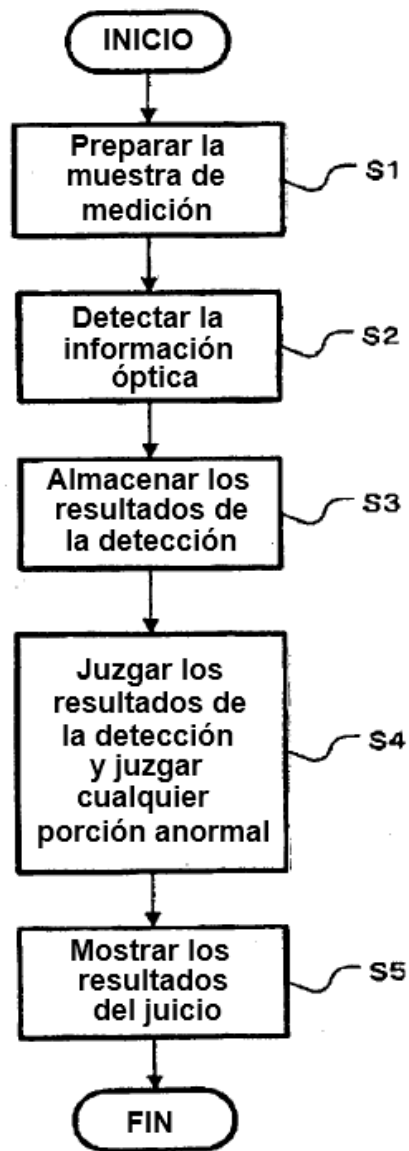


FIG. 9

