

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 700 498**

(51) Int. Cl.:

G01N 21/03 (2006.01)
G01N 21/05 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
G01N 21/17 (2006.01)
G02B 21/08 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)
G02B 21/12 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2013 PCT/US2013/052141**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.01.2014 WO14018805**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2013 E 13747735 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2877834**

(54) Título: **Sistema para el análisis de una muestra**

(30) Prioridad:

25.07.2012 US 201261675811 P
26.07.2012 US 201261676178 P
18.02.2013 US 201361766116 P
15.03.2013 US 201361802194 P

(73) Titular/es:

THERANOS IP COMPANY, LLC (100.0%)
7333 Gateway Boulevard
Newark, CA 94560, US

(72) Inventor/es:

PANGARKAR, CHINMAY;
MOHAN, KARAN y
WASSON, JAMES, R.

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 700 498 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

Sistema para el análisis de una muestra

Antecedentes

El análisis de muestras biológicas de un sujeto puede ser importante para el diagnóstico, seguimiento y/o tratamiento del sujeto relacionados con la salud. Se conocen una variedad de métodos para el análisis de muestras biológicas. Sin embargo, para proporcionar un mejor diagnóstico, seguimiento y/o tratamiento de los sujetos, se desean mejoras en el análisis de muestras biológicas.

El documento US 2001/028497 A1 describe un dispositivo de iluminación para microscopio para la visualización de un espécimen que se vaya a examinar enfocando la luz a través de una lente objetivo sobre el espécimen por medio de lo cual se proporciona un reflector localizado sobre el lado opuesto del espécimen para reflejar la luz transmitida por detrás del espécimen. El dispositivo proporciona una "trans-iluminación" de un espécimen, en particular una preparación biológica, en un microscopio definido por luz de una fuente que pasa a través del espécimen y una "epi-iluminación" definida por la microscopía de fluorescencia o reflexión con iluminación a través de la misma lente objetivo por la que se visualiza la preparación.

Compendio

Los métodos, dispositivos, sistemas, y aparatos descritos en la presente memoria son útiles para el análisis óptico y por imágenes y/o la medición de muestras biológicas.

En el texto subsiguiente, siempre que se utilice la expresión "aspecto", "realización" o "ejemplo, no se debe entender que es de acuerdo con la presente invención, excepto cuando se establezca explícitamente que es la invención de acuerdo con la presente solicitud.

Las realizaciones descritas en la presente memoria incluyen portamuestras adecuados para contener muestras, incluidas muestras biológicas, para examen óptico, para medición óptica, y para otros exámenes y mediciones. En realizaciones, se proporciona un portamuestras que tiene una parte ópticamente transmisora y una parte configurada para proporcionar reflexión interna de luz dentro del portamuestras. En realizaciones, las reflexiones internas pueden incluir una reflexión interna parcial y pueden incluir una reflexión interna total de la luz. La luz incidente de una fuente de luz externa, y dirigida desde un lado del portamuestras, es eficaz para iluminar una muestra dentro del portamuestras desde una pluralidad de direcciones. En realizaciones, una fuente de luz externa dispuesta en un lado del portamuestras puede proporcionar epi-iluminación de una muestra dentro del portamuestras; puede proporcionar trans-iluminación de una muestra dentro del portamuestras; y/o puede proporcionar tanto epi-iluminación como trans-iluminación de una muestra dentro del portamuestras.

Las realizaciones de la presente invención descritas en la presente memoria incluyen sistemas que incluyen portamuestras adecuados para contener muestras. Tales sistemas son adecuados para su uso en el examen y medición de muestras, incluyendo muestras biológicas, p. ej., mediante examen óptico, medición óptica y para otros exámenes y mediciones. En realizaciones de la presente invención, se proporciona un sistema descrito en la presente memoria que comprende un portamuestras que tiene una parte ópticamente transmisora y una parte configurada para proporcionar reflexión interna de luz dentro del portamuestras. En realizaciones de la presente invención, las reflexiones internas dentro de un portamuestras de un sistema descrito en la presente memoria pueden incluir una reflexión interna parcial y pueden incluir una reflexión interna total de la luz. Los sistemas descritos en la presente memoria pueden incluir fuentes de luz. La luz incidente de una fuente de luz externa a un portamuestras, y dirigida desde un lado del portamuestras, es eficaz para iluminar una muestra dentro del portamuestras desde una pluralidad de direcciones. En realizaciones, una fuente de luz dispuesta externa a, y en un lado de, el portamuestras puede proporcionar epi-iluminación de una muestra dentro del portamuestras; puede proporcionar trans-iluminación de una muestra dentro del portamuestras; y/o puede proporcionar tanto epi-iluminación como trans-iluminación de una muestra dentro del portamuestras. Los sistemas descritos en la presente memoria pueden incluir un detector, o varios detectores; tales detectores pueden incluir detectores ópticos, y pueden incluir otros detectores. Tales detectores son adecuados, y están configurados, para realizar mediciones de una muestra y de objetos y características de una muestra y objetos en una muestra dentro de un portamuestras; tales mediciones pueden incluir mediciones cualitativas y mediciones cuantitativas. Las realizaciones de los sistemas como se describen en la presente memoria pueden incluir filtros, aberturas, rejillas, lentes y otros elementos ópticos. Las realizaciones de los sistemas como se describen en la presente memoria pueden incluir aparatos mecánicos para ubicar, mover y ajustar un portamuestras, una fuente de luz, una lente, un filtro u otro elemento o componente de un sistema como se describe en la presente memoria. Las realizaciones de los sistemas como se describen en la presente memoria pueden incluir componentes y elementos para transferir, dividir en alícuotas, contener, calentar, mezclar, teñir, acondicionar o preparar, manipular o alterar de otra manera una muestra. Las realizaciones de los sistemas como se describen en la presente memoria pueden incluir componentes y elementos para transportar, asegurar, llenar o manipular de otro modo un portamuestras. Las realizaciones de los sistemas como se describen en la presente memoria pueden incluir componentes y elementos para la manipulación física y el tratamiento de una muestra, y para la manipulación física de un portamuestras, donde tales componentes y elementos pueden incluir,

sin limitación, una pipeta, una bomba, una centrífuga, otros aparatos mecánicos para mover y manipular una muestra, un portamuestras, puntas de pipeta, recipientes y reactivos para su uso con una muestra, o parte de ella. Las realizaciones de los sistemas como se describen en la presente memoria pueden incluir componentes y elementos para el análisis químico, incluidos el análisis de ácidos nucleicos, el análisis de proteínas, el análisis químico general, el análisis electroquímico y otros análisis de una muestra o parte de la misma.

5 Los portamuestras y los sistemas descritos en la presente memoria se pueden utilizar, y los métodos descritos en la presente memoria se pueden realizar en cualquier localización, incluyendo un laboratorio clínico, un laboratorio de investigación, una clínica, un hospital, un consultorio médico, un punto de servicio, y cualquier otro lugar adecuado. Las muestras contenidas en los portamuestras descritos en la presente memoria, y las muestras examinadas 10 utilizando los sistemas y métodos descritos en la presente memoria, incluyen cualquier muestra biológica, y pueden ser pequeñas muestras biológicas. En realizaciones, una muestra puede ser una pequeña muestra de sangre u orina, y puede tener un volumen de menos de aproximadamente 250 µL, o menos de aproximadamente 150 µL, o menos de aproximadamente 100 µL, o menos de aproximadamente 50 µL, o menos de aproximadamente 25 µL, o menos de aproximadamente 15 µL, o puede ser igual o menor que el volumen de sangre obtenida de la yema de un dedo.

15 En una realización, se proporciona un método para la medición de un componente de interés en células de una población celular en una muestra, que incluye: a) obtener una medición cuantitativa de un marcador presente en células de la población celular en la muestra; b) basándose en la medición de la parte a), determinar, con la ayuda de un ordenador, una cantidad aproximada de células en la población celular presente en la muestra; c) basándose 20 en los resultados de la parte b), seleccionar una cantidad de reactivo para añadir a la muestra, en donde el reactivo se une específicamente al componente de interés en las células de la población celular y está configurado para ser fácilmente detectable; d) basándose en los resultados de la parte c), añadir la cantidad seleccionada del reactivo a la muestra; e) analizar las células en la muestra para el reactivo unido al componente de interés; y f) basándose en la 25 cantidad de reactivo unido al componente de interés, determinar la cantidad del componente de interés en las células de la población celular de la muestra. En una realización del método, el reactivo de la parte c) es un anticuerpo.

30 Los autores de la presente solicitud describen adicionalmente en la presente memoria un método para la medición de un componente de interés en células de una población celular en una muestra, que comprende: a) obtener una medición cuantitativa de un marcador presente en células, o de una propiedad de las células, de la población celular en la muestra; b) determinar, con la ayuda de un ordenador, una cantidad aproximada de células en la población 35 celular presente en la muestra basándose en la medición de la parte a); c) añadir una cantidad de un marcador celular a la muestra, donde la cantidad de dicho marcador celular añadido se basa en los resultados de la parte b), y en donde el marcador celular se une específicamente al componente de interés en las células de la población celular y está configurado para ser fácilmente detectable; d) someter a ensayo las células de la muestra para determinar el marcador unido al componente de interés; y e) determinar la cantidad del componente de interés en las células de la población celular de la muestra basándose en la cantidad de marcador unido al componente de interés.

40 En otra realización, se proporciona un método para enfocar un microscopio, que incluye: a) mezclar una muestra que contiene un objeto para el análisis microscópico con una partícula de referencia que tiene un tamaño conocido, para generar una mezcla que contenga la muestra y la partícula de referencia; b) ubicar la mezcla de la etapa a) en una trayectoria de luz de un microscopio; c) exponer la mezcla de la etapa a) a un haz de luz configurado para visualizar la partícula de referencia; y d) enfocar el microscopio basándose en la posición de la partícula de referencia dentro de la mezcla, o basándose en la nitidez de la imagen de la partícula de referencia.

45 En otra realización más, se proporciona en la presente memoria un método para identificar una célula en una muestra que contiene una pluralidad de células, que incluye: a) someter a ensayo una célula de la pluralidad de células para determinar al menos una de: (i) la presencia de un antígeno de superficie celular; (ii) la cantidad de un antígeno de superficie celular; o (iii) el tamaño de una célula; b) someter a ensayo la célula de a) para determinar al menos uno de: (i) el tamaño nuclear; o (ii) la forma nuclear; y c) someter a ensayo la célula de a) y b) para 50 determinar la dispersión cuantitativa de la luz por la célula, en donde la combinación de la información de las etapas a), b) y c) se utiliza para identificar la célula en la muestra que contiene una pluralidad de células.

55 En otra realización más, se proporciona en la presente memoria un sistema que comprende un conjunto detector para su utilización con un portamuestras que contiene una muestra que se va a examinar. En un ejemplo no limitante, el portamuestras es una cubeta que tiene características y/o materiales en ella que permiten que la cubeta se conecte y se mueva desde una localización al conjunto detector. En algunas realizaciones, el conjunto detector tiene una primera superficie que está configurada para conectar con una superficie del portamuestras de una manera tal que la interfaz entre los dos no cree una interferencia óptica en la trayectoria óptica desde el conjunto detector hasta la muestra en el portamuestras. En una realización, puede haber más de una localización en el conjunto detector para uno o más de los portamuestras. Algunas realizaciones pueden tener el mismo portamuestras para cada una de las ubicaciones. Opcionalmente, algunas realizaciones pueden tener diferentes portamuestras para al menos algunas de las ubicaciones asociadas con el conjunto detector.

60 En una realización descrita en la presente memoria, se proporciona un portamuestras en la presente memoria tal

como, pero no limitado a, una cubeta con propiedades ópticas, dimensiones, materiales y/o características físicas que le permiten mantener la muestra para su análisis por el conjunto detector a la vez que la mantiene físicamente separada y sin contacto directo con el conjunto detector. Esto puede ser particularmente útil para muestras de fluidos que contienen miembros conformados en ellas.

- 5 En una realización descrita en la presente memoria, el conjunto detector puede ser una unidad de microscopía multicanal que está configurada para detectar, obtener o medir la forma, y las propiedades físicas, ópticas y bioquímicas de una célula o células en una muestra, todo en el mismo dispositivo. Puede proporcionar tanto información cuantitativa como información descriptiva. Una realización del conjunto detector puede utilizar múltiples marcadores del mismo color o longitud de onda, donde el conjunto detector está configurado para desconvolucionar 10 las señales que se originan a partir de dichos marcadores en una muestra (p. ej., unida a las células de una muestra), lo que permite una reducción en el número de canales espectrales y fuentes de luz requeridos en el conjunto.

Se debe entender que algunas realizaciones en la presente memoria pueden incluir un portamuestras tal como, pero no limitado a, una cubeta con características físicas en la forma del material de la cubeta que aumentan la iluminación de campo oscuro donde algunas características están configuradas para proporcionar reflectancia de la 15 luz (incluyendo, pero no limitada a, reflectancia de la luz dentro de la cubeta), y algunas características se pueden configurar opcionalmente para el soporte mecánico; en realizaciones, algunas características pueden proporcionar soporte mecánico y también proporcionar reflectancia de la luz. En realizaciones, un portamuestras está configurado para proporcionar trans-iluminación de una muestra por reflexión de luz dentro del portamuestras. En realizaciones, 20 un portamuestras está configurado para proporcionar trans-iluminación de una muestra por reflexión de luz dentro del portamuestras; semejante reflectancia puede incluir una reflexión interna parcial (PIR), y semejante reflectancia puede incluir una reflectancia interna total (TIR). En realizaciones, un portamuestras está configurado para proporcionar una trans-iluminación de una muestra mediante reflexión de la luz dentro del portamuestras, en donde la fuente de la luz reflejada está dispuesta en el mismo lado del portamuestras que la óptica utilizada para detectar o 25 medir la luz (es decir, la fuente de luz es una fuente de luz de epi-iluminación).

El sistema de la presente invención en la presente memoria puede utilizar simultáneamente tanto epi (directa) como trans (reflejada) iluminación en la obtención de imágenes del campo oscuro. Esto difiere de la obtención de imágenes de campo oscuro tradicional que utiliza o bien epi-iluminación, o bien trans-iluminación, pero no ambos tipos de iluminación, y no ambos tipos de iluminación de una sola fuente o una sola dirección o localización. De este modo, la combinación de epi- y trans-iluminación descrita en la presente memoria, en donde la trans-iluminación se origina a partir de la misma fuente de luz que la epi-iluminación, difiere de los sistemas conocidos. La fuente de luz de campo oscuro puede ser un diodo emisor de luz (LED), láser, u otra fuente de iluminación que pueda proporcionar la iluminación y/o las longitudes de onda de iluminación y/o excitación deseadas.

35 En una realización, la combinación del objetivo del microscopio y la fuente de luz tal como, pero no limitada a, una luz anular (para microscopía de campo oscuro) está a una distancia física entre ellos que permite un tamaño compacto para el conjunto detector. En una realización, solo se dirige a la muestra la luz a una longitud de onda deseada o dentro de un intervalo deseado de longitudes de onda. En una realización, la luz es luz no polarizada. En otra realización, la luz es luz polarizada.

40 En otra realización más, la información del ensayo de citometría, de la fase de preparación de la muestra y/o de la fase de análisis, se utiliza para guiar y/o desencadenar un procedimiento secundario. En realizaciones, tal procedimiento secundario puede consistir en proporcionar una alerta para la revisión humana directa. En realizaciones, semejante procedimiento secundario de este tipo puede consistir en utilizar un recuento celular estimado u otra información obtenida durante una etapa de preparación de la muestra de un procedimiento para 45 guiar la ejecución de un ensayo, donde semejante ensayo puede ser un ensayo en una etapa posterior del procedimiento, o puede ser un ensayo en otro procedimiento.

50 Las técnicas para contar células también pueden proporcionar maneras de tratar los portamuestras con formas irregulares y/o las superficies de la cámara. Un método comprende el uso de: a) una técnica de canal medido por volumen para introducir un volumen conocido de una muestra en una zona de análisis, tal como un canal en el portamuestras. El método puede incluir el recuento de todas las células en el portamuestras. Dado que se conoce el volumen de la muestra, también se conoce la concentración de las células en volumen (esto puede realizarse en recipientes o cubetas hidrófobos o portamuestras con cámaras con tales superficies). Otro método comprende: b) una técnica métrica basada en la proporción para mezclar la muestra con una cantidad conocida de cuentas, que se utiliza para calcular la concentración de células en la muestra en función del número de cuentas observadas.

55 En otra realización más descrita en la presente memoria, se proporciona un método que comprende medir los componentes sanguíneos formados, tales como, pero no limitados a, la medición del volumen de glóbulos rojos (GR) en una muestra de sangre al hacer que los GR adquieran formas sustancialmente esféricas y la medición del volumen de GR utilizando microscopía de campo oscuro.

En otra realización más descrita en la presente memoria, se proporciona un método que comprende medir el volumen de plaquetas. El método puede incluir el marcaje de las plaquetas con un colorante fluorescente y la

medición del tamaño de las plaquetas observadas; añadiendo cuentas de tamaño conocido a la muestra; y la comparación del tamaño observado de las imágenes de las cuentas con las imágenes observadas de las plaquetas, utilizando las cuentas como calibración para determinar el tamaño de las plaquetas y para determinar el volumen de plaquetas en la muestra.

5 En otras realizaciones adicionales descritas en la presente memoria, se proporcionan métodos para detectar y medir, en una muestra, la morfología celular; la medición del número de células; la detección de partículas; la medición del número de partículas; la detección de cristales; la medición del número de cristales; la detección de los agregados celulares; la medición del número de agregados celulares; y otras propiedades y cantidades de o en una muestra.

10 Por consiguiente, los autores de la presente solicitud describen en la presente memoria:

Un sistema para analizar una muestra, comprendiendo el sistema: un portamuestras que comprende una cámara de muestra configurada para contener dicha muestra, comprendiendo al menos una parte de dicho portamuestras que comprende un material ópticamente transmisor, comprendiendo dicho material ópticamente transmisor una superficie ópticamente transmisora y una superficie reflectante; y una fuente de iluminación configurada para proporcionar luz que ilumina y pasa a través de dicha superficie ópticamente transmisora; en donde dicho portamuestras está configurado de manera efectiva para que dicha luz de dicha fuente de iluminación proporcione simultáneamente tanto epi-iluminación como trans-iluminación a una muestra en el portamuestras, donde la epi-iluminación comprende luz que se desplaza desde dicha fuente de iluminación a dicha muestra sin reflexión en una superficie del material ópticamente transmisor del portamuestras, y donde la trans-iluminación comprende luz que se desplaza dentro del material ópticamente transmisor y hacia la muestra después de al menos una reflexión desde al menos una superficie de dicho material ópticamente transmisor. En realizaciones, un portamuestras de un sistema que tiene las características descritas en la presente memoria puede comprender una cubeta que tiene un canal alargado configurado para contener una muestra. En realizaciones, el portamuestras puede tener una o más superficies ópticamente no transmisoras.

25 En las realizaciones de los sistemas de la invención descritos en la presente memoria, dicha trans-iluminación se puede proporcionar al menos en parte mediante la reflexión interna de luz en una superficie, y se puede proporcionar al menos en parte mediante la reflexión interna total de la luz dentro de la cubeta. En realizaciones de sistemas descritos en la presente memoria, dicha trans-iluminación se puede proporcionar al menos en parte mediante una reflexión interna parcial en una superficie, y se puede proporcionar al menos en parte mediante la reflexión interna parcial de la luz dentro de la cubeta.

30 En realizaciones, un portamuestras puede tener dos o más cámaras de muestra para contener la muestra. Un portamuestras, por ejemplo, una cubeta, que tiene una característica descrita en la presente memoria puede tener una forma de sección transversal horizontal rectangular; puede tener una forma de sección transversal horizontal circular; puede tener una forma de sección transversal vertical de diente de sierra; puede tener una forma de sección transversal vertical en forma de escalón; o puede tener otra forma.

35 En realizaciones, un portamuestras puede ser móvil con relación a una fuente de iluminación, y se puede mover a una pluralidad de ubicaciones, en donde una superficie ópticamente transmisora del portamuestras puede ser iluminada por la fuente de iluminación en cada localización.

40 En realizaciones, una fuente de iluminación puede incluir una luz anular. En realizaciones, la luz anular se puede seleccionar entre una luz anular basada en diodos emisores de luz (LED) y una luz anular basada en láser.

En las realizaciones, un sistema como se describe en la presente memoria puede incluir una estructura de soporte que tiene una superficie ópticamente transmisora conformada para captar una superficie ópticamente transmisora del portamuestras.

45 En realizaciones, un sistema como se describe en la presente memoria puede tener un dispositivo de compresión configurado para retener el portamuestras en una localización deseada para la iluminación por la fuente de iluminación.

En realizaciones, un sistema como se describe en la presente memoria puede incluir un detector configurado para obtener imágenes de al menos una parte de un canal en el portamuestras.

50 En realizaciones, un portamuestras como se describe en la presente memoria puede incluir un canal alargado configurado para contener al menos una porción de la muestra, y en donde un detector está configurado para obtener imágenes de un canal alargado completo en el portamuestras.

En realizaciones, un portamuestras como se describe en la presente memoria se puede configurar para mantener la muestra de manera estática, sin flujo durante la formación de imágenes; en realizaciones, un portamuestras se puede configurar para contener una porción de la muestra de una manera estática, sin flujo y otra porción con flujo.

55 En realizaciones, una fuente de iluminación como se describe en la presente memoria puede ser móvil con respecto

al portamuestras.

En realizaciones, un portamuestras como se describe en la presente memoria se puede configurar para mantener la muestra de una manera con flujo durante la formación de imágenes.

En realizaciones, un portamuestras como se describe en la presente memoria puede incluir un circuito de fluido completamente confinado en el portamuestras, y en donde la muestra está localizada en dicho circuito de fluido, eficaz para que la muestra permanezca separada de dicho detector.

En realizaciones, un portamuestras como se describe en la presente memoria es móvil con respecto al detector. En realizaciones, el detector como se describe en la presente memoria es móvil con respecto al portamuestras.

10 En realizaciones, un portamuestras y una fuente de iluminación como se describe en la presente memoria comprenden al menos parte de una unidad de análisis óptico, y el sistema incluye adicionalmente una unidad de análisis clínico configurada para realizar análisis clínicos en una muestra.

15 En las realizaciones, un sistema como se describe en la presente memoria está configurado para proporcionar una alícuota de una muestra única a una unidad de análisis óptico y a una unidad de análisis clínico, eficaz para que la unidad de análisis clínico y la unidad de análisis óptico puedan realizar un análisis óptico y análisis clínico en porciones de una muestra al mismo tiempo. En realizaciones, tal análisis clínico se puede seleccionar entre análisis químico general, análisis de ácidos nucleicos y análisis de unión ligada a enzimas.

20 En realizaciones, un sistema como se describe en la presente memoria puede incluir una pluralidad de unidades de análisis clínico, en donde cada una de tales unidades de análisis clínico está configurada para proporcionar un análisis clínico seleccionado entre análisis químico general, análisis de ácido nucleico y análisis de unión ligada a enzimas.

25 Los autores de la presente solicitud proporcionan adicionalmente una cubeta que comprende una cámara de muestra configurada para contener una muestra, comprendiendo al menos una porción de dicha cubeta un material ópticamente transmisor, comprendiendo dicho material ópticamente transmisor una superficie ópticamente transmisora y una superficie reflectante, en donde dicha superficie ópticamente transmisora y dicha superficie reflectante están configuradas de manera eficaz, para que la luz que pasa a través de la superficie ópticamente transmisora proporcione simultáneamente tanto epi-iluminación como trans-iluminación a dicha muestra en la cámara de muestras, donde la epi-iluminación comprende luz que se desplaza desde dicha fuente de iluminación a la muestra sin reflexión en una superficie del material ópticamente transmisor, y donde la trans-iluminación comprende luz que se desplaza dentro del material ópticamente transmisor y hacia la muestra después de al menos una reflexión desde al menos una superficie de dicho material ópticamente transmisor.

30 En realizaciones, una cubeta como se describe en la presente memoria tiene una cámara de muestra que comprende un canal alargado. En realizaciones, una cubeta como se describe en la presente memoria comprende dos o más cámaras de muestra para contener muestras.

35 En realizaciones, una cubeta como se describe en la presente memoria puede tener una o más superficies ópticamente no transmisoras.

40 En realizaciones, se puede proporcionar trans-iluminación en una cubeta como se describe en la presente memoria, al menos en parte mediante la reflexión interna de la luz dentro de la cubeta. En realizaciones, se puede proporcionar trans-iluminación en una cubeta como se describe en la presente memoria, al menos en parte mediante una reflexión interna parcial de la luz en una superficie de la cubeta. En realizaciones, se puede proporcionar trans-iluminación en una cubeta como se describe en la presente memoria, al menos en parte mediante la reflexión interna total de la luz en una superficie de la cubeta.

45 En realizaciones, una cubeta como se describe en la presente memoria puede tener una forma de sección transversal horizontal rectangular; en realizaciones, una cubeta como se describe en la presente memoria puede tener una forma de sección transversal horizontal circular. En realizaciones, una cubeta como se describe en la presente memoria puede tener una forma de sección transversal vertical de diente de sierra; en realizaciones, una cubeta como se describe en la presente memoria puede tener una forma de sección transversal vertical en forma de escalón.

50 Los autores de la presente solicitud describen métodos en la presente memoria. Por ejemplo, los autores de la presente solicitud describen en la presente memoria un método para identificar una célula en una muestra que contiene una pluralidad de células, que comprende: (a) colocar dicha muestra en un portamuestras que comprende una cámara de muestra configurada para contener la muestra, comprendiendo al menos una porción de dicho portamuestras un material ópticamente transmisor, comprendiendo dicho material ópticamente transmisor una superficie ópticamente transmisora y una superficie reflectante, en donde dicha superficie ópticamente transmisora y dicha superficie reflectante están configuradas de manera eficaz para que la luz que pasa a través de la superficie ópticamente transmisora proporciona simultáneamente epi-iluminación y trans-iluminación a la muestra en la cámara de muestras, donde la epi-iluminación comprende luz que se desplaza desde dicha fuente de iluminación a la

- 5 muestra sin reflexión en una superficie del material ópticamente transmisor, y donde la trans-iluminación comprende luz que se desplaza dentro del material ópticamente transmisor y a la muestra después de al menos una reflexión de al menos una superficie de dicho material ópticamente transmisor; (b) iluminar dicho portamuestras de manera eficaz para proporcionar simultáneamente tanto epi-iluminación como trans-iluminación de la muestra; y (c) identificar una célula en la muestra. En realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria incluyen métodos en donde dicha identificación comprende la identificación de dicha célula con un detector configurado para la obtención de imágenes de al menos una porción de dicha cámara de muestra. En realizaciones descritas en la presente memoria, una cámara de muestra para su uso en tales métodos puede comprender un canal alargado.
- 10 Los autores de la presente solicitud describen adicionalmente en la presente memoria un método para enfocar un microscopio, que comprende: a) mezclar una muestra que contiene un objeto para su análisis microscópico con una partícula de referencia que tiene un tamaño conocido, eficaz para generar una mezcla que contiene la muestra y la partícula de referencia; b) posicionar la mezcla de la etapa a) en una trayectoria de luz de un microscopio; c) exponer la mezcla de la etapa a) a un haz de luz configurado para visualizar la partícula de referencia; y d) enfocar el microscopio en función de la posición de la partícula de referencia dentro de la mezcla o en función de la nitidez de una imagen de la partícula de referencia.
- 15 Los autores de la presente solicitud describen en la presente memoria un método para identificar una célula en una muestra que contiene una pluralidad de células, que comprende: (a) analizar una célula de la pluralidad de células para determinar al menos uno de: (i) la presencia de un antígeno de superficie celular; (ii) la cantidad de un antígeno de superficie celular; o (iii) el tamaño de célula; (b) analizar la célula de (a) para determinar al menos uno de: (i) el tamaño nuclear; o (ii) la forma nuclear; y (c) analizar la célula de (a) y (b) para determinar la dispersión cuantitativa de la luz por la célula, en donde la combinación de información de las etapas (a), (b) y (c) se utiliza para identificar la célula en la muestra que contiene una pluralidad de células.
- 20 En al menos una realización descrita en la presente memoria, se describe un sistema para la obtención de imágenes de una muestra, comprendiendo el sistema: un recipiente de la muestra que contiene dicha muestra, una plataforma que tiene un receptor del recipiente de la muestra con una superficie ópticamente transparente; una fuente de luz para iluminar los componentes formados en la muestra a lo largo de la plataforma, en donde el recipiente de la muestra tiene una superficie de interfase configurada para acoplar la superficie ópticamente transparente del receptor del recipiente de la muestra por medio de lo cual la superficie de la interfase se ajusta a la superficie ópticamente transparente sin una distorsión significativa de la luz que pasa a través de la superficie de la interfase.
- 25 30 Se debe entender que las realizaciones de la presente memoria se pueden configurar para incluir una o más de las siguientes características. Por ejemplo, la superficie de la interfase del recipiente de la muestra puede estar formada a partir de un material polimérico. Opcionalmente, este puede ser un material transparente. Opcionalmente, la superficie de la interfase del recipiente de la muestra está formada por un material más blando que el material utilizado para formar la superficie ópticamente transparente del receptor del recipiente de la muestra.
- 35 40 Opcionalmente, se proporciona una unidad de compresión para aplicar presión para ajustar la superficie de la interfase a una forma configurada para ajustarse a la superficie ópticamente transparente del receptor del recipiente de la muestra. Opcionalmente, se puede configurar una unidad de manejo para que se acople al recipiente de la muestra para facilitar el transporte del recipiente de la muestra dentro y fuera de la plataforma, y aumentar la rigidez mecánica del recipiente de muestra. Opcionalmente, la unidad de manejo puede ser una unidad ópticamente opaca configurada para acoplarse al recipiente de la muestra. Opcionalmente, la unidad de manejo se puede formar con características físicas, protuberancias o similares para facilitar el acoplamiento con un manipulador robótico, una unidad de pipeta u otro motor mecánico. Opcionalmente, la unidad de manejo puede estar formada con características magnéticas, electromagnéticas u otras características para facilitar el acoplamiento y/o desacoplamiento. Opcionalmente, todas las imágenes de la muestra se pueden obtener sin paso de luz en una línea sustancialmente recta a través de una superficie y fuera de una superficie opuesta a un detector. Opcionalmente, la fuente de luz no está localizada a un lado del recipiente de la muestra para suministrar la luz a un detector en un lado opuesto del recipiente de la muestra.
- 45 Se debe entender que las realizaciones de esta descripción se pueden adaptar para que tengan una o más de las características descritas en esta descripción.
- 50 55 Este Compendio se proporciona para introducir una selección de conceptos en una forma simplificada que se describen con más detalle a continuación en la Descripción Detallada. No se pretende que este Compendio identifique las características clave o características esenciales de la materia reivindicada, ni se pretende utilizarlo para limitar el alcance de la materia reivindicada.
- Breve descripción de los dibujos**
- La Figura 1 muestra: (A) una gráfica de la intensidad de dispersión lateral (eje x) frente a la intensidad de fluorescencia de una mezcla de células que incluyen células asesinas naturales y neutrófilos marcados con un aglutinante fluorescente que reconoce CD16; (B) un gráfico de barras que muestra la razón del área nuclear con respecto al área celular total de las células asesinas naturales ("NK") y los neutrófilos ("Neu"); (C) células asesinas naturales teñidas con anticuerpo anti-CD16 (columna izquierda) y una tinción nuclear (columna derecha); (D)

- neutrófilos teñidos con anticuerpo anti-CD16 (columna izquierda) y una tinción nuclear (columna derecha).
- La Figura 2 muestra: (A) plaquetas marcadas con anticuerpos para CD41 y CD61 conjugados fluorescentemente (puntos brillantes); (B) distribución de la intensidad de las imágenes de plaquetas marcadas fluorescentemente con un aumento 10X (izquierda) y 20X (derecha); (C) distribución de intensidad de una imagen de una plaqueta marcada fluorescentemente que muestra la intensidad medida (gris claro) y el ajuste de la curva a la intensidad medida (gris oscuro).
- La Figura 3 muestra: una gráfica de la curva que muestra la relación entre el diámetro nominal de las partículas patrón en μm (eje x) y la medida del tamaño basada en la intensidad de fluorescencia en u.a. (eje y). La figura también muestra cuentas representativas en diferentes puntos a lo largo de la curva.
- La Figura 4 muestra: glóbulos rojos esféricos obtenidos mediante microscopía de campo oscuro en cubetas que permiten (A) solo epi-iluminación, y (B) una mezcla de epi- y trans-iluminación.
- La Figura 5 muestra: (A) supuestos neutrófilos en banda teñidos con anticuerpo anti-CD16 y una tinción nuclear; (B) supuestos neutrófilos segmentados teñidos con anticuerpo anti-CD16 y una tinción nuclear.
- La Figura 6A muestra una realización de un sistema óptico adecuado como parte del dispositivo o sistema como se describe en la presente memoria, y adecuado para su uso en los métodos descritos en la presente memoria, que incluyen una óptica ilustrativa (p. ej., una fuente de luz mostrada como luz anular y un objetivo), una cubeta y una estructura de soporte configurada para sostener y posicionar una cubeta para la obtención de imágenes. En esta realización, la cubeta tiene una forma de sección transversal horizontal rectangular.
- La Figura 6B muestra una realización de un sistema óptico adecuado como parte del dispositivo o sistema como se describe en la presente memoria, y adecuado para su uso en los métodos descritos en la presente memoria, incluyendo una óptica ilustrativa (p. ej., una fuente de luz mostrada como una luz anular, y un objetivo), una cubeta y una estructura de soporte configurada para sostener y posicionar una cubeta para obtención de imágenes. En esta realización, la cubeta tiene una forma de sección transversal circular horizontal.
- La Figura 7A muestra realizaciones de elementos de un sistema óptico de acuerdo la presente invención, adecuado para su uso en un dispositivo o sistema como se describen en la presente memoria, y adecuados para su uso en los métodos descritos en la presente memoria.
- La Figura 7B muestra realizaciones de elementos de un sistema óptico de acuerdo con la presente invención adecuado para su uso en un dispositivo o sistema como se describe en la presente memoria, y adecuado para su uso en métodos descritos en la presente memoria, que comprende una lente adicional y una abertura adecuada para limitar el intervalo de ángulos de luz dispersada que llega a un detector.
- La Figura 8A proporciona una vista de una realización de un sistema óptico de acuerdo con la presente invención que incluye una estructura de soporte para sostener una cubeta para obtener imágenes de una muestra, en la que la luz de un sistema de iluminación anular cae directamente sobre la muestra (epi-iluminación), y la luz también se refleja a partir de las características de la cubeta para proporcionar también trans-iluminación. En esta realización, la cubeta tiene una forma de sección transversal vertical en forma de escalón.
- La Figura 8B proporciona una vista de una realización de un sistema óptico de acuerdo con la presente invención que incluye una estructura de soporte para sostener una cubeta para obtener imágenes de una muestra, en la que la luz de un sistema de iluminación de luz anular cae directamente sobre la muestra (epi-iluminación), y la luz también se refleja a partir de las características de la cubeta para proporcionar también trans-iluminación. Como se muestra, la luz incidente se puede reflejar completamente en una superficie (reflexión interna total, TIR) o se puede reflejar solo una porción de la luz incidente en una superficie (reflexión interna parcial, PIR). En esta realización, la cubeta tiene una forma de sección transversal vertical de diente de sierra.
- La Figura 8C muestra una realización de un sistema óptico de acuerdo con la presente invención adecuado como parte del dispositivo o sistema como se describe en la presente memoria, y adecuado para su uso en los métodos descritos en la presente memoria, incluyendo una óptica ilustrativa (p. ej., una fuente de luz mostrada como una luz anular, y un objetivo), una cubeta y una estructura de soporte configurada para sostener y posicionar una cubeta para la obtención de imágenes. En esta realización, la cubeta incluye características que afectan a la trayectoria de la luz que ilumina la cubeta y la muestra dentro de la cubeta.
- La Figura 8D muestra una realización de un sistema óptico de acuerdo con la presente invención adecuado como parte del dispositivo o sistema como se describe en la presente memoria, y adecuado para su uso en los métodos descritos en la presente memoria, incluyendo una óptica ilustrativa (p. ej., una fuente de luz que dirige la luz desde una dirección transversal), una cubeta, y una estructura de soporte configurada para sostener y posicionar una cubeta para la obtención de imágenes. En esta realización, la cubeta incluye características que afectan a la trayectoria de la luz que ilumina la cubeta y la muestra dentro de la cubeta.
- La Figura 8E proporciona una representación esquemática del transporte de una cubeta desde una localización de

preparación de la muestra a una localización de observación de la muestra cerca de un detector óptico (marcado como "D").

La Figura 8F proporciona una representación esquemática más detallada del sistema que incluye un mecanismo de transporte para transportar una cubeta desde una localización de preparación de la muestra hasta una localización de observación de la muestra cerca de un detector óptico.

La Figura 9 es una imagen compuesta que muestra imágenes representativas de células sanguíneas extraídas de sangre completa, utilizando diferentes técnicas de obtención de imágenes y colorantes. La Fig. 9A es una imagen de campo oscuro; la Fig. 9B es una imagen que muestra la fluorescencia de los anticuerpos anti-CD 14 marcados unidos a monocitos; la Fig. 9C es una imagen que muestra la fluorescencia de los anticuerpos anti-CD 123 marcados unidos a basófilos; la Fig. 9D es una imagen que muestra la fluorescencia de los anticuerpos anti-CD16 marcados unidos a neutrófilos; la Fig. 9E es una imagen que muestra la fluorescencia de los anticuerpos anti-CD45 marcados unidos a leucocitos; la Fig. 9F es una imagen que muestra leucocitos y células plaquetarias teñidos con tinción nuclear DRAQ5® (los glóbulos rojos, que carecen de núcleos, no se tiñen con DRAQ5®).

La Figura 10 es una imagen compuesta que muestra imágenes representativas de células sanguíneas tomadas de sangre completa, que muestran un monocito, un linfocito, un eosinófilo y un neutrófilo.

La Figura 11 muestra gráficos de fluorescencia detectada en células marcadas con diferentes marcadores (anticuerpos marcados dirigidos a diferentes marcadores de superficie celular u otros); semejante marcaje múltiple es útil para identificar células. La Fig. 11A muestra la identificación de los monocitos mediante el trazado de la intensidad de la marca CD14 (FL-17) frente a la intensidad de dispersión (FL-9). La Fig. 11B muestra la identificación de los basófilos al trazar la intensidad de CD123 (FL-19) frente a la intensidad de CD16 (FL-15). La Fig. 11C muestra la identificación de los linfocitos al trazar la intensidad de CD16 (FL-15) frente a la intensidad de CD45 (FL-11). La Fig. 11D muestra la identificación de neutrófilos y eosinófilos mediante el trazado de la intensidad de CD16 (FL-15) frente a la intensidad de dispersión (FL-9).

La Figura 12 muestra comparaciones de los recuentos celulares (medidos a partir de alícuotas de la misma muestra de sangre) obtenidos por los presentes métodos, y obtenidos por otros métodos (utilizando un analizador de sangre comercial). La Fig. 12A representa los recuentos de glóbulos blancos obtenidos por los métodos actuales frente a los recuentos de glóbulos blancos obtenidos por el analizador de sangre comercial. La Fig. 12B representa los recuentos de glóbulos rojos obtenidos por los métodos actuales frente a los recuentos de glóbulos rojos obtenidos por el analizador de sangre comercial. La Fig. 12C representa los recuentos de plaquetas obtenidos por los métodos actuales frente a los recuentos de plaquetas obtenidos por el analizador de sangre comercial. La Fig. 12D representa los recuentos de neutrófilos obtenidos por los métodos actuales frente a los recuentos de neutrófilos obtenidos por el analizador de sangre comercial. La Fig. 12E representa los recuentos de monocitos obtenidos por los métodos actuales frente a los recuentos de monocitos obtenidos por el analizador de sangre comercial. La Fig. 12F representa los recuentos de linfocitos obtenidos por los métodos actuales frente a los recuentos de linfocitos obtenidos por el analizador de sangre comercial.

Descripción detallada

La descripción y la exposición que pueden ayudar a comprender la magnitud completa y las ventajas de los dispositivos, sistemas y métodos descritos en la presente memoria se pueden encontrar, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos 7.888.125; la Patente de Estados Unidos 8.088.593; la Patente de Estados Unidos 8.158.430; la Patente de Estados Unidos 8.380.541; la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. de Serie 13/769.798, presentada el 18 de febrero de 2013; la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. de Serie 61/802.194, presentada el 15 de marzo de 2013; la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. de Serie 13/769.779, presentada el 18 de febrero de 2013; la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. de Serie 13/244.947 presentada el 26 de septiembre de 2011; el documento PCT/US2012/57155, presentado el 25 de septiembre de 2012; la Solicitud de Estados Unidos Núm. de Serie 13/244.946, presentada el 26 de septiembre de 2011; la Solicitud de Patente de Estados Unidos 13/244.949, presentada el 26 de septiembre de 2011; y la Solicitud de Estados Unidos Núm. de Serie 61/673.245, presentada el 26 de septiembre de 2011.

Se debe entender que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son solo ilustrativas y explicativas y no son restrictivas de la invención, como se reivindica. Se puede observar que, tal como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno", "una" y "el" y "la" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un material" puede incluir mezclas de materiales, la referencia a "un compuesto" puede incluir múltiples compuestos, y similares.

En esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a una serie de términos que se definirán para que tengan los siguientes significados:

"Opcional" u "opcionalmente" significa que la circunstancia descrita posteriormente puede ocurrir o no, de modo que la descripción incluye los casos donde ocurre la circunstancia y los casos donde no lo hace. Por ejemplo, si un dispositivo contiene opcionalmente una característica para una unidad de recogida de muestras, esto significa que la

unidad de recogida de muestras puede estar presente o no, y, por lo tanto, la descripción incluye ambas estructuras en donde un dispositivo posee la unidad de recogida de muestras y estructuras en donde la unidad de recogida de muestras no está presente.

5 Según se utilizan en la presente memoria, el término "sustancial" representa más de una cantidad mínima o insignificante; y el término "sustancialmente" representa más de mínimamente o insignificantemente. Por lo tanto, por ejemplo, la frase "sustancialmente diferente", según se utiliza en la presente memoria, indica un grado de diferencia suficientemente elevado entre dos valores numéricos de manera que un experto en la técnica podría considerar que la diferencia entre los dos valores es estadísticamente significativa dentro del contexto de la característica medida por dichos valores. De este modo, la diferencia entre dos valores que son sustancialmente diferentes entre sí es típicamente mayor de aproximadamente 10%, y puede ser mayor de aproximadamente 20%, mayor de aproximadamente 30%, mayor de aproximadamente 40%, o mayor de aproximadamente 50% dependiendo de la función del valor de referencia o el valor comparativo.

10 Según se utiliza en la presente memoria, "reflexión interna" se refiere a la reflexión de la luz, dentro de un material (el primer material), en un límite entre el primer material y otro material (el segundo material). Por ejemplo, un primer material puede ser un sólido tal como un vidrio o plástico, y el segundo material puede ser, p. ej., aire. La luz que se refleja internamente se desplaza dentro del primer material antes de reflejarse. La reflexión interna puede ser parcial (reflexión interna parcial: PIR) o total (reflexión interna total: TIR). Por lo tanto, la reflexión interna donde toda la luz incidente en una superficie se retro-refleja dentro del primer material es TIR, mientras que la reflexión interna donde no toda la luz incidente en una superficie se refleja dentro de un material es PIR. (Con PIR, algo de luz puede pasar a través del límite, y algo de luz se retro-refleja en la superficie hacia el material). El ángulo de incidencia es un factor importante para determinar el alcance de la reflexión interna; éste es el ángulo de un rayo de luz incidente medido frente a una línea perpendicular a la superficie límite. Que se produzca o no TIR depende del ángulo de incidencia de la luz con respecto a la superficie en el límite entre el primer y el segundo material; el índice de refracción del primer material; el índice de refracción del segundo material; y otros factores (p. ej., la longitud de onda de la luz puede afectar a TIR, ya que el índice de refracción varía típicamente con la longitud de onda). El ángulo en el cual la luz se refleja totalmente internamente se denomina ángulo crítico; la luz incidente que tenga un ángulo de incidencia mayor que el ángulo crítico se reflejará totalmente internamente (permanecerá dentro del material: TIR). Sin embargo, con PIR, una porción de la luz incidente que tenga un ángulo de incidencia menor que el ángulo crítico también se reflejará internamente (refractándose la luz restante y pasando del primer material al segundo material).

15 30 Según se utiliza en la presente memoria, una "muestra" puede ser, pero no se limita a, una muestra de sangre, una muestra de orina u otra muestra biológica. Una muestra puede ser, por ejemplo, una muestra de sangre (p. ej., una muestra obtenida de una punción en la yema de un dedo, o de una punción venosa, o una muestra de sangre arterial, y puede ser sangre completa, suero, plasma u otra muestra de sangre), una muestra de orina, muestra de biopsia, un corte de tejido, una muestra de heces u otra muestra biológica; una muestra de agua, una muestra de suelo, una muestra de comida, una muestra de aire; u otra muestra (p. ej., hisopo nasal o lavado nasofaríngeo, saliva, orina, lágrimas, líquido gástrico, líquido cefalorraquídeo, moco, sudor, cerumen, aceite, secreción glandular, líquido cefalorraquídeo cerebral, tejido, semen, líquido cervical, líquido vaginal, fluido sinovial, hisopo de garganta, aliento, pelo, uñas, piel, biopsia, líquido placentario, líquido amniótico, sangre del cordón umbilical, líquidos linfáticos, líquidos de cavidades, esputo, moco, pus, una muestra de microbiota, meconio, leche materna y/u otras excreciones).

20 35 40 Por lo tanto, según se utiliza en la presente memoria, una "muestra" incluye una porción de una muestra de sangre, orina u otra muestra biológica, puede tener de cualquier tamaño o volumen adecuado, y es preferiblemente de pequeño tamaño o volumen. En algunas realizaciones de los sistemas, ensayos y métodos descritos en la presente memoria, las mediciones se pueden realizar utilizando una muestra de sangre de pequeño volumen, o no más que una pequeña porción de volumen de una muestra de sangre, donde un pequeño volumen comprende no más de aproximadamente 5 mL; o comprende no más de aproximadamente 3 mL; o comprende no más de aproximadamente 2 mL; o comprende no más de aproximadamente 1 mL; o comprende no más de aproximadamente 500 µL; o comprende no más de aproximadamente 250 µL; o comprende no más de aproximadamente 100 µL; o comprende no más de aproximadamente 75 µL; o comprende no más de aproximadamente 50 µL; o comprende no más de aproximadamente 35 µL; o comprende no más de aproximadamente 25 µL; o comprende no más de aproximadamente 20 µL; o comprende no más de aproximadamente 15 µL; o comprende no más de aproximadamente 10 µL; o comprende no más de aproximadamente 8 µL; o comprende no más de aproximadamente 6 µL; o comprende no más de aproximadamente 5 µL; o comprende no más de aproximadamente 4 µL; o comprende no más de aproximadamente 3 µL; o comprende no más de aproximadamente 2 µL; o comprende no más de aproximadamente 1 µL; o comprende no más de aproximadamente 0,8 µL; o comprende no más de aproximadamente 0,5 µL; o comprende no más de aproximadamente 0,3 µL; o comprende no más de aproximadamente 0,2 µL; o comprende no más de aproximadamente 0,1 µL; o comprende no más de aproximadamente 0,05 µL; o comprende no más de aproximadamente 0,01 µL.

45 50 55 60 En las realizaciones, el volumen de la muestra recogida a través de la punción en la yema del dedo puede ser, p. ej., aproximadamente 250 µL o menos, o aproximadamente 200 µL o menos, o aproximadamente 150 µL o menos, o aproximadamente 100 µL o menos, o aproximadamente 50 µL o menos, o aproximadamente 25 µL o menos,

aproximadamente 15 µL o menos, o aproximadamente 10 µL o menos, o aproximadamente 10 µL o menos, o aproximadamente 5 µL o menos, o aproximadamente 3 µL o menos, o aproximadamente 1 µL o menos.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "localización del punto de servicio" puede incluir ubicaciones donde un sujeto puede recibir un servicio (p. ej., pruebas, seguimiento, tratamiento, diagnóstico, guía, recogida de muestras, verificación de ID, servicios médicos, servicios no médicos , etc.), y puede incluir, sin limitación, el hogar de un sujeto, el negocio de un sujeto, la localización de un proveedor de atención médica (p. ej., un médico), hospitales, salas de emergencia, quirófanos, clínicas, consultorios de profesionales de la salud, laboratorios, minoristas [p. ej., farmacias (p. ej., farmacias minoristas, farmacias clínicas, farmacias hospitalarias), parafarmacias, supermercados, tiendas de comestibles, etc.], vehículos de transporte (p. ej. automóviles, barcos, camiones, autobuses, aviones, motocicletas, ambulancias, unidades móviles, coches/camiones de bomberos, vehículos de emergencia, vehículos policiales, coches de policía, u otros vehículos configurados para transportar a un sujeto de un punto a otro, etc.), unidades de atención médica ambulante, unidades móviles, escuelas, guarderías, ubicaciones de control de seguridad, ubicaciones de combate, residencias tuteladas, oficinas gubernamentales, edificios de oficinas, tiendas de campaña, sitios de adquisición de muestras de fluidos corporales (p. ej., centros de recogida de muestras de sangre), sitios en o cerca de una entrada a una localización a la que un sujeto puede desear acceder, sitios en o cerca de un dispositivo al que tal vez desee acceder un sujeto (p. ej., la localización de un ordenador si el sujeto desea acceder al ordenador), una localización donde un dispositivo de procesamiento de muestras recibe una muestra, o cualquier otra localización de punto de servicio descrita en otro lugar en la presente memoria.

El término "células", según se utiliza en el contexto de muestras biológicas, abarca muestras que generalmente tienen tamaños similares a las células individuales, incluyendo, pero no limitadas a, vesículas (tales como liposomas), células, viriones y sustancias unidas a partículas pequeñas tales como cuentas, nanopartículas o microesferas.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "se une" se refiere a una reacción, o interacción, entre dos materiales que conduce a la estrecha combinación de los dos; p. ej., una reacción entre un ligando y un receptor, en la que el ligando se une estrechamente al receptor, proporciona un ejemplo de unión. La combinación de un anticuerpo con su antígeno diana, y de una proteína portadora con su carga, tal como el factor intrínseco con la vitamina B12, son ejemplos adicionales de reacciones en las que un material se une a otro.

El término "aglutinante", según se utiliza en la presente memoria, se refiere en general a cualquier compuesto o macromolécula, tal como un anticuerpo, que se une estrechamente o específicamente a una diana. Los aglutinantes incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos (ya sean monoclonales o policlonales, fragmentos de anticuerpos, inmunoadhesinas y otras variantes y miméticos de anticuerpos similares), proteínas de unión naturales (p. ej., proteína de factor intrínseco que es específica para la vitamina B12), ligandos que se unen a sus receptores diana, sustratos que se unen a enzimas particulares, pares de unión tales como avidina y biotina, moléculas pequeñas que se unen de forma estrecha y específica a moléculas diana, y similares. Se pueden utilizar bacterias, virus, armazones sintéticos y otros objetos y materiales que se unen o se adhieren a dianas específicas como aglutinantes. Un aglutinante puede ser, o puede incluir, o puede estar conectado a, un marcador tal como un colorante, o un fluoróforo, u otro radical detectable.

Según se utiliza en la presente memoria, un "marcador" es un material detectable cuya presencia hace visible o detectable de otro modo una diana, o cuya presencia en una posición o localización es indicativa de la presencia de una diana en esa posición o localización. Se puede utilizar un marcador para marcar una célula, estructura, partícula u otra diana, y puede ser útil para detectar, determinar la presencia de, localizar, identificar, cuantificar o medir de otro modo una diana, o una propiedad de, una muestra. Los marcadores pueden incluir, sin limitación, tintes, colorantes, ligandos, anticuerpos, partículas y otros materiales que se pueden unir a o localizar en dianas o ubicaciones específicas; también se pueden utilizar bacterias, virus o células que pueden crecer o localizarse en dianas o ubicaciones específicas como marcadores. Los atributos o las propiedades detectables de las células u otras dianas se pueden utilizar como marcadores.

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "tinte" y "colorante" pueden ser intercambiables, y se refieren a elementos, compuestos y macromoléculas que hacen que los objetos o componentes de una muestra sean más detectables que en ausencia de tratamiento con el tinte o colorante. Por ejemplo, el tratamiento de una muestra de sangre con un colorante de ADN tal como el yoduro de propidio hace que los núcleos de las células nucleadas sean más visibles y hace que la detección y cuantificación de dichas células sea más fácil que de otra manera, incluso en presencia de células no nucleadas (p. ej., glóbulos rojos).

Según se utiliza en la presente memoria, un "detector" puede ser cualquier dispositivo, aparato o sistema que proporcione información derivada de una señal, imagen u otra información relacionada con una diana, tal como una muestra. Las señales e información detectables pueden incluir, por ejemplo, señales ópticas, eléctricas, mecánicas, químicas, físicas u otras. Un detector puede ser, por ejemplo, un detector óptico, o un detector eléctrico, o un detector químico, o un detector electroquímico, un detector acústico, un detector de temperatura, o un detector mecánico u otro detector.

Según se utiliza en la presente memoria, un "detector óptico" detecta la radiación electromagnética (p. ej., la luz). Un

detector óptico puede detectar una imagen o se puede utilizar con una imagen, o puede detectar la intensidad de la luz independientemente de una imagen, o ambas. Un detector óptico puede detectar, o medir, la intensidad de la luz. Algunos detectores ópticos pueden ser sensibles a, o estar restringidos, para detectar o medir una longitud de onda o intervalo de longitudes de onda particulares. Por ejemplo, los detectores ópticos pueden incluir, por ejemplo, detectores de fotodiodos, fotomultiplicadores, dispositivos de carga acoplada, diodos láser, espectrofotómetros, cámaras, microscopios u otros dispositivos que miden la intensidad de la luz (de una sola longitud de onda, de múltiples longitudes de onda o de un intervalo o intervalos, de longitudes de onda de la luz), formar una imagen, o ambos.

El término "ploidía", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a la cantidad de ADN en una célula, y a los ensayos y mediciones del contenido de ADN de las células en una muestra. Las mediciones de la ploidía proporcionan una medida de si una célula, o una población de células, tienen o no una cantidad normal o anormal de ADN, o, dado que el ADN se duplica durante la división y la proliferación celular, si proliferan números anormales de células en una población. Las mediciones de la ploidía se pueden realizar mediante técnicas de obtención de imágenes después de la tinción de células nucleadas en una muestra con un colorante específico de ADN.

15 Microscopía cuantitativa

En algunas realizaciones, los métodos, sistemas y dispositivos se proporcionan en la presente memoria para microscopía cuantitativa. La microscopía cuantitativa puede incluir uno o más de microscopía cuantitativa de fluorescencia, microscopía cuantitativa de campo oscuro, microscopía cuantitativa de campo claro y microscopía cuantitativa de contraste de fase para medir uno o más atributos celulares. Cualquiera de estos métodos puede proporcionar información morfométrica con respecto a las células. Tal información puede ser medida cuantitativamente. En algunas realizaciones, para microscopía cuantitativa, se analiza una muestra mediante dos o más de microscopía cuantitativa de fluorescencia, microscopía cuantitativa de campo oscuro, microscopía cuantitativa de campo claro y microscopía cuantitativa de contraste de fase. La microscopía cuantitativa puede incluir el uso de técnicas de análisis de imágenes y/o métodos de aprendizaje y clasificación estadísticos para procesar imágenes obtenidas por microscopía.

Se pueden medir múltiples atributos celulares diferentes durante la microscopía cuantitativa. Los atributos celulares que pueden medirse incluyen, sin limitación:

Atributos físicos: p. ej., tamaño, volumen, conductividad, dispersión de ángulo bajo y alto, y densidad de la célula. Otros atributos físicos que se pueden medir y/o cuantificar incluyen, sin limitación, la circularidad de una célula o partícula; la relación de aspecto de una célula o partícula; el perímetro de una célula o partícula; la convexidad de una célula o partícula; la granularidad de una célula o partícula; la intensidad de una imagen de una célula o partícula; la altura (p. ej., tamaño a través de varios planos focales) de una célula o partícula; la planitud de una célula o partícula; y otros atributos físicos.

Atributos morfológicos: p. ej., la forma, el área, el tamaño y la lobularidad de una célula; la forma, el área, el tamaño y la lobularidad del núcleo; la forma, el área, el tamaño y la lobularidad de las mitocondrias; y la razón entre el volumen nuclear y el volumen celular.

Atributos intracelulares: p. ej., la distancia centroide del núcleo/centroide celular (es decir, distancia entre el centro del núcleo y el centro de la célula), la distancia del centroide del lóbulo del núcleo (es decir, distancia entre el centro de los diferentes lóbulos del núcleo), la distribución de las proteínas dentro de las células (p. ej., actina, tubulina, etc.), la distribución de los orgánulos dentro de las células (p. ej., lisosomas, mitocondrias, etc.), la co-localización de las proteínas con otras proteínas y orgánulos, y otros atributos.

Atributos bioquímicos: p. ej., el nivel de expresión de las proteínas celulares, las proteínas de la superficie celular, las proteínas citoplásmicas, las proteínas nucleares, los ácidos nucleicos celulares, los ácidos nucleicos de la superficie celular, los ácidos nucleicos citoplásmicos, los ácidos nucleicos nucleares, los carbohidratos celulares, los carbohidratos de la superficie celular, los carbohidratos citoplásmicos y los carbohidratos nucleares.

En algunas realizaciones, los métodos, sistemas y dispositivos se proporcionan en la presente memoria para la medición cuantitativa de dos, tres, cuatro, cinco o más atributos de células en una muestra, en donde los atributos se seleccionan entre atributos físicos, atributos morfológicos, atributos intracelulares, y atributos bioquímicos. En algunas realizaciones, los métodos, sistemas y dispositivos se proporcionan en la presente memoria para la medición cuantitativa de dos, tres, cuatro, cinco o más atributos de las células en una muestra, en donde los atributos se seleccionan entre: el tamaño de la célula, el volumen de la célula, la conductividad de la célula, la dispersión de luz de ángulo bajo de las células, la dispersión de luz de ángulo alto de las células, la densidad de células, la forma de las células, el área de células, la lobularidad de células, la forma de núcleo, el área del núcleo, el tamaño del núcleo, la lobularidad del núcleo, la forma de las mitocondrias, el área de las mitocondrias, el tamaño de las mitocondrias, la lobularidad de las mitocondrias, la razón del volumen nuclear con respecto al volumen de la célula, la distancia del centroide del núcleo / centroide de la célula, la distancia del centroide del lóbulo del núcleo, la distribución de las proteínas con las células (p. ej., actina, tubulina, etc.), la distribución de los orgánulos dentro de las células (p. ej., lisosomas, mitocondrias, etc.), el nivel de expresión de una proteína celular, el nivel de expresión

de una proteína de la superficie celular, el nivel de expresión de una proteína citoplásmica, el nivel de expresión de una proteína nuclear, el nivel de expresión de un ácido nucleico celular, el nivel de expresión de un ácido nucleico de la superficie celular, el nivel de expresión de un ácido nucleico citoplásmico, el nivel de expresión de un ácido nucleico nuclear, el nivel de expresión de un carbohidrato celular, el nivel de expresión de un carbohidrato de la superficie celular, el nivel de expresión de un carbohidrato citoplásmico, y el nivel de expresión de un carbohidrato nuclear.

En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para la medición cuantitativa de dos, tres, cuatro, cinco o más atributos de células en una muestra biológica mediante microscopía, en donde el método puede incluir una o más de las siguientes etapas o elementos. Los atributos de las células medidos cuantitativamente se pueden seleccionar entre los atributos enumerados en el párrafo inmediatamente anterior. La muestra biológica se puede tratar previamente antes de la microscopía. El tratamiento previo puede incluir cualquier procedimiento para ayudar al análisis de la muestra por microscopía, incluyendo: el tratamiento de la muestra para enriquecer las células de interés para la microscopía, el tratamiento de la muestra para reducir los componentes en la muestra que pueden interferir en la microscopía, la adición del material a la muestra para facilitar el análisis de la muestra por microscopía (p. ej., diluyentes, moléculas de bloqueo para reducir la unión no específica de los colorantes a las células, etc.).

Opcionalmente, antes de la microscopía, una muestra se puede poner en contacto con uno o más aglutinantes que se unen específicamente a un componente celular. Los aglutinantes pueden estar directamente vinculados a un colorante u otra partícula para la visualización del aglutinante. Una muestra también se puede poner en contacto con un aglutinante secundario, que se une al aglutinante que se une al componente celular. Un aglutinante secundario puede estar directamente vinculado a un colorante u otra partícula para la visualización del aglutinante. Antes de la microscopía, una muestra se puede analizar en un espectrofotómetro. Para la microscopía, se puede introducir una muestra biológica que contiene o se sospeche que contiene un objeto para el análisis microscópico en un portamuestras, tal como un portaobjetos o una cubeta. El portamuestras que contiene una muestra se puede introducir en un dispositivo configurado para realizar la microscopía cuantitativa de la muestra. El microscopio se

puede acoplar con un sensor de imagen para capturar imágenes generadas a través del objetivo del microscopio. En el dispositivo, se pueden obtener múltiples imágenes de la muestra por microscopía. Se puede utilizar una o más de microscopía cuantitativa de fluorescencia, microscopía cuantitativa de campo oscuro, microscopía cuantitativa de campo claro y microscopía cuantitativa de contraste de fase para obtener imágenes de la muestra. Opcionalmente, se pueden obtener por microscopía imágenes de toda la muestra del portamuestras. Se pueden requerir múltiples campos de visión del microscopio para capturar imágenes de la muestra completa en el portamuestras. El portamuestras se puede mover con relación al microscopio o el microscopio se puede mover con relación al portamuestras para generar un campo de visión diferente para examinar diferentes porciones de la muestra en el portamuestras. Se pueden obtener múltiples imágenes del mismo campo de visión de la muestra en el portamuestras. Opcionalmente, se pueden utilizar múltiples filtros con el mismo tipo de microscopía y el mismo campo de visión de la muestra, para obtener diferentes imágenes de la misma muestra que contienen información diferente relacionada con la muestra. Los filtros que se pueden utilizar incluyen, sin limitación, filtros de paso de banda y de paso largo. Los filtros pueden permitir el paso de ciertas longitudes de onda de la luz, y bloquear el paso de las demás. Opcionalmente, se pueden utilizar múltiples tipos de microscopía (p. ej., fluorescencia, campo oscuro, campo claro, etc.) para obtener imágenes del mismo campo de visión de la muestra, con el fin de obtener imágenes diferentes de la misma muestra que contienen información diferente relacionada con la muestra. Opcionalmente, el vídeo se puede utilizar para recoger imágenes microscópicas. Opcionalmente, las imágenes de microscopía se pueden recoger en 3-D. Para la microscopía realizada como se describe en la presente memoria, el dispositivo o sistema se pueden configurar para relacionar la información relacionada con una célula en una imagen de la muestra con la misma célula en una imagen diferente de la muestra. Basándose en diferentes imágenes de la misma muestra y/o las mismas células, se pueden determinar múltiples atributos de las células en la muestra. En algunos aspectos, se puede utilizar una combinación de múltiples atributos/ múltiples elementos de información sobre las células de la muestra para tomar una decisión clínica y/o extraer una conclusión sobre las células que no serían posibles basándose solamente en la información de un único atributo de las células.

En algunas realizaciones, se proporcionan dispositivos y sistemas para la medición cuantitativa de dos, tres, cuatro, cinco o más atributos de células en una muestra biológica mediante microscopía. En algunas realizaciones, el dispositivo o sistema contienen un microscopio o un citómetro y un espectrofotómetro. El dispositivo o sistema pueden contener adicionalmente un aparato de manejo de fluidos, que está configurado para mover la muestra entre un espectrofotómetro y un microscopio o citómetro. En algunas realizaciones, los dispositivos y sistemas para realizar los métodos descritos en la presente memoria se configuran como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 13/244.947 y la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. de Serie 13/769.779. Aunque lo anterior se ha descrito en el contexto de una célula, también se debe entender que parte o todo lo anterior también se puede aplicar a cristales, partículas, filamentos, u otros objetos del tamaño de una célula que se puedan encontrar en una muestra.

Dilución dinámica

En algunas realizaciones, los métodos, sistemas y dispositivos se proporcionan en la presente memoria para la dilución dinámica de muestras que contienen células.

A modo de ejemplo no limitante, un método para la dilución dinámica de una muestra puede incluir una o más de las

siguientes etapas o elementos, de manera que se determine un número o concentración deseados de células u objetos en la muestra y esta información sea utilizada como un factor en el ajuste de procesamiento de muestras aguas abajo. En este ejemplo no limitante, se pueden añadir uno o más tintes o colorantes a una muestra biológica que contiene células. La mezcla de tinte y muestra puede ser incubada. Las células en la mezcla de tinte y muestra 5 se pueden lavar para eliminar el exceso de tinte (no unido). Las células teñidas y lavadas se pueden preparar en un volumen deseado para su análisis adicional. Las células teñidas y lavadas se pueden analizar para determinar el número o la concentración aproximados de células en la muestra o una porción de la misma. Basándose en el 10 número o la concentración de células teñidas en la muestra o porción de la misma, se puede obtener un volumen de muestra para su análisis adicional, de modo que se obtenga un número o concentración deseados de células para su análisis adicional. En algunas realizaciones, las muestras se pueden diluir como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 13/355.458.

En una realización como se describe en la presente memoria, es deseable proporcionar otra técnica de detección tal como, pero no limitada a, un método basado en fluorescencia para enumerar células, para estimar la concentración celular en lugar de utilizar un contador de células. Esta estimación se describe porque, para una tinción precisa y 15 reproducible de muestras de pacientes, a menudo es deseable que los tintes (colorantes de ADN/anticuerpos/aglutinantes/etc.) se titulen de manera óptima para un número/concentración específicos de células. Por ejemplo, se aplicará una concentración conocida de tinte a un número específico de células (p. ej., 0,2 microgramos de tinte por mil glóbulos blancos (GB). Después de un período de incubación, la muestra se lavará para eliminar el exceso de colorante (no unido), se preparará a la densidad celular adecuada y se obtendrán imágenes.

20 En este ejemplo no limitante, para hacer una estimación de la concentración celular para un tipo de célula elegido como diana, se mide una muestra de forma no destructiva con una modalidad diferente a la utilizada para la citometría, tal como, pero no limitada a, un espectrofotómetro, con el fin de informar sobre el procesamiento de la muestra para el ensayo citométrico. El método puede comprender la selección de otro marcador único para la población celular de interés. En un ejemplo no limitante, para las células B, se puede elegir CD20. El proceso 25 comprende el marcate de la muestra con aglutinantes anti-CD20 conjugados a un fluoróforo de color diferente al de CD5. A continuación se mide la señal fluorescente de esta muestra de forma no destructiva y rápida utilizando un dispositivo tal como, pero no limitado a, un espectrofotómetro de fluorescencia. Utilizando la calibración, es posible predecir la concentración de células B con una precisión limitada para proporcionar la estimación. En un ejemplo no limitante, la calibración puede correlacionar la intensidad de la señal con el número de células para ese tipo de 30 señal. La creación de estas curvas de calibración se puede utilizar para estimar el número de células u objetos. No se excluyen otras técnicas para estimar el número de células basadas en una intensidad de señal global, tal como, pero no limitadas a, las ópticas, eléctricas, acústicas o similares. Basándose en la concentración aproximada de células B, el sistema puede estimar la cantidad y concentración apropiadas de aglutinante anti-CD5 para que se mantenga la razón proporcional entre la expresión de CD5 y la fluorescencia de CD5. De esta manera, se pueden 35 optimizar/normalizar el tinte y el procedimiento de tinción para un número de célula concreto.

Para maximizar el uso de muestras de pacientes (que pueden ser muestras de bajo volumen, tales como, p. ej., sangre obtenida de la yema del dedo, que tiene un volumen igual o inferior a aproximadamente 120 µL), es deseable desarrollar métodos por los cuales se puede enumerar la cantidad de GB contenidos dentro de un volumen dado de sangre (p. ej., la concentración de GB/µL determinada). Esto permite determinar, o al menos estimar, la cantidad de GB, antes de añadir los tintes. Una vez determinada, se puede dividir una cantidad deseada de células en alícuotas para la incubación con uno o más tintes de concentración conocida, proporcionando una resolución óptima de 40 subpoblaciones de células.

En una aplicación en la que se desea la medición de la ploidía de las células, las células de una muestra se pueden teñir con un colorante de ADN, y a continuación se puede cuantificar la intensidad de la tinción (donde "la intensidad de la tinción" significa la intensidad de una señal óptica debida al colorante). La intensidad de la señal del colorante debida a dicha tinción depende de la proporción de ADN/colorante (es decir, de la cantidad de ADN teñido con el colorante con respecto a la cantidad de colorante añadido). Si se añade una cantidad predeterminada de colorante a cada muestra, independientemente de las características de la muestra, las muestras con una concentración celular muy alta serán menos brillantes en comparación con las muestras con una concentración celular baja. Esta situación 45 confundiría la cuantificación de la cantidad de ADN en cada célula. Como se describe en la presente memoria, la obtención de una estimación de la cantidad de células nucleadas en una muestra antes de añadir el colorante permite ajustar la cantidad de colorante para que se pueda realizar la cuantificación del ADN y de la cantidad de ADN por célula en la muestra. Así, por ejemplo, una muestra, o una alícuota de una muestra, se pueden tratar con un tinte o colorante dirigidos a un marcador de superficie celular indicativo de la célula o células que se vayan a 50 cuantificar, y ese marcador de superficie se utiliza para estimar de forma no destructiva la concentración de células en la muestra. Esta concentración estimada se puede utilizar después para calcular la cantidad de colorante que se debe añadir a la muestra para mantener siempre una proporción uniforme de ADN:Colorante (mol a mol) para las mediciones posteriores.

En un primer ejemplo de un método basado en fluorescencia para enumerar células, un método puede comprender la determinación de la ploidía de las células (p. ej., enumeración de las células mediante tinción de anticuerpos conjugados con fluoróforo). En este ejemplo no limitante, se desea enumerar los GB en una muestra de sangre para que se pueda teñir un número específico de GB con una concentración predeterminada de colorante de ADN (p. ej.,

4'-6-diamidino-2-fenilindol) (DAPI), o 1,5-bis[2-(dimetilamino)ethyl]amino]-4,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona (DRAQ5®), o yoduro de propidio u otro colorante que tiñe el ADN. El método de este ejemplo comprende el recuento de los GB utilizando un anticuerpo conjugado con fluoróforo y un espectrofotómetro. Se debe entender que este enfoque puede ser útil cuando se tiñen células con un colorante de ADN y se determina la ploidía, donde la razón del número de células con respecto a la concentración de colorante de ADN (número de células:[colorante de ADN]) es deseable para generar datos comparables y uniformes. Dado que la cantidad de células por microlitro de sangre varía dentro de una población sana, generalmente es conveniente determinar el número de GB por microlitro antes de tratar de teñir para determinar la ploidía.

En una realización, el procedimiento comprende el uso de células que se tiñen primero con un anticuerpo conjugado con fluoróforo (donde el anticuerpo se dirige preferiblemente a un antígeno expresado de forma ubicua, tal como CD45, o un antígeno específico de una subpoblación, tal como el CD3 para células T), o un colorante fluorescente que marca todas las células (p. ej., una tinción de membrana o citoplasmática tal como eosina, o una lectina u otro tinte o colorante) donde la longitud de onda de la fluorescencia del fluoróforo es espectralmente distinta (y preferiblemente distante) de la longitud de onda de emisión del colorante de ADN. Después de un período de incubación, la muestra se lava para eliminar el exceso de anticuerpo (no unido), se prepara en el volumen apropiado y se analiza mediante un espectrofotómetro. Los datos resultantes permiten determinar la cantidad de GB en una muestra de sangre, de manera que un volumen específico de sangre se puede dividir en alícuotas (lo que produce una cantidad particular/deseada de GB) y teñir con un colorante de ADN. Los datos resultantes son útiles para calcular y adaptar la cantidad de colorante de ADN que se utilizará para teñir una muestra, de acuerdo con la cantidad de GB determinada utilizando el anticuerpo conjugado con fluoróforo como se ha descrito.

Una realización adicional comprende determinar la cantidad de células (mediante tinción de ADN) antes de la tinción de la superficie de las células. También se pueden encontrar detalles adicionales en la sección de enumeración de células en la presente memoria a continuación. A veces es deseable enumerar los GB en una muestra de sangre de manera que una cantidad específica de GB se pueda teñir con concentraciones óptimas de anticuerpos. En una realización, el método comprende contar los GB utilizando un colorante de ADN y un espectrofotómetro, p. ej., como se discutió anteriormente.

Alternativamente, si la cantidad de células por microlitro se determinó antes de la tinción, en ese caso se podría dividir en alícuotas y teñir una cantidad conocida de células para cada muestra, independientemente de (i) la variación dentro de una población sana y (ii) el estado de enfermedad. Para determinar la cantidad de células por microlitro de sangre, puede ser posible utilizar colorantes de ADN tales como DAPI, DRAQ5®, o yoduro de propidio. Opcionalmente, el tinte no unido se puede lavar. Se puede utilizar un espectrofotómetro para determinar la cantidad de células nucleadas (p. ej., positivas para DRAQ5®) por microlitro de sangre.

La cantidad y la concentración de glóbulos blancos (GB) en alícuotas de sangre de igual tamaño pueden variar de un sujeto a otro. Sin embargo, para un análisis adecuado de los GB en una muestra de sangre, se pueden añadir cantidades suficientes de reactivos (tales como anticuerpos dirigidos a antígenos específicos de GB en particular), y la cantidad que es suficiente depende del número y la concentración de GB en una muestra de sangre. Se puede utilizar un procedimiento denominado "dilución dinámica" para garantizar que se añade reactivo de anticuerpo suficiente a una muestra. En un ejemplo no limitante, el procedimiento trata las células sanguíneas para obtener un recuento provisional de células utilizado para medir la cantidad apropiada de reactivo (p. ej., un cóctel de anticuerpos para teñir glóbulos blancos (GB) que se va a utilizar con la muestra con el fin de proporcionar una tinción completa de las células. En el procedimiento, las células se tiñen con un colorante de ADN (p. ej., DAPI, DRAQ5®, o yoduro de propidio) que es espectralmente distinto/distante de la emisión de los anticuerpos conjugados con fluoróforo que se utilizarán en las etapas o ensayos posteriores. Opcionalmente, la muestra se puede lavar para eliminar el exceso de colorante de ADN (no unido) después de un período de incubación. Después de un período de incubación, la muestra se puede preparar en el volumen apropiado y se pueden obtener imágenes o se puede medir utilizando un espectrofotómetro. Los datos resultantes permiten que la cantidad de GB en el volumen conocido de muestra sea enumerada/determinada, de modo que un volumen específico de sangre se pueda dividir en alícuotas (produciendo una cantidad particular/deseada de GB) y teñir con la cantidad adecuada de anticuerpos (es decir, basándose en el número estimado de GB determinado utilizando el colorante de ADN, se puede determinar la cantidad de anticuerpos que se requieren para proporcionar la saturación deseada de la tinción de anticuerpos). De este modo, la estimación proporcionada por la tinción del ADN permite el cálculo y la adición de la cantidad apropiada de colorante de anticuerpo requerida para la cantidad de GB en la alícuota de la muestra.

Protocolo de dilución dinámica:

En una realización, un protocolo de dilución dinámica implica tomar una alícuota de una muestra de sangre que contiene glóbulos blancos para estimar la cantidad de reactivo que contiene anticuerpos dirigidos a los GB que se necesita para el análisis de la muestra.

En este ejemplo no limitante, se toma un volumen conocido de una muestra de sangre. Se añade una cantidad conocida de colorante nuclear (p. ej., un colorante de tinción de ADN, tal como yoduro de propidio, DAPI, o DRAQ5®) a esta muestra de volumen conocido. La mezcla se incuba a continuación durante un período de 2 a 10 minutos a una temperatura entre 25°C y 40°C.

A continuación se añade un tampón de lisis de glóbulos rojos (GR). En este ejemplo no limitante, la mezcla se incuba a continuación durante un período de 2 a 10 minutos a una temperatura entre 25°C y 40°C (también se pueden utilizar temperaturas más bajas). Un tampón de lisis adecuado puede ser, por ejemplo, una solución salina hipotónica; una solución de sacarosa hipotónica; una solución isotónica de cloruro de amonio; una solución isotónica que incluye un tensioactivo suave tal como saponina; u otro tampón en el que los glóbulos rojos se lisan. En realizaciones, tales tampones de lisis incluirán un fijador tal como paraformaldehído para ayudar a estabilizar los GB. Un tensioactivo tal como la saponina causa la formación de una gran cantidad de orificios en las membranas de las células. Los glóbulos rojos, debido a sus propiedades únicas de membrana, son particularmente susceptibles a esta formación de orificios y se lisan completamente, filtrándose su contenido al líquido de alrededor. La presencia del fijador evita la lisis involuntaria de los glóbulos blancos. Las plaquetas también permanecen sin lisiar. El propósito de esta etapa es eliminar los glóbulos rojos de la mezcla, ya que superan en número a los glóbulos blancos en aproximadamente 1000:1. Las plaquetas no interfieren en la obtención de las imágenes y, por lo tanto, no son una consideración en este procedimiento. En realizaciones, un tampón de lisis también puede contener cuentas no fluorescentes a una concentración conocida; estas cuentas pueden servir como marcadores de tamaño y/o concentración. La lisis de los GR, junto con las etapas subsiguientes de este protocolo, elimina sustancialmente cualquier interferencia de GR en la obtención de imágenes o en las mediciones ópticas de los GB.

A continuación, la muestra tratada se separa, donde la separación se puede realizar mediante cualquier método adecuado, tal como pero no limitado a, centrifugación de la muestra tratada en una centrífuga a 1200 xg durante 3 minutos.

Después de la separación (p. ej., centrifugación), se elimina el sobrenadante; el sedimento restante se resuspende a continuación. En realizaciones, el sedimento se resuspende en parte de o en todo el sobrenadante. Mediante esta etapa se produce un volumen conocido de solución que contiene el sedimento resuspendido.

Si se desea, se puede realizar una etapa de separación adicional y una etapa de resuspensión adicional. Estas etapas proporcionan una muestra concentrada con células que se concentran aproximadamente 10 veces (ignorando cualquier posible pérdida de células en cada etapa).

A continuación, se mide la cantidad de colorante de tinción de ADN en la muestra concentrada resuspendida. Por ejemplo, la fluorescencia de un colorante de tinción de ADN tal como DRAQ5® se puede medir en un espectrofotómetro. En realizaciones, la muestra se puede iluminar con luz a una longitud de onda de 632 nm (la longitud de onda de excitación de DRAQ5®), la luz emitida por la suspensión celular puede ser filtrada por un filtro de paso largo de 650 nm, y después la luz emitida se puede medir en un espectrofotómetro. Esta medida de emisión se correlaciona con una curva de calibración generada previamente para estimar una concentración aproximada de glóbulos blancos en la suspensión celular. Típicamente, las concentraciones celulares han oscilado entre aproximadamente 1000 células por microlitro y aproximadamente 100.000 células por microlitro. La estimación de la cantidad de GB obtenida de esta manera se puede utilizar para calcular un factor de dilución apropiado para asegurar que la concentración de células en la muestra, cuando se utiliza en mediciones cuantitativas subsiguientes, está restringida dentro de un intervalo (p. ej., un intervalo 1:2 u otro intervalo) alrededor de una concentración diana predefinida. La muestra se diluye a continuación por un factor de dilución calculado para proporcionar una muestra con GB dentro del intervalo deseado.

El propósito de esta etapa de "dilución dinámica" es asegurar que los GB no estén presentes a una concentración demasiado alta o demasiado baja en la muestra. Si la concentración celular es demasiado alta, la precisión de los algoritmos de procesamiento de imágenes se ve comprometida, y si la concentración celular es demasiado baja, se muestrea una cantidad insuficiente de células. La dilución de una muestra concentrada como se describe en la presente memoria proporciona concentraciones de GB dentro de un intervalo deseado y asegura que las señales de la muestra durante el análisis caerán dentro de un intervalo óptimo para la detección y el análisis.

Además, la estimación de la cantidad de GB de esta manera permite el cálculo (dentro de un intervalo pequeño) de las cantidades de reactivos requeridas para ensayos adicionales y etapas del método aplicados a la muestra, ya que las cantidades de GB en una muestra pueden variar, pero la cantidad de reactivo requerida para los diversos ensayos puede depender del número de GB en la muestra que se vaya a analizar. Por ejemplo, los reactivos que se van a añadir después de la estimación de la cantidad de GB mediante el protocolo de dilución dinámica incluyen anticuerpos que se dirigen a抗原s específicos encontrados en diferentes tipos de GB, o, si estos抗原s se encuentran en múltiples tipos de GB, que están presentes en diferentes cantidades en diferentes tipos de GB. En ausencia de tal estimación del número de GB en una muestra, se deben utilizar cantidades predeterminadas de colorantes y otros reactivos en ensayos posteriores de la muestra, lo que lleva a cantidades incorrectas de reactivos y a resultados de análisis inexactos o incompletos. Por lo tanto, este Protocolo de Dilución Dinámica sirve como una etapa inicial importante y útil en la evaluación completa de una muestra de sangre de un paciente, y permite realizar mediciones más precisas y exactas de lo que sería posible de otra manera.

Tinción Dinámica

En algunas realizaciones, se proporcionan métodos, sistemas y dispositivos en la presente memoria para la tinción dinámica de muestras que contienen células.

Medición de un componente de interés en células de una población celular

En una realización, un método para teñir dinámicamente una muestra de células se refiere a un método para la medición de un componente de interés en células de una población celular en una muestra.

Según se utiliza en la presente memoria, un "componente de interés" se refiere a cualquier tipo de molécula que 5 puede estar presente en una célula. Los "componentes de interés" incluyen proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. Típicamente, un "componente de interés" es una especie específica de molécula, tal como un antígeno particular. Los ejemplos no limitantes de "componentes de interés" de una célula incluyen: proteína CD5, proteína CD3, etc.

Según se utiliza en la presente memoria, una "población celular" se refiere a cualquier agrupación de células, 10 basada en una o más características comunes. Una "población celular" puede tener cualquier grado de amplitud y puede incluir un gran número de células o solo un pequeño número de células. Los ejemplos no limitantes de "poblaciones celulares" incluyen: glóbulos rojos (GR), glóbulos blancos, células B, células B CD34+, etc.

En algunas circunstancias, puede ser deseable medir cuantitativamente un componente de interés en células de una 15 cierta población celular en una muestra de un sujeto. Por ejemplo, puede ser deseable medir el grado de expresión de CD5 (el "componente de interés") en células B (la "población celular") en una muestra de células de un sujeto que tiene leucemia linfocítica crónica. La detección y/o medición del nivel de un componente de interés puede implicar el uso de una molécula aglutinante que tenga afinidad por el componente de interés específico, tal como un anticuerpo 20 o un fragmento variable de cadena sencilla ("scFv"). Con el fin de medir con precisión el nivel de un componente específico de interés en las células en un método que implica el uso de una molécula aglutinante, puede ser ventajoso exponer las células a la molécula aglutinante a una razón o rango de razones específicas de la molécula aglutinante con respecto al componente diana de interés. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar una cantidad de aglutinante a una colección de células de tal manera que haya una razón lineal entre la cantidad de componente de interés en las células y la cantidad de aglutinante que se une al componente de interés en las 25 células. Por ejemplo, puede no ser deseable tener demasiado poco aglutinante (de modo que no haya suficiente aglutinante para unirse a todos los componentes de interés en las células) o tener demasiado aglutinante (de modo que el aglutinante se une de forma no específica a las células).

Utilizando métodos tradicionales, puede ser difícil proporcionar un nivel apropiado de aglutinante a una muestra para 30 medir con precisión la cantidad de componente de interés en una población celular en la muestra, debido al hecho de que el tamaño de la población celular y/o el componente de interés en la muestra pueden variar significativamente entre diferentes muestras. En contraste, en la presente memoria se proporcionan métodos, dispositivos y sistemas para teñir dinámicamente muestras celulares para acomodar las muestras que contienen una amplia gama de poblaciones celulares y componentes de interés.

En una realización, se proporciona un método para la medición de un componente de interés en células de una población celular en una muestra. El método no está limitado a, si no que puede incluir una o más de las siguientes 35 etapas.

En primer lugar, se puede obtener una medición cuantitativa o semicuantitativa de un marcador presente en las células de la población celular. El marcador puede ser cualquier marcador que esté presente en la población celular de interés, y puede ser un marcador exclusivamente presente en la población celular de interés (es decir, no está presente en ningún otro tipo de célula en la muestra). La medición del marcador puede ser por cualquier método, 40 siempre que el método no destruya la muestra, y puede utilizar cualquier sistema o dispositivo. Un aglutinante que reconozca el marcador se puede mezclar con la muestra. El aglutinante puede tener una molécula unida para facilitar la detección del aglutinante (p. ej., un marcador fluorescente). En un ejemplo, el marcador puede ser detectado y/o medido por espectrofotometría de fluorescencia. En realizaciones en las que el aglutinante tiene una marca fluorescente y el marcador se mide mediante espectrofotometría de fluorescencia, se puede utilizar la 45 espectrofotometría de fluorescencia para medir la fluorescencia en masa de la muestra o una porción de la misma, en lugar de medir la fluorescencia de las células individuales.

En segundo lugar, basándose en la medición cuantitativa o semi-cuantitativa del marcador presente en las células de la población celular, se puede determinar una cantidad o concentración aproximadas de células de la población celular presente en la muestra. La cantidad o la concentración aproximadas de las células en la población celular 50 presente en la muestra se pueden determinar, por ejemplo, mediante el uso de una curva de calibración. Las curvas de calibración se pueden preparar y/o pueden estar disponibles para diferentes combinaciones de marcadores/aglutinantes. Las curvas de calibración se pueden desarrollar, por ejemplo, midiendo la señal de cantidades conocidas de células que tienen un marcador determinado y se unen a un determinado aglutinante. En algunas realizaciones, la cantidad o concentración aproximadas de células de la población celular presente en la muestra 55 se pueden determinar con la ayuda de un ordenador. En algunos aspectos, se pueden determinar la cantidad o concentración aproximadas de células de la población celular presente en la muestra, siendo semejante determinación de no más de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400, o 500% de la verdadera concentración.

En tercer lugar, basándose en la cantidad o concentración determinadas de células en la población celular presente en la muestra, se puede seleccionar una cantidad de un reactivo para añadir a la muestra, en donde el reactivo se une específicamente al componente de interés en las células de la población celular. El reactivo puede ser o puede incluir cualquier molécula que se una específicamente al componente de interés. Por ejemplo, el reactivo puede ser un aglutinante, tal como un anticuerpo. El reactivo se puede configurar de tal manera que se pueda detectar fácilmente (p. ej., por medio de fluorescencia o luminiscencia) y/o de tal manera que, al menos en algunas circunstancias, produzca una señal detectable. En algunas realizaciones, el reactivo se puede unir a una molécula para facilitar la detección del reactivo. La cantidad de reactivo añadida a la muestra puede ser cualquier cantidad. En algunas realizaciones, la cantidad de reactivo se puede añadir a la muestra de manera que haya una relación aproximadamente lineal entre el nivel de componente de interés en las células individuales de la población celular y la señal producida por los reactivos unidos a los componentes de interés en células individuales de la población celular.

En cuarto lugar, después de seleccionar la cantidad de un reactivo para añadir a la muestra, se puede añadir a la muestra la cantidad seleccionada de reactivo.

15 En quinto lugar, las células en la muestra se pueden analizar para determinar el reactivo unido al componente de interés.

En sexto lugar, basándose en la cantidad de reactivo unida al componente de interés, se puede determinar la cantidad del componente de interés en las células de la población celular de la muestra.

20 En algunas realizaciones, las etapas quinta y sexta se pueden realizar juntas de manera que la medición de la cantidad de reactivo unida al componente de interés sea suficiente para identificar la cantidad del componente de interés en las células de la población celular de la muestra.

En otras realizaciones, se proporcionan en la presente memoria sistemas y dispositivos para la tinción dinámica de las muestras. Los sistemas y dispositivos pueden contener, sin limitación, un espectrofotómetro y un microscopio de fluorescencia. En una realización, se puede configurar un sistema o método para la tinción dinámica de muestras como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 13/244,947 o 13/355,458. En una realización, los sistemas y dispositivos se pueden automatizar para determinar la cantidad de reactivo para añadir a una muestra para determinar la cantidad de un componente de interés en células de una población celular en una muestra, basándose en la medición de una cantidad de marcador presente en las células de la población celular. En otra realización, los sistemas y dispositivos se pueden automatizar para determinar una cantidad de reactivo para añadir a una muestra para determinar la cantidad de un primer componente en células de una población celular en una muestra, basándose en una medición de una cantidad de un segundo componente en las células de la población celular en la muestra.

Enfoque automático basado en el contexto

En algunas realizaciones, se proporcionan métodos, sistemas y dispositivos en la presente memoria para el enfoque automático de microscopía basado en el contexto.

35 El tamaño (p. ej., longitud, altura u otra medida) de muchos objetos clínicamente relevantes en muestras biológicas abarca un amplio intervalo. Por ejemplo, las bacterias suelen tener una longitud aproximada de 1 µm, los eritrocitos suelen tener una longitud aproximada de 6-8 µm, los leucocitos tienen una longitud aproximada de 10-12 µm, las células epiteliales pueden tener una longitud aproximada de 100 µm y los moldes y los cristales pueden tener una longitud aproximada de 200-300 µm. Además, hay muchos elementos amorfos, tales como el moco urinario, que existen en forma de hebras o filamentos que pueden oscilar entre aproximadamente 10-400 µm de longitud.

40 Un desafío en microscopía es la obtención de imágenes precisas de campos de visión que contengan una composición desconocida y arbitraria de objetos de varios tamaños, tales como los descritos anteriormente. Dado que la profundidad del enfoque de muchos objetivos de microscopía es limitada (por lo general, aproximadamente 1-

45 10 µm), para un campo de visión dado que contiene elementos de varios tamaños, es posible que se deban obtener múltiples planos focales para el campo de visión dado con el fin de obtener imágenes nítidas precisas de los diversos elementos dentro del campo de visión. Un problema con muchos métodos tradicionales de enfoque automático es que están diseñados para centrarse en la característica dominante en un campo de visión, de modo

50 que se pueda maximizar la nitidez de esa característica. Tales métodos pueden ser ineficaces para capturar elementos de varios tamaños en una muestra.

En una realización, se proporciona un método para el enfoque automático de microscopía basado en el contexto, que incluye mezclar una partícula de referencia de un tamaño conocido con una muestra para microscopía. En realizaciones, se añade más de una partícula de referencia a la muestra; preferiblemente todas, o sustancialmente todas, estas partículas de referencia son del mismo tamaño conocido. En realizaciones, se conoce el número de partículas de referencia añadido a un volumen particular de muestra. Las partículas de referencia se pueden detectar durante la microscopía y se pueden utilizar para lograr el enfoque. Mediante el uso de las partículas de referencia para lograr el enfoque, se pueden seleccionar los planos focales independientemente de la composición general de la imagen. En un aspecto, el método puede ser útil para lograr enfocar una muestra que tiene una composición de

elementos desconocida. En otro aspecto, el método puede ayudar a la generación de planos de enfoque precisos, independientemente de la precisión del microscopio o el equipo relacionado con la microscopía. Por ejemplo, cuando se selecciona un plano de enfoque basado en la retroalimentación de la nitidez de las partículas de referencia dentro de un campo de visión, se puede lograr un enfoque preciso sobre varios elementos dentro de una muestra, independientemente del nivel de precisión o exactitud del equipo de enfoque [p. ej., la actuación del objetivo del microscopio, la forma del portamuestras (p. ej., una cubeta o portaobjetos), o la no uniformidad de un portamuestras].

En una realización, una partícula de referencia puede contener, o estar marcada con, una molécula para facilitar la detección de la partícula durante la microscopía. En un ejemplo, una partícula de referencia puede estar marcada con o contener, una molécula fluorescente. La molécula fluorescente puede absorber la luz en una primera longitud de onda de la luz y, en respuesta a la absorbancia de la primera longitud de onda de la luz, puede emitir luz a una segunda longitud de onda. En una realización, se puede exponer una muestra mezclada con una partícula de referencia a una longitud de onda de luz capaz de excitar una molécula fluorescente en una partícula de referencia de interés y se puede medir la luz emitida desde la molécula fluorescente. La fluorescencia específica de una partícula de referencia se puede utilizar para detectar partículas de referencia, y la información de las partículas de referencia detectadas en una muestra se puede utilizar para el enfoque automático.

Las partículas de referencia pueden ser de cualquier forma, tales como esféricas o cuboides. Las partículas de referencia incluyen, sin limitación, cuentas y microesferas. Las partículas de referencia pueden tener cualquier tamaño, por ejemplo con un diámetro o longitud de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, o 500 µm. Las partículas de referencia pueden estar elaboradas con, o pueden contener, cualquier material adecuado, tal como poliestireno, polietileno, látex, material acrílico o vidrio. Por ejemplo, una partícula de referencia puede ser una cuenta de poliestireno, p. ej., una cuenta de poliestireno que tiene un diámetro de entre aproximadamente 0,1 µm y aproximadamente 50 µm; o entre aproximadamente 1 µm y aproximadamente 20 µm; o entre aproximadamente 5 µm y aproximadamente 15 µm; o que tiene un diámetro de aproximadamente de 10 µm.

En una realización, se proporciona un método para enfocar un microscopio, que puede incluir una o más de las siguientes etapas. En primer lugar, una muestra que contiene un objeto para el análisis microscópico (p. ej., bacterias, eritrocitos, etc.) se puede mezclar con una partícula de referencia. La partícula de referencia puede contener o estar marcada con, una molécula para facilitar la detección de la partícula, tal como un fluoróforo. En segundo lugar, la mezcla que contiene la partícula de referencia y la muestra se puede colocar en una trayectoria de luz de un microscopio, por ejemplo en una cubeta o un portaobjetos. Opcionalmente, la partícula de referencia puede hundirse hasta el fondo de la muestra en la cubeta o el portaobjetos, de modo que la partícula de referencia se apoye sobre la superficie más baja de la cubeta o el portaobjetos que está en contacto con la muestra. El microscopio puede ser de cualquier tipo, incluyendo un microscopio de fluorescencia. En tercer lugar, la mezcla se puede exponer a un haz de luz configurado para visualizar la partícula de referencia. El haz de luz puede ser de cualquier tipo y puede tener cualquier orientación con respecto a la partícula de referencia. Por ejemplo, el haz de luz puede estar a una longitud de onda capaz de excitar un fluoróforo en el interior de o adherido a la partícula de referencia. La exposición de la partícula de referencia al haz de luz puede dar como resultado, por ejemplo, la generación y emisión de luz a una longitud de onda particular a partir de la partícula de referencia y/o la dispersión de la luz de la partícula de referencia. En cuarto lugar, la luz emitida o dispersada de la partícula de referencia puede ser detectada por el microscopio, y esta información se puede utilizar para determinar la posición de la partícula de referencia dentro de la mezcla y/o para enfocar el microscopio. Opcionalmente, el microscopio se puede enfocar en un plano de enfoque adecuado para objetos de tamaño similar a la partícula de referencia. Se puede obtener una imagen del microscopio por medio de un sensor de imagen. La imagen se puede guardar y/o utilizar para el análisis de imágenes.

En algunas realizaciones, se puede añadir una pluralidad de partículas de referencia a una muestra. Las partículas de referencia pueden ser todas del mismo tamaño, o pueden ser de diferentes tamaños. En algunas realizaciones, las partículas de referencia de diferentes tamaños contienen diferentes fluoróforos. Los diferentes fluoróforos pueden tener diferentes longitudes de onda de absorción, diferentes longitudes de onda de emisión, o ambas.

En una realización, se proporciona un método para enfocar un microscopio, que incluye mezclar más de una partícula de referencia de tamaño conocido con una muestra para microscopía, en donde al menos dos de las partículas de referencia son de diferentes tamaños y contienen diferentes fluoróforos. El método puede incluir una o más de las siguientes etapas. En primer lugar, una muestra que contiene un objeto para análisis microscópico se puede mezclar con dos o más partículas de referencia, en donde al menos dos de las partículas de referencia tienen diferentes tamaños y contienen diferentes fluoróforos (es decir, la "primera partícula de referencia" y la "segunda partícula de referencia"). En segundo lugar, la mezcla que contiene las partículas de referencia y la muestra se puede colocar en la trayectoria de luz de un microscopio. El microscopio puede ser de cualquier tipo, incluyendo un microscopio de fluorescencia. En tercer lugar, la mezcla se puede exponer a un haz de luz configurado para visualizar la primera partícula de referencia. El haz de luz puede ser de cualquier tipo y puede tener cualquier orientación con respecto a la primera partícula de referencia. Por ejemplo, el haz de luz puede estar a una longitud de onda capaz de excitar un fluoróforo dentro de o unido a, la primera partícula de referencia. La exposición de la primera partícula de referencia al haz de luz puede dar como resultado la generación y emisión o dispersión de la luz

a una longitud de onda particular a partir de la primera partícula de referencia. En cuarto lugar, la luz emitida o dispersada desde la primera partícula de referencia se puede detectar, y esta información se puede utilizar para determinar la posición de la primera partícula de referencia dentro de la mezcla y/o para enfocar el microscopio en un primer plano de enfoque adecuado para objetos de tamaño similar a la primera partícula de referencia.

5 Opcionalmente, se puede obtener una imagen del primer plano focal mediante un sensor de imagen. La imagen se puede guardar y/o utilizar para el análisis de imágenes. En quinto lugar, la mezcla se puede exponer a un haz de luz configurado para visualizar la segunda partícula de referencia. El haz de luz puede ser de cualquier tipo y puede tener cualquier orientación con respecto a la segunda partícula de referencia. La exposición de la segunda partícula de referencia al haz de luz puede dar como resultado la generación y emisión o dispersión de la luz a una longitud de onda particular a partir de la segunda partícula de referencia. En sexto lugar, la luz emitida o dispersada de la

10 segunda partícula de referencia puede ser detectada, y esta información se puede utilizar para determinar la posición de la segunda partícula de referencia dentro de la mezcla y/o para enfocar el microscopio en un segundo plano de enfoque adecuado para objetos de tamaño similar a la segunda partícula de referencia. Opcionalmente, se

15 puede obtener una imagen del segundo plano focal mediante un sensor de imagen. La imagen se puede guardar y/o utilizar para el análisis de imágenes.

En otras realizaciones, en la presente memoria se proporcionan sistemas y dispositivos para el enfoque automático de microscopía basado en el contexto. Los sistemas y dispositivos pueden contener, sin limitación, un microscopio de fluorescencia. En una realización, los sistemas y dispositivos se pueden automatizar para añadir una partícula de referencia que tenga un tamaño conocido a una muestra para el análisis microscópico para formar una mezcla, para colocar la mezcla en la trayectoria de la luz de un microscopio, para exponer la mezcla a un haz de luz configurado para visualizar la partícula de referencia, para determinar la posición de la partícula de referencia dentro de la mezcla y/o para enfocar el microscopio en función de la posición de la partícula de referencia dentro de la mezcla. En una realización, se puede configurar un sistema o método para el enfoque automático de microscopía basado en el contexto como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 13/244.947 o 13/355.458,

25 Localización de un portamuestras

En algunas realizaciones, se proporcionan métodos, sistemas y dispositivos en la presente memoria para determinar la localización de un portamuestras, o de una parte de, o marca indicial en, un portamuestras. Semejante determinación es preferiblemente una determinación precisa, y es útil para identificar células, partículas u otros objetos en un campo de visión dentro de un portamuestras incluso después de que se haya movido un portamuestras, o se haya alterado un campo de visión (p. ej., cambiando el enfoque, o mediante inspección de diferentes zonas en un portamuestras).

En realizaciones, se puede utilizar un mecanismo de retroalimentación basado en imágenes para determinar de manera exacta y precisa una cierta localización en una cubeta, p. ej., en un canal u otra región que contiene una muestra (véase, p. ej., una zona de análisis 608 que se muestra en las Figuras 7 y 8). Tal determinación, en particular cuando se mueve el portamuestras, y después se hace volver a una posición previa, es importante para la comparación de imágenes y mediciones ópticas tomadas antes de semejante movimiento y después de semejante movimiento. La variabilidad de múltiples fuentes puede afectar a la posición de la muestra con respecto al eje del sistema de obtención de imágenes; por ejemplo, la variabilidad en las partes de la cubeta, la variabilidad en el ensamblaje de la cubeta, la variabilidad en el posicionamiento de la cubeta en el sistema de obtención de imágenes y otras posibles fuentes de variabilidad pueden afectar a la posición de una muestra con respecto al sistema de obtención de imágenes, incluso si la muestra permanece en la misma posición dentro del portamuestras. Los métodos para identificar y caracterizar la posición de un portamuestras con respecto a un sistema de obtención de imágenes se describen en la presente memoria. Por ejemplo, con el fin de obtener una imagen precisa y reproducible de una zona de interés en una cubeta, se puede ejecutar un programa de registro de cubetas. En 45 realizaciones, semejante programa comienza analizando las imágenes tomadas en una localización predefinida en un portamuestras, estando la localización predefinida cerca de una característica de registro o marcador indicial dentro del campo de visión, o es detectable por el programa. Un programa de registro de cubetas comprende un programa de procesamiento de imágenes, cuyo programa de procesamiento de imágenes busca la existencia del marcador indicial en la imagen y devuelve una respuesta de sí/no (con respecto a si el marcador indicial se encuentra o no dentro de la región inspeccionada) o una probabilidad de que el marcador que está en la imagen. En los casos en que el marcador indicial no se encuentra en el área que se ha inspeccionado, se utiliza a continuación un algoritmo de búsqueda, que mueve el área de inspección a una localización diferente en el portamuestras y repite la imagen. Este procedimiento se repite hasta que el programa encuentra el marcador de indicial referencia (es decir, consigue un "sí" a la pregunta de si el marcador indicial se encuentra o no dentro de la región inspeccionada, o maximiza la probabilidad de que el marcador esté dentro de esa región). Una vez que se identifica la posición del marcador indicial, se pueden determinar todas las demás posiciones en o sobre el portamuestras, ya que se conocen las dimensiones y el diseño del portamuestras. Por lo tanto, tras la identificación de la localización del marcador indicial, se pueden encontrar y obtener imágenes de cualquier punto de interés para la obtención de imágenes, ya que también se conoce la localización del punto de interés (es decir, se conoce su distancia y orientación del marcador indicial, y, como se conoce la posición del marcador indicial, también se conoce el punto de interés). En realizaciones, el marcador indicial puede ser o puede incluir una característica diseñada especialmente en la propia cubeta (p. ej., puede ser un orificio, una protuberancia, un patrón impreso o moldeado, u otra característica) que se puede fabricar para que esté en la misma localización para cada parte a cualquier tolerancia

deseada. En realizaciones, un marcador indicial puede ser o puede incluir una característica de la cubeta (p. ej., el borde de un canal) que está siempre a una distancia fija del punto de interés (p. ej., donde el marcador indicial es el borde del canal, el marcador indicial está siempre a una distancia fija desde el eje central del canal).

Recuento de células/Enumeración de células

- 5 En algunas realizaciones, se proporcionan métodos, sistemas y dispositivos en la presente memoria para enumerar células en una muestra.

Ciertos métodos tradicionales para teñir muestras que contienen células implican teñir un volumen específico de una muestra (p. ej., sangre) con una concentración o cantidad particular de tinte. Esto se puede denominar "tinción volumétrica". La tinción volumétrica tiene varios inconvenientes, entre los que se incluyen: (i) no aborda las variaciones normales en las subpoblaciones celulares entre diferentes sujetos (p. ej., diferentes sujetos sanos pueden tener un número muy diferente de subpoblaciones de células, tales como las células T CD3+ (donde "CD3+" indica que las células T expresan el marcador CD3) y (ii) no aborda que las muestras patológicas pueden tener una composición celular drásticamente diferente cuando se comparan con muestras sanas (p. ej., el porcentaje y el número de células T CD3+ en sangre son enormemente elevados en pacientes con leucemia de células T por encima del porcentaje y el número en sujetos sanos).

Para una tinción precisa y reproducible de muestras que contienen células, puede ser deseable añadir una cantidad específica de un tinte celular (p. ej., colorantes de ADN, anticuerpos, aglutinantes, etc.) a un número o una concentración específicos de células. Por ejemplo, puede ser conveniente añadir 0,2 microgramos de un tinte particular para glóbulos blancos por 1000 glóbulos blancos en una muestra. Después de un período de incubación del colorante con las células, se puede lavar una muestra para eliminar el exceso de colorante (no unido), prepararla para una densidad celular apropiada para la microscopía y obtener imágenes. De esta manera, se puede optimizar o normalizar un tinte o un procedimiento de tinción para un número de células particular.

En una realización, se proporciona un método para enumerar el número de células de interés en una muestra. El método puede incluir una o más de las siguientes etapas o elementos. Se puede añadir a la muestra un primer tinte que se unirá a las células de interés en una muestra. La mezcla del primer tinte y la muestra se puede incubar. Las células en la mezcla del primer tinte y la muestra se pueden lavar para eliminar el tinte en exceso (no unido). Las células lavadas teñidas con un primer tinte se pueden preparar en un volumen deseado para su análisis adicional. Las células lavadas teñidas con un primer tinte se pueden analizar mediante un espectrofotómetro. Los datos del espectrofotómetro se pueden utilizar para enumerar el número aproximado de células en la muestra. Por ejemplo, el primer tinte puede ser un colorante fluorescente que se une a los ácidos nucleicos, y el espectrofotómetro puede incluir una fuente de luz que emite luz a una longitud de onda de excitación del colorante fluorescente, y un sensor de luz que puede detectar luz en la longitud de onda de emisión del colorante fluorescente. En este ejemplo, basándose en la señal fluorescente del colorante, se puede calcular la cantidad aproximada de ácido nucleico en la muestra, y a partir de esta cantidad aproximada de ácido nucleico en la muestra, se puede determinar el número aproximado de células en la muestra. Basándose en el número de células en la muestra, se puede añadir a la muestra un segundo tinte que se unirá a las células de interés en una muestra. En realizaciones, la cantidad del segundo tinte añadida a la muestra se puede determinar en vista del número aproximado de células determinadas utilizando el primer tinte. En realizaciones, la cantidad del segundo tinte añadida a la muestra se puede calcular utilizando el número de células determinado mediante el uso del primer tinte, con el fin de que se pueda obtener una razón deseada del segundo tinte por célula. La mezcla del segundo tinte y la muestra puede ser incubada. Las células en la mezcla del segundo tinte y la muestra se pueden lavar para eliminar el exceso de tinte. Las células lavadas teñidas con un segundo tinte se pueden preparar en un volumen deseado para un análisis adicional. Las células lavadas teñidas con un segundo tinte se pueden analizar por microscopía.

Enumeración de células en una muestra antes de determinar la ploidía de las células

- 45 En una realización, se proporciona un método para enumerar células en una muestra antes de determinar la ploidía de las células, en donde el método incluye una o más de las siguientes etapas o elementos. Se puede añadir a la muestra un primer tinte que se une a las células de interés en la muestra y que es espectralmente distinto de la emisión de un colorante de ADN. Las células de interés pueden ser, por ejemplo, glóbulos blancos. El primer tinte puede ser, por ejemplo, un anticuerpo conjugado con fluoróforo. Un anticuerpo conjugado con fluoróforo puede unirse, por ejemplo, a un antígeno ampliamente expresado (p. ej., CD45), o puede unirse a un antígeno expresado por una subpoblación específica de células (p. ej., CD3 para células T). La mezcla del primer tinte y la muestra puede ser incubada. Las células en la mezcla del primer tinte y la muestra se pueden lavar para eliminar el tinte en exceso (no unido). Las células lavadas teñidas con un primer tinte se pueden preparar en un volumen deseado para un análisis adicional. Las células lavadas teñidas con un primer tinte se pueden analizar por medio de un espectrofotómetro. Los datos del espectrofotómetro se pueden utilizar para enumerar el número aproximado de células en la muestra. Basándose en el número de células en la muestra, se puede añadir a la muestra un segundo tinte que se unirá a las células de interés en una muestra. La segunda tinción puede ser un colorante de ADN, tal como yoduro de propidio o 4',6-diamidino-2-fenilindol ("DAPI"). En realizaciones, la cantidad del segundo tinte añadida a la muestra se puede determinar en vista del número aproximado de células determinado utilizando el primer tinte. En realizaciones, la cantidad del segundo tinte añadida a la muestra se puede calcular utilizando el

número de células determinado mediante el uso del primer tinte, con el fin de poder obtener una razón deseada de segundo tinte por célula. La mezcla del segundo tinte y la muestra se puede incubar. Las células en la mezcla del segundo tinte y la muestra se pueden lavar para eliminar el exceso de tinte. Las células lavadas teñidas con el segundo tinte se pueden preparar en un volumen deseado para un análisis adicional. Las células lavadas teñidas con un segundo tinte se pueden analizar para determinar la ploidía mediante microscopía.

5 En los métodos para determinar la ploidía de las células, puede ser importante combinar un número dado de células para el análisis de la ploidía con una cierta cantidad o concentración de tinte de ADN, con el fin de generar datos precisos y uniformes con respecto a la ploidía de las células. En un ejemplo, el número de glóbulos blancos por volumen de sangre puede variar dentro de una población sana y, por lo tanto, puede ser conveniente determinar el 10 número de glóbulos blancos en un volumen de sangre antes de tratar de teñir los glóbulos blancos para el análisis de la ploidía.

10 Los métodos proporcionados anteriormente para determinar la ploidía de las células también se pueden realizar para cualquier método en el que se desee enumerar las células en una muestra antes de determinar un atributo relacionado con el contenido de ácido nucleico de una célula. Por ejemplo, el método anterior se puede utilizar con 15 métodos que implican la enumeración de células en una muestra antes de determinar la morfología de los núcleos de las células, el tamaño de los núcleos de las células, la razón del área de los núcleos con respecto al área celular total, etc.

Enumeración de células en una muestra antes de la tinción de la superficie celular

20 En una realización, se proporciona un método para enumerar células en una muestra antes de la tinción de la superficie celular, en donde el método incluye una o más de las siguientes etapas o elementos. Se puede añadir a la muestra un primer tinte que se une a las células de interés en la muestra y que es espectralmente distinto de la emisión de un colorante que se va a utilizar para teñir la superficie de las células de interés. Las células de interés pueden ser, por ejemplo, glóbulos blancos. El primer tinte puede ser, por ejemplo, un colorante de ADN (p. ej., yoduro de propidio, DRAQ5® o DAPI). La mezcla del primer tinte y la muestra se puede incubar. Las células de la 25 mezcla del primer tinte y la muestra se pueden lavar para eliminar el tinte en exceso (no unido). Las células lavadas teñidas con un primer tinte se pueden preparar en un volumen deseado para un análisis adicional. Las células lavadas teñidas con un primer tinte se pueden analizar mediante un espectrofotómetro. Los datos del espectrofotómetro se pueden utilizar para enumerar el número aproximado de células en la muestra. Basándose en 30 el número de células en la muestra, se puede añadir a la muestra un segundo tinte que se unirá a las células de interés en una muestra. En realizaciones, la cantidad del segundo tinte añadida a la muestra se puede determinar en vista del número aproximado de células determinadas utilizando el primer tinte. En realizaciones, la cantidad del segundo tinte añadido a la muestra se puede calcular utilizando el número de células determinado mediante el uso 35 del primer tinte, con el fin de poder obtener una razón deseada del segundo tinte por célula. El segundo tinte puede ser, por ejemplo, un anticuerpo conjugado con fluoróforo. Un anticuerpo conjugado con fluoróforo se puede unir, por ejemplo, a un antígeno ampliamente expresado (p. ej., CD45), o se puede unir a un antígeno expresado por una subpoblación específica de células (p. ej., CD3 para células T). La mezcla del segundo tinte y la muestra se puede incubar. Las células de la mezcla del segundo tinte y la muestra se pueden lavar para eliminar el exceso de tinte. Las células lavadas teñidas con un segundo tinte se pueden preparar en un volumen deseado para un análisis adicional. Las células lavadas teñidas con un segundo tinte se pueden analizar para determinar un antígeno de 40 superficie celular mediante microscopía.

En los métodos para la tinción de células con antígeno de superficie celular, puede ser importante combinar un número dado de células para el análisis con una cierta cantidad o concentración de tinte de antígeno de superficie celular, con el fin de generar datos precisos y uniformes con respecto al contenido de las superficies celulares. En un ejemplo, el número de glóbulos blancos por volumen de sangre puede variar dentro de una población sana (la 45 sangre de sujetos sanos generalmente tiene entre aproximadamente 3.000 y 10.000 GB por μL), y por lo tanto, puede ser conveniente determinar el número de glóbulos blancos en un volumen de sangre antes de tratar de teñir los glóbulos blancos para los antígenos de la superficie celular. En otro ejemplo, el número de glóbulos blancos por volumen de sangre puede variar entre sujetos sanos y enfermos (p. ej., los pacientes con linfoma pueden tener hasta 50.000 GB por μL de sangre), y por lo tanto, puede ser deseable determinar el número de glóbulos blancos en un 50 volumen de sangre antes de intentar teñir los glóbulos blancos para los antígenos de la superficie celular.

Por lo tanto, como ejemplo teórico, un paciente sano puede tener 5.000 células por microlitro de sangre, y 500 de 55 ellas son células T CD3+, mientras que un paciente con linfoma puede tener 50.000 células por microlitro de sangre y 45.000 de estas son células T CD3+. Si tradicionalmente se tiñen 100 microlitros de sangre, una muestra de un sujeto sano contendría aproximadamente 500.000 células totales, de las cuales aproximadamente 50.000 células serían células T CD3+. Una muestra de 100 microlitros de un sujeto con linfoma contendría aproximadamente 5.000.000 de células totales, de las cuales aproximadamente 4.500.000 serían células T CD3+. En este ejemplo teórico, la muestra patológica contiene diez veces el número de células totales y noventa veces el número de células T CD3+, en comparación con una muestra de un sujeto sano. Si la muestra patológica se tiñera con un enfoque de "tinción volumétrica" tradicional que está optimizado para muestras de sujetos sanos, la muestra del sujeto con linfoma puede resultar teñida insuficientemente. Por esta razón, por ejemplo, los presentes métodos en los que se 60 utiliza una estimación previa del número de células en una muestra para ajustar la cantidad de colorante aplicada a

la muestra proporcionan ventajas sobre los métodos de tinción volumétrica tradicionales.

Por consiguiente, los métodos proporcionados en la presente memoria se pueden utilizar para enumerar células en una muestra antes de la tinción celular, con el fin de generar datos precisos y/o uniformes con respecto a las muestras.

5 Velocidades del método

Los métodos, sistemas y dispositivos proporcionados en la presente memoria pueden apoyar la obtención rápida de resultados de análisis de muestras. Los métodos proporcionados en la presente memoria pueden proporcionar resultados de análisis en menos de, por ejemplo, aproximadamente 6 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora, 45 minutos, 30 minutos, 15 minutos, 10 minutos o 5 minutos desde el inicio del método.

- 10 Los resultados del análisis rápido se pueden utilizar para proporcionar información en tiempo real relevante para el tratamiento, diagnóstico o seguimiento de un paciente. Por ejemplo, los resultados del análisis rápido se pueden utilizar para guiar una decisión de tratamiento de un cirujano que opera a un paciente. Durante la cirugía, un cirujano puede obtener una muestra biológica de un paciente para su análisis. Al recibir un análisis rápido de una muestra mediante el método que se proporciona en la presente memoria, un cirujano puede tomar una decisión de tratamiento durante el curso de la cirugía.

15 En otro ejemplo, los resultados del análisis rápido proporcionados por los métodos, sistemas y dispositivos proporcionados en la presente memoria pueden respaldar la información que recibe un paciente sobre una muestra biológica proporcionada por el paciente en un punto de servicio durante la misma visita al lugar de servicio en el que el paciente proporcionó la muestra biológica.

- 20 Por ejemplo, los autores de la presente solicitud describen en la presente memoria un ensayo rápido que se puede utilizar para preparar una muestra de sangre completa para el análisis de glóbulos blancos en busca de la presencia de múltiples marcadores y tipos de células. Dicho ensayo es útil para preparar muestras de sangre completa para el análisis de imágenes; las muestras están listas para la obtención de imágenes en menos de aproximadamente 20 minutos, o en menos de aproximadamente 15 minutos.

25 *Ensayo rápido de glóbulos blancos a partir de sangre completa*

Este ensayo prepara muestras de sangre completa para el análisis citométrico de los glóbulos blancos en menos de aproximadamente 15 minutos o menos de aproximadamente 20 minutos. El análisis citométrico automatizado de tales células preparadas también se puede realizar rápidamente, de modo que el análisis citométrico de GB se puede realizar a partir de sangre completa en aproximadamente media hora o menos. Además, este ensayo utiliza solo un pequeño volumen de la muestra de sangre, por lo que ahorra recursos y es menos molesto o incómodo para un sujeto que los análisis que requieren mayores volúmenes de sangre.

30 Los reactivos utilizados en este ensayo incluyen: solución salina tamponada con fosfato, tampón Lyse Fix, cuentas, tampón de resuspensión y cócteles de reactivos que contienen colorantes y anticuerpos conjugados con colorante. Los anticuerpos están dirigidos a marcadores específicos de GB.

- 35 Solución salina tamponada con fosfato (PBS): NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na₂HP04 8 mM, KH₂P04 1,5 mM, pH ajustado a un pH entre pH 7,2 y pH 7,4 (con HCl).

Tampón de resuspensión (RSB): albúmina de suero bovino en PBS al 5%.

Tampón Lyse Fix: saponina en BS al 0,0266% con paraformaldehído (PFA) al 10%, donde "%" indica gramos/100 mL (la razón final es de aproximadamente 13:1 de saponina PBS:PFA).

- 40 Cóctel de Reactivos 1: DRAQ5®, anticuerpo anti-CD14 conjugado con colorante Pacific Blue™, bloque Fc (p. ej., inmunoglobulina tal como IgG de ratón), en BSA en PBS al 0,2%.

Cóctel de Reactivos 2: anticuerpo anti-CD16 conjugado con colorante ficoeritrina (PE), anticuerpo anti-CD45 conjugado con colorante Alexa Fluor® 647, anticuerpo anti-CD123 conjugado con colorante PECy5, bloque de Fc (p. ej., inmunoglobulina), en BSA en PBS al 15%.

- 45 Las etapas del ensayo incluyen:

Obtener sangre completa de un sujeto.

Colocar 50 µL de sangre completa en un tubo. Si se desea, la muestra de sangre se puede adquirir directamente en un tubo. Cuando 50 µL es la cantidad total de sangre extraída del sujeto, toda la muestra se añade a, o se adquiere de un tubo; cuando se obtienen más de 50 µL de un sujeto, los 50 µL representan una alícuota de la muestra.

- 50 Centrifugar la muestra a 1200 xg durante 3 minutos.

Retirar 20 µL de plasma del tubo.

Colocar el tubo sobre el bloque de calor (para elevar la temperatura a 37°C), añadir 20 µL de RSB, y mezclar cuidadosamente.

5 Añadir el Cóctel 1 (aproximadamente 5 µL). (En realizaciones, el Cóctel 1 se puede añadir directamente a la sangre completa, y se pueden omitir las etapas previas de centrifugación, eliminación de una parte alícuota de plasma y reemplazo con RSB).

Incubar la muestra a 37°C durante 2 minutos.

10 Añadir el tampón Lyse Fix (a una razón 6:1 de (tampón Lyse Fix) con respecto a (sangre teñida); aproximadamente 300-350 µL). Se puede incluir una concentración conocida de cuentas en el tampón Lyse Fix para proporcionar dianas (partículas de referencia) para enfocar y proporcionar una calibración para la concentración de la muestra (p. ej., como se ha descrito anteriormente bajo el encabezamiento "Enfoque Automático basado en el Contexto"). Se pueden utilizar cuentas de poliestireno u otras cuentas, con diámetros de aproximadamente 1 micra a aproximadamente 30 micras. Por ejemplo, se pueden utilizar cuentas de poliestireno de 10 micras a una concentración de aproximadamente 100 cuentas a aproximadamente 2.000 cuentas por microlitro.

15 Incubar en el tampón Lyse Fix a 37°C durante un total de 3 minutos; aproximadamente 1,5 minutos después de la adición del tampón, mezclar pipeteando arriba y abajo la solución cinco veces.

Centrifugar la mezcla de muestra a 1200 xg durante 3 minutos.

Eliminar el sobrenadante (aproximadamente 350 µL). Guardar el sobrenadante para ajustar el volumen, si es necesario, en las etapas posteriores.

20 Añadir el Cóctel 2 (aproximadamente 15 µL) para proporcionar la mezcla final.

Cargar la mezcla final en una cubeta para la obtención de imágenes precalentada (37°C).

Incubar la cubeta a 37°C durante 5 minutos antes de la obtención de imágenes.

Tomar imágenes de la muestra.

25 Por lo tanto, la muestra está lista para la obtención de imágenes en menos de aproximadamente 15 minutos. En realizaciones, algunas de las etapas se pueden acortar (p. ej., en realizaciones alternativas, se pueden acortar una etapa de centrifugación o una etapa de incubación). Dado que los métodos descritos anteriormente preparan la muestra utilizando cócteles que incluyen múltiples colorantes, el análisis de estas muestras para determinar la presencia de varios marcadores de tipo celular se puede realizar dentro de un solo campo de visión, proporcionando una obtención de imágenes de las muestras eficaz con una duplicación mínima del esfuerzo. Las imágenes de dispersión de luz de estos mismos campos de visión proporcionan otro aspecto de análisis que se puede aplicar de manera eficaz sin requerir muestras separadas o campos de visión separados para los diversos modos de análisis de imágenes de las muestras. La inclusión de partículas de referencia de un tamaño conocido ayuda adicionalmente a la obtención de imágenes al permitir el uso del enfoque automático y, puesto que la concentración de las partículas de referencia es conocida, proporciona una medición independiente de la dilución de la muestra y la concentración de células en cada imagen.

30 35 La obtención de imágenes de la muestra preparada también se puede realizar rápidamente; por ejemplo, tal imagen se puede realizar en aproximadamente 10 minutos (típicamente entre aproximadamente 2 minutos y aproximadamente 12 minutos) mediante dispositivos automáticos que tienen las características que se describen en la presente memoria y, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 13/244.947, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 13/769.779, y solicitudes relacionadas. Por lo tanto, en realizaciones, el análisis completo, incluida la preparación de la muestra de sangre y la obtención de imágenes de la muestra preparada, se puede realizar en aproximadamente 30 minutos o menos.

40 45 50 Las imágenes y el análisis de las imágenes obtenidas de muestras preparadas de acuerdo con los métodos comentados anteriormente (y métodos similares comentados a continuación) son adecuados para identificar diferentes poblaciones de GB de sangre completa. Semejante identificación y cuantificación se realizan rápidamente en la misma muestra mediante la iluminación de la muestra (p. ej., secuencialmente) con diferentes longitudes de onda de luz y registrando y analizando las imágenes resultantes y las intensidades de luz. Tales métodos son adecuados para proporcionar las imágenes y las gráficas como se muestra, por ejemplo, en las Figuras 9, 10 y 11, que se prepararon utilizando métodos como los descritos en la presente memoria (p. ej., los métodos discutidos tanto más arriba como más abajo). Las comparaciones que se muestran en la Figura 12 demuestran que estos métodos son precisos y fidedignos, y se correlacionan bien con otros métodos (p. ej., análisis mediante un Abbott CELL-DYN Ruby System (Abbott Diagnostics, Lake Forest, IL, EE.UU.), el analizador de referencia utilizado para la comparación mostrada en la Figura 12.

Análisis de muestras de patología.

Se puede utilizar cualquiera de los métodos proporcionados en la presente memoria para analizar muestras de patología que contienen células. Si una muestra de patología es una muestra de tejido, la muestra se puede tratar para separar las células del tejido en células individuales para su análisis mediante los métodos que se proporcionan en la presente memoria.

5

El análisis de muestras de patología por cualquiera de los métodos proporcionados en la presente memoria puede respaldar el análisis rápido de patología y la integración rápida de los resultados del análisis de patología en una decisión de tratamiento para un paciente.

Procedimientos adicionales en respuesta a los resultados del análisis

10 En algunas realizaciones, los dispositivos y sistemas proporcionados en la presente memoria se pueden configurar para desencadenar un procedimiento adicional en respuesta a un resultado obtenido mediante un método de análisis proporcionado en la presente memoria.

15 En un ejemplo, se puede programar un dispositivo o sistema para proporcionar una alerta a un usuario si el resultado está fuera de un intervalo esperado. La alerta puede hacer que un usuario o personal médico, por ejemplo, analice manualmente una muestra, verifique que el dispositivo o sistema funcione correctamente, etc.

20 En otro ejemplo, se puede programar un dispositivo o sistema para ejecutar automáticamente una o más pruebas adicionales en una muestra si un resultado está dentro o fuera de un cierto intervalo. En algunos ejemplos, los dispositivos y sistemas proporcionados en la presente memoria son capaces de realizar múltiples ensayos diferentes, y el dispositivo o sistema puede ejecutar un ensayo de adición para verificar o investigar adicionalmente un resultado generado por un método proporcionado en la presente memoria.

Análisis utilizando colorantes no específicos.

25 Un ejemplo no limitante para acelerar la obtención de imágenes consiste en utilizar una situación de "luz alta", donde las células se marcan con una concentración muy alta de colorantes. En la presente realización, se utilizan colorantes no específicos que marcan el ADN, las membranas u otra porción de las células. Este ejemplo no utiliza colorantes de anticuerpos dirigidos a proteínas específicas y raras u otros marcadores.

30 Con el colorante no específico, es posible obtener información sobre las células sin necesidad de una etapa de separación (tal como, p. ej., separación por centrifugación o realizando una separación física). Sin esta etapa de separación, se puede mover más rápidamente directamente hacia la obtención de imágenes de la muestra, tal como, pero no limitada a, la obtención de imágenes de un área grande de células que pueden incluir tanto a) células no diana tales como glóbulos rojos (GR) como b) células diana u objetos de interés tales como glóbulos blancos (GB). De este modo, en un ejemplo no limitante de obtención de imágenes de una muestra de sangre, se puede obtener una imagen de cinco millones de GR y cinco mil u otra cantidad de GB en los mismos. Las células elegidas como diana se pueden diferenciar basándose en algo que está en el interior de la célula, tal como, pero no limitado a, la forma del núcleo de una célula. En una realización, se utiliza un tinte nuclear para teñir los núcleos de las células en una muestra, y basándose en la clase y la cantidad de tinción que tiene una célula (p. ej., la presencia de tinción nuclear, o la forma de un núcleo teñido, u otra característica), se puede determinar su tipo celular basándose en esta tinción, incluso aunque el colorante no sea específico. En otros ejemplos, otras formas internas en la célula (tales como, p. ej., si el citoplasma tiene o no gránulos u otros objetos) pueden ser indicativas o características y se pueden utilizar para identificar y cuantificar las células de una muestra. Para una muestra de orina, se puede utilizar cualquier célula presente, y forma cristalina de la muestra para identificar una muestra y determinar si se encuentran anomalías o no. De esta manera, el uso de colorantes no específicos se puede emplear para obtener rápidamente imágenes de células de una manera que se puede utilizar para determinar las células según se deseé.

Análisis utilizando una pluralidad de canales de excitación y/o detección.

45 En el contexto de la utilización de volúmenes de muestra incluso más pequeños para citometría, en realizaciones de ensayos de citometría avanzados, se puede utilizar una longitud de onda de excitación y/o de detección adicional. Por ejemplo, para la clasificación de los GB en un ensayo de subconjunto de linfocitos, se deben contar las diversas células, tales como las células T, las células B, las células K y otras células. En este caso, se utilizan dos marcadores simplemente para identificar que la célula es un linfocito. Para subclásificar adicionalmente las células en una muestra de sangre, por ejemplo, se pueden utilizar dos marcadores de nuevo. Por lo tanto, si se tiene un sistema que solo puede detectar dos colores a la vez, hay un número insuficiente de longitudes de onda para el análisis.

50 En una realización, se puede dividir en alícuotas la muestra para hacer dos porciones de muestra separadas y a continuación se pueden obtener imágenes de una combinación en una parte y de otra combinación en otra parte del sistema, utilizando las diferentes partes de la muestra. Desafortunadamente, esto puede causar una duplicación del volumen y el tiempo. Cuantos más canales independientes estén integrados en un sistema, menor será el número de estas partes de la muestra o volúmenes utilizados.

Ejemplos**Procesamiento celular**

En realizaciones, a menudo es útil procesar muestras biológicas para obtener imágenes, pruebas y análisis. Por ejemplo, a menudo es útil procesar muestras biológicas que contienen células para obtener imágenes, pruebas y análisis.

El procesamiento de una muestra biológica puede incluir un procesamiento previo (p. ej., preparación de una muestra para un procesamiento o medición posteriores), un procesamiento (p. ej., alteración de una muestra de manera que difiera de su estado original, o anterior), y un procesamiento posterior (p. ej., eliminación de toda o una parte de una muestra después de su medición o uso). Una muestra biológica se puede dividir en porciones, tales como alícuotas de una muestra de sangre u orina, o por ejemplo se puede cortar en rebanadas, picar o dividir una muestra de tejido en dos o más pedazos. El procesamiento de una muestra biológica, tal como una muestra de sangre, puede incluir mezclado, agitación, sonicación, homogeneización, u otro procesamiento de una muestra o de una porción de una muestra. El procesamiento de una muestra biológica, tal como una muestra de sangre, puede incluir centrifugación de una muestra o porción de la misma. El procesamiento de una muestra biológica, tal como una muestra de sangre, puede incluir proporcionar tiempo para que los componentes de la muestra se separen o sedimenten, y puede incluir filtración (p. ej., hacer pasar la muestra o una porción de la misma a través de un filtro). El procesamiento de una muestra biológica, tal como una muestra de sangre, puede incluir permitir o hacer que la muestra de sangre coagule. El procesamiento de una muestra biológica, tal como una muestra de sangre, puede incluir la concentración de la muestra, o de una porción de la muestra (p. ej., por sedimentación o centrifugación de una muestra de sangre, o de una solución que contiene un producto homogeneizado de tejido de una muestra de tejido) para proporcionar un sedimento y un sobrenadante. El procesamiento de una muestra biológica, tal como una muestra de sangre, puede incluir la dilución de una porción de la muestra. La solución puede ser de una muestra, o de una porción de una muestra, incluyendo la solución de un sedimento o de un sobrenadante de la muestra. Una muestra biológica se puede diluir con agua, o con una solución salina, tal como una solución salina tamponada. Una muestra biológica se puede diluir con una solución que puede incluir o no un fijador (p. ej., formaldehído, paraformaldehído, u otro agente que entrecruce proteínas). Una muestra biológica se puede diluir con una solución eficaz de manera que se produzca un gradiente osmótico entre la solución circundante y el interior, o un compartimento interior, de tales células, eficaz de manera que se altere el volumen celular. Por ejemplo, cuando la concentración de la solución resultante después de la dilución es menor que la concentración eficaz del interior de una célula, o de un compartimento interior de una célula, el volumen de semejante célula aumentará (es decir, la célula se hinchará). Una muestra biológica se puede diluir con una solución que puede incluir o no un osmotizante (tal como, por ejemplo, glucosa, sacarosa, u otro azúcar; sales tales como sodio, potasio, amonio, u otra sal; u otro compuesto o ingrediente osmóticamente activo). En realizaciones, un osmotizante puede ser eficaz para mantener la integridad de las células de la muestra, por ejemplo, estabilizando o reduciendo los posibles gradientes osmóticos entre la solución circundante y el interior, o un compartimento interior, de tales células. En realizaciones, un osmotizante puede ser eficaz para proporcionar o para incrementar gradientes osmóticos entre la solución circundante y el interior, o un compartimento interior, de tales células, eficaz de manera que las células se plieguen al menos parcialmente (cuando el interior celular o un compartimento interior está menos concentrado que la solución circundante), o eficaz de manera que la célula se hinche (cuando el interior celular o un compartimento interior está más concentrado que la solución circundante).

Una muestra biológica se puede poner en contacto con una solución que contiene un tensioactivo, que puede romper las membranas de las células en la muestra, o tener otros efectos sobre la morfología celular. Por ejemplo, si se ponen en contacto los GR con una baja concentración de tensioactivo, los GR pierden su forma de disco y adoptan una forma más esférica.

Una muestra biológica se puede teñir, o se pueden añadir marcadores a la muestra, o la muestra se puede preparar de otra manera para la detección, visualización o cuantificación de la muestra, una porción de una muestra, una parte componente de una muestra, o una porción de una célula o estructura dentro de una muestra. Por ejemplo, una muestra biológica puede ponerse en contacto con una solución que contiene un colorante. Un colorante puede teñir o hacer visible de otro modo una célula, o una porción de una célula, o un material o molécula asociados con una célula en una muestra. Un colorante se puede unir a, o puede ser alterado por, un elemento, compuesto u otro componente de una muestra; por ejemplo, un colorante puede cambiar de color, o alterar de otro modo una o más de sus propiedades, incluidas sus propiedades ópticas, en respuesta a un cambio o diferencia en el pH de una solución en la que está presente; un colorante puede cambiar de color, o alterar de otro modo una o más de sus propiedades, incluidas sus propiedades ópticas, en respuesta a un cambio o diferencia en la concentración de un elemento o compuesto (p.ej. sodio, calcio, CO₂, glucosa u otro ion, elemento, o compuesto presentes en una solución en la que está presente el colorante). Por ejemplo, una muestra biológica se puede poner en contacto con una solución que contiene un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. Por ejemplo, una muestra biológica se puede poner en contacto con una solución que incluye partículas. Las partículas añadidas a una muestra biológica pueden servir como patrones (p.ej., pueden servir como patrones de tamaño, donde se conoce el tamaño o la distribución de tamaño de las partículas, o como patrones de concentración, donde se conoce el número, la cantidad o la concentración de las partículas), o puede servir como marcadores (p.ej., cuando las partículas se unen o se adhieren a células o tipos de células concretos, a marcadores celulares o compartimentos celulares concretos, o

donde las partículas se unen a todas las células en una muestra).

La citometría incluye observaciones y mediciones de células, tales como glóbulos rojos, plaquetas, glóbulos blancos, incluyendo observaciones cualitativas y cuantitativas y mediciones del número de células, tipos de células, marcadores de la superficie celular, marcadores celulares internos y otras características de las células de interés.

- 5 Cuando una muestra biológica incluye o es una muestra de sangre, la muestra se puede dividir en porciones y se puede diluir (p. ej., para proporcionar un mayor volumen para facilitar la manipulación, para alterar la densidad o concentración de los componentes celulares en la muestra para proporcionar una reducción de densidad, concentración, o número de células o intervalo de estos, deseada etc.). La muestra se puede tratar con agentes que afectan la coagulación, o se puede tratar o manipular para concentrar o precipitar los componentes de la muestra (p. ej., se pueden añadir a la muestra ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o heparina, o la muestra se puede centrifugar o se puede dejar que las células se sedimenten). Una muestra, o porción de una muestra, se pueden tratar añadiendo colorantes u otros reactivos que puedan reaccionar con, y marcar células concretas o componentes celulares concretos. Por ejemplo, se pueden utilizar colorantes que marcan los núcleos celulares (p. ej., colorantes de hematoxilina, colorantes de cianina, colorantes draq tales como Draq5®, y otros); los colorantes que marcan el citoplasma celular (p. ej., colorantes de eosina, incluyendo colorantes de fluoresceína y otros) por separado o juntos para ayudar en la visualización, identificación y cuantificación de las células. También son útiles en citometría marcadores más específicos, incluyendo anticuerpos y fragmentos de anticuerpos específicos para dianas celulares, tales como proteínas de la superficie celular, proteínas y compartimentos intracelulares y otras dianas.

- 10 Las muestras biológicas se pueden medir y analizar mediante citometría utilizando medios ópticos, incluyendo, por ejemplo, detectores de fotodiodos, fotomultiplicadores, dispositivos de carga acoplada, diodos láser, espectrofotómetros, cámaras, microscopios u otros dispositivos que miden la intensidad de la luz (de longitud de onda única, de múltiples longitudes de onda, o de un intervalo, o intervalos, de longitudes de onda de la luz), forman una imagen, o ambos. Se pueden obtener imágenes de un campo de visión que incluye una muestra, o parte de una muestra, o se puede escanear, o ambos, utilizando dichos detectores. Una muestra biológica se puede medir y analizar mediante citometría antes del procesamiento, dilución, separación, centrifugación, coagulación u otra alteración. Una muestra biológica se puede medir y analizar mediante citometría durante o después del procesamiento, dilución, separación, centrifugación, coagulación, u otra alteración de la muestra. Por ejemplo, una muestra biológica se puede medir y analizar mediante citometría directamente después de recibir la muestra. En otros ejemplos, una muestra biológica se puede medir y analizar por citometría durante o después del procesamiento, dilución, separación, centrifugación, coagulación u otra alteración de la muestra.

- 15 Por ejemplo, se pueden preparar una muestra de sangre o una porción de la misma para la citometría mediante sedimentación o centrifugación. Una porción sedimentada o del sedimento de dicha muestra se puede resuspender en un tampón de elección antes del análisis citométrico (p. ej., por aspiración, agitación, sonicación u otro procedimiento). Una muestra biológica se puede diluir con, o resuspender en, agua o solución salina, tal como una solución salina tamponada antes del análisis citométrico. Una solución utilizada para dicha dilución o resuspensión puede incluir o no un fijador (p. ej., formaldehído, paraformaldehído u otro agente que entrecruce proteínas). Una solución utilizada para dicha dilución o resuspensión puede proporcionar un gradiente osmótico entre la solución circundante y el interior, o un compartimento interior, de las células de la muestra, eficaz de manera que se altere el volumen celular de algunas o todas las células de la muestra. Por ejemplo, cuando la concentración de la solución resultante después de la dilución es menor que la concentración eficaz del interior de una célula, o de un compartimento interior de la célula, el volumen de tal célula aumentará (es decir, la celda se hinchará). Una muestra biológica se puede diluir con una solución que puede incluir o no un osmotizante (tal como, por ejemplo, glucosa, sacarosa u otro azúcar; sales tales como sodio, potasio, amonio u otra sal; u otro compuesto o ingrediente osmóticamente activos). En realizaciones, un osmotizante puede ser eficaz para mantener la integridad de las células en la muestra, por ejemplo, estabilizando o reduciendo los posibles gradientes osmóticos entre la solución circundante y el interior, o un compartimento interior, de tales células. En realizaciones, un osmotizante puede ser eficaz para proporcionar o aumentar los gradientes osmóticos entre la solución circundante y el interior, o un compartimento interior, de tales células, eficaz de manera que las células se plieguen al menos parcialmente (cuando el interior celular o un compartimento interior están menos concentrados que la solución circundante), o eficaz de manera que las células se hinchen (cuando el interior celular o un compartimento interior están más concentrados que la solución circundante).

- 20 Por ejemplo, una muestra biológica se puede medir o analizar después de la dilución de una parte de la muestra con una solución que incluye colorantes. Por ejemplo, una muestra biológica se puede medir o analizar después de la dilución de una porción de la muestra con una solución que incluye anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, una muestra biológica se puede medir o analizar después de la dilución de una porción de la muestra con una solución que incluye partículas. Las partículas añadidas a una muestra biológica pueden servir como patrones (p. ej., pueden servir como patrones de tamaño, cuando se conoce el tamaño o la distribución de tamaño de las partículas, o como patrones de concentración, cuando se conoce el número, la cantidad o la concentración de las partículas), o pueden servir como marcadores (p. ej., cuando las partículas se unen o se adhieren a células o tipos de células concretos, a marcadores celulares o compartimentos celulares concretos, o cuando las partículas se unen a todas las células en una muestra).

25 Por ejemplo, una muestra biológica se puede medir o analizar después del procesamiento que puede separar uno o

más tipos de células de otro tipo o tipos de células. Tal separación se puede lograr por gravedad (p. ej., sedimentación); centrifugación; filtración; contacto con un sustrato (p. ej., una superficie, tal como una pared o una cuenta, que contiene anticuerpos, lectinas u otros componentes que se pueden unir o adherir a un tipo de célula con preferencia sobre otro tipo de célula); u otros medios. La separación puede ser asistida o lograda mediante la alteración de uno o varios tipos de células. Por ejemplo, se puede añadir una solución a una muestra biológica, tal como una muestra de sangre, que hace que se hinchen algunas o todas las células de la muestra. Cuando un tipo de célula se hincha más rápido que otro tipo o tipos de células, los tipos de células pueden diferenciarse observando o midiendo la muestra después de la adición de la solución. Tales observaciones y mediciones se pueden realizar en un momento, o en múltiples momentos, seleccionar para acentuar las diferencias en la respuesta (p. ej., tamaño, volumen, concentración interna, u otra propiedad afectada por tal hinchamiento) y así aumentar la sensibilidad y precisión de las observaciones y mediciones. En algunos casos, uno o varios tipos de células pueden explotar en respuesta a tal hinchamiento, lo que permite una mejor observación y medición del tipo o tipos de células que quedan en la muestra.

La observación, medición y análisis de una muestra biológica por citometría pueden incluir mediciones fotométricas, por ejemplo, utilizando un fotodiodo, un fotomultiplicador, un diodo láser, un espectrofotómetro, un dispositivo de carga acoplada, una cámara, un microscopio u otro medio o dispositivo. La citometría puede incluir la preparación y análisis de imágenes de células en una muestra biológica (p. ej., imágenes bidimensionales), donde las células se marcan (p. ej., con marcas fluorescentes, quimioluminiscentes, enzimáticas u otras) y siembran (p. ej., se dejan sedimentar sobre un sustrato) y se toman imágenes de una cámara. La cámara puede incluir una lente, y se puede unir a, o utilizar junto con, un microscopio. Las células se pueden identificar en las imágenes bidimensionales por sus marcas acopladas (p. ej., a partir de la luz emitida por las marcas).

Una imagen de células preparadas y analizadas por un citómetro como se describe en la presente memoria puede no incluir células, o puede incluir una célula o múltiples células. Una célula o una célula en una imagen de un citómetro, como se describe en la presente memoria, se pueden marcar, como se describe anteriormente. Una célula o una célula en una imagen de un citómetro, como se describe en la presente memoria, se pueden marcar, como se describe anteriormente, de una manera eficaz para identificar la imagen, y el sujeto del cual se tomó la muestra.

En algunas realizaciones, el sistema de ensayo está configurado para realizar ensayos de citometría. Los ensayos de citometría se utilizan normalmente para medir ópticamente, eléctricamente o acústicamente las características de las células individuales. Para los fines de esta descripción, "células" puede abarcar muestras no celulares que generalmente tienen tamaños similares a las células individuales, incluyendo, pero sin limitarse a, vesículas (tales como liposomas), pequeños grupos de células, viriones, bacterias, protozoos, cristales, cuerpos formados por agregación de lípidos y/o proteínas, y sustancias unidas a pequeñas partículas tales como cuentas o microesferas. Tales características incluyen pero no están limitadas al tamaño; forma; granularidad; patrón de dispersión de luz (o indicatriz óptica); que la membrana celular esté intacta; concentración, morfología y distribución espacio-temporal del contenido celular interno, incluyendo, pero sin limitarse a, el contenido de proteínas, modificaciones de proteínas, contenido de ácidos nucleicos, modificaciones de ácidos nucleicos, contenido de orgánulos, estructura del núcleo, contenido del núcleo, estructura celular interna, contenido de vesículas internas (incluyendo el pH), concentraciones de iones y presencia de otras moléculas pequeñas tales como esteroides o fármacos; y marcadores de la superficie celular (tanto de la membrana celular como de la pared celular) incluyendo proteínas, lípidos, carbohidratos y modificaciones de los mismos. Al utilizar colorantes, tintes u otras moléculas marcadoras apropiadas ya sea en forma pura, conjugadas con otras moléculas o inmovilizadas, o unidas a nanopartículas o micropartículas, se puede utilizar la citometría para determinar la presencia, cantidad y/o modificaciones de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos u otras moléculas específicos. Las propiedades que se pueden medir mediante citometría también incluyen mediciones de la función o actividad celular, incluyendo, pero sin limitarse a, fagocitosis, presentación de antígenos, secreción de citocinas, cambios en la expresión de moléculas internas y de superficie, unión a otras moléculas o células o sustratos, transporte activo de moléculas pequeñas, mitosis o meiosis; traducción de proteínas, transcripción de genes, replicación de ADN, reparación de ADN, secreción de proteínas, apoptosis, quimiotaxis, movilidad, adherencia, actividad antioxidante, ARNi, degradación de proteínas o ácidos nucleicos, respuestas farmacológicas, infecciosidad y actividad de vías o enzimas específicas. La citometría también se puede utilizar para determinar información sobre una población de células, incluyendo, pero sin limitarse a, los recuentos de células, el porcentaje de la población total, y la variación en la población de la muestra para cualquiera de las características descritas anteriormente. Los ensayos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para medir una o más de las características anteriores para cada célula, lo que puede ser ventajoso para determinar correlaciones u otras relaciones entre diferentes características. Los ensayos descritos en la presente memoria también se pueden utilizar para medir de forma independiente múltiples poblaciones de células, por ejemplo, marcando una población de células mixta con anticuerpos específicos para diferentes líneas celulares. Un módulo de microscopía puede permitir la realización de histología, patología y/o análisis morfológico con el dispositivo, y también facilita la evaluación de objetos basados en características físicas y químicas. Los tejidos se pueden homogeneizar, lavar, depositar en una cubeta o portaobjetos, secar, teñir (por ejemplo, con anticuerpos), incubar y a continuación obtener imágenes de los mismos. Cuando se combinan con las tecnologías de transmisión de datos descritas en otra parte en la presente memoria, estas innovaciones facilitan la transmisión de imágenes desde un CMOS/CDD o detector similar a, p. ej., un patólogo autorizado para su revisión, lo que no es posible con dispositivos

tradicionales que solo realizan la citometría de flujo. El citómetro puede medir tanto los antígenos de superficie como la morfología celular; los antígenos de superficie permiten pruebas más sensibles y específicas en comparación con los dispositivos de laboratorio de hematología tradicionales. La interpretación de los ensayos celulares se puede automatizar mediante la selección de una o más mediciones; los umbrales selección pueden ser ajustados por un experto y/o aprendidos basándose en métodos estadísticos a partir de datos de entrenamiento; las reglas de selección pueden ser específicas para sujetos individuales y/o poblaciones de sujetos.

En algunas realizaciones, la incorporación de un módulo del citómetro a un dispositivo de punto de servicio proporciona la medición de los atributos celulares típicamente medidos por dispositivos de laboratorio comunes y laboratorios para su interpretación y revisión por personal médico entrenado clásicamente, mejorando la velocidad y/o calidad de la toma de decisiones clínicas. Un dispositivo de punto de servicio puede, por lo tanto, configurarse para el análisis citométrico.

Ejemplo 1

Se obtuvo una muestra de células que contenían leucocitos sanguíneos, incluyendo células asesinas naturales y neutrófilos. La muestra se trató con un aglutinante de identidad marcado con fluorescencia (aglutinante anti-CD16), que se une tanto a las células asesinas naturales como a los neutrófilos. La muestra también se trató con un colorante nuclear (DRAQ5). Se tomaron imágenes de la muestra mediante microscopía de fluorescencia y microscopía de campo oscuro. Se registró y analizó el nivel de fluorescencia y dispersión lateral de luz de diferentes células en la muestra. Las imágenes segmentadas que contenían la señal de aglutinante anti-CD16 proporcionaron información cuantitativa sobre la intensidad de fluorescencia de cada célula (correspondiente al nivel de expresión de CD16), y también el tamaño de cada célula. La imagen de campo oscuro proporcionó información cuantitativa sobre las propiedades de dispersión de cada célula. Las imágenes que contenían la señal del colorante de ADN se segmentaron para determinar la intensidad de fluorescencia, el tamaño y la forma del núcleo.

Como se muestra en la Figura 1A, se identificaron dos agrupaciones principales de células basándose en la medición de la fluorescencia de CD16 y la dispersión de la luz de las diferentes células. El grupo de células con señal de fluorescencia de CD16 brillante/alta y dispersión alta (Figura 1A, círculo derecho) son neutrófilos. El grupo de células con señal de fluorescencia de CD16 intermedia y baja dispersión (Figura 1A, círculo izquierdo) son células asesinas naturales. Si bien la medición de la fluorescencia y la dispersión de la luz de las diferentes células proporcionan información suficiente para clasificar la mayoría de las células de la muestra como células asesinas naturales o neutrófilos, para algunas células, la medición de estos atributos no proporciona información suficiente para clasificar las células con un alto grado de precisión. Por ejemplo, La medición de la fluorescencia y la dispersión de la luz de las células no proporciona información suficiente para clasificar con precisión el pequeño grupo de células en el círculo más pequeño de la Figura 1A (es decir, el círculo central). Para identificar si las células en el círculo más pequeño eran células asesinas naturales o neutrófilos, se examinaron las imágenes de tinción nuclear (DRAQ5) y de células totales (anti-CD16) de estas. Se obtuvieron mediciones cuantitativas del área del núcleo y del volumen celular total de las células, y se determinó la razón del área nuclear con respecto al área celular total. Como se muestra en la Figura 1B, existe una clara diferencia en la razón entre el área nuclear y el área celular total entre las células asesinas naturales ("NK") y los neutrófilos ("Neu"). Así, el uso de microscopía cuantitativa para examinar los atributos múltiples de las células en la muestra se utilizó para permitir una clasificación inequívoca de las células. La Figura 1C muestra imágenes de células asesinas naturales del círculo más pequeño en la Figura 1A. Todas las imágenes tienen la misma escala de longitud. Las imágenes de la izquierda son células teñidas para determinar el área celular total (anti-CD16), y las imágenes de la derecha son las mismas células con solo tinción nuclear (DRAQ5). Las imágenes en la fila superior e inferior son diferentes ejemplos de las células asesinas naturales. La Figura 1D muestra imágenes de neutrófilos del círculo más pequeño en la Figura 1A. Todas las imágenes tienen la misma escala de longitud. Las imágenes de la izquierda son células teñidas para determinar el área celular total, y las imágenes de la derecha son las mismas células con tinción nuclear. Las imágenes de la fila superior e inferior son diferentes ejemplos de células asesinas naturales.

Además, el núcleo de un neutrófilo tiene una forma distintiva de múltiples lóbulos, mientras que el núcleo de una célula asesina natural (y otros linfocitos) es redondo, uniforme y liso. Los algoritmos de segmentación de imágenes se pueden utilizar para identificar y clasificar las células según la forma del propio núcleo.

Ejemplo 2

Se obtuvo una muestra que contenía plaquetas. Las plaquetas se marcaron con anticuerpos anti-CD41 y anti-CD61 conjugados con fluorescencia. También se añadieron a la muestra cuentas que tenían un diámetro de 3 μm . Se obtuvieron imágenes de la muestra con aumentos de 10x y 20x (Figura 2A). Se midió la intensidad de la distribución de fluorescencia para las plaquetas individuales (de ambos anticuerpos) y se determinó que tenían una forma Gaussiana (Figura 2B). Los valores medidos de fluorescencia de plaquetas individuales se representaron gráficamente y se determinó el ajuste para la distribución de la intensidad (Figura 2C). En la Figura 2C, la línea gris es la intensidad de fluorescencia medida a través de una plaqueta individual, y la línea negra es el ajuste. Los parámetros del ajuste, tales como la media Gaussiana, la varianza, el volumen, la amplitud y el área de la base, etc. se pueden evaluar como predictores de volumen plaquetario. Se ha determinado que el volumen Gaussiano y la amplitud del ajuste se correlacionan estrechamente con el volumen medio de plaquetas.

Para las mediciones anteriores, las cuentas de 3 µm sirvieron como referencias y indiciales para controlar la varianza para determinar con precisión el mejor plano de enfoque, y el efecto de esta varianza en la medición del volumen.

Además, el tamaño de plaquetas estimado según el ajuste de un modelo 2D se puede calibrar para que esté en el intervalo normal (Figura 3).

5 Ejemplo 3

Se obtuvo una muestra que contenía glóbulos rojos ("GR"). Los GR se trataron con una baja concentración de un agente tensioactivo (DDAPS o SDS), lo que provocó que los GR adquirieran una forma de esfera. Se tomaron imágenes de los GR mediante microscopía de campo oscuro en dos cubetas diferentes: (A) una cubeta que solo permitía la epi-iluminación pura (Figura 4A); y (B) una cubeta que permitía una mezcla de epi- y trans-iluminación (Figura 4B). Los GR eran mucho más visibles en la cubeta que permitía una mezcla de epi- y trans-iluminación sobre la cubeta que solo permitía la epi-iluminación pura (Figura 4).

Ejemplo 4

Se obtuvo una muestra que contenía neutrófilos. En los neutrófilos, la forma y la morfología de la cromatina del núcleo pueden indicar si se trata de un neutrófilo "de banda" inmaduro o de un neutrófilo "segmentado" maduro. Los neutrófilos de banda son neutrófilos inmaduros que han emergido recientemente de la médula ósea. Un aumento en la proporción de neutrófilos de banda puede indicar una infección o inflamación en curso.

La muestra se mezcló con un anticuerpo anti-CD16 marcado de forma fluorescente, que reconoce el CD16, un receptor de la superficie celular en los neutrófilos. La muestra también se tiñó con un colorante nuclear fluorescente. Se tomaron imágenes de la muestra mediante microscopía de fluorescencia, para obtener datos de tinción nuclear y tinción de CD16 de las células. Los neutrófilos de banda generalmente tienen niveles de expresión similares de CD16 a los neutrófilos segmentados maduros, y por lo tanto no pueden distinguirse en virtud de la intensidad de fluorescencia de la tinción de CD16 solo.

El análisis de imágenes que incluye la segmentación de imágenes se utiliza para reconocer la tinción nuclear y las morfologías de los neutrófilos de banda y los neutrófilos segmentados, lo que permite la clasificación de las células.

Se examinan el tamaño, la forma y la intensidad de fluorescencia del núcleo de las células. Además, los núcleos se analizan para determinar el número de lóbulos (picos de intensidad dentro del área nuclear), la distancia entre los lóbulos del núcleo y los cambios en la curvatura (segunda derivada) del perfil nuclear. La Figura 5A muestra imágenes representativas de neutrófilos de banda. En estas imágenes, el núcleo aparece como un color gris claro y el citoplasma celular aparece como un color gris más oscuro. A medida que los neutrófilos se diferencian a través del linaje mieloide, desarrollan un núcleo en forma de "U" característico antes de alcanzar la plena madurez. La Figura 5B muestra imágenes representativas de neutrófilos segmentados. En estas imágenes, el núcleo aparece como un color gris claro y el citoplasma celular aparece como un color gris más oscuro. Los núcleos de los neutrófilos segmentados tienen múltiples segmentos/lóbulos (típicamente aproximadamente de 3 a 5). Por lo tanto, este análisis apoya la identificación y cuantificación de diferentes subpoblaciones de neutrófilos en la sangre.

35 Ejemplo 5

Se obtiene una muestra de células de un sujeto con leucemia linfocítica crónica (LLC). El objetivo es cuantificar la extensión de la expresión de CD5 en las células B del sujeto. Los anticuerpos anti-CD20 se seleccionan como el aglutinante para las células B. Los anticuerpos anti-CD20 marcados con un primer fluoróforo coloreado se mezclan con la muestra. Después de un tiempo de incubación apropiado, la muestra se lava y los anticuerpos anti-CD20 no unidos se eliminan. La muestra se expone a una fuente de luz capaz de excitar el primer fluoróforo, y la señal fluorescente se mide utilizando un espectrofotómetro.

Sobre la base de la señal fluorescente, se determina la concentración aproximada de células B en la muestra. La concentración aproximada determinada de células B está, de hecho, dentro de 1,5 veces la concentración real de células B en la muestra. En base a la concentración aproximada de células B en la muestra, se añade una cantidad apropiada de aglutinante anti-CD5 a la muestra de manera que se mantenga una relación proporcional entre la expresión de CD5 y la fluorescencia de CD5. El aglutinante anti-CD5 se acopla a un segundo fluoróforo, que tiene una longitud de onda de excitación pico diferente de la del primer fluoróforo (unido al aglutinante anti-CD20). El anticuerpo anti-CD5 se añade a la muestra, y a continuación las células individuales de la muestra se exponen a una fuente de luz capaz de excitar el segundo fluoróforo, y se mide la señal fluorescente de las células individuales. Sobre la base de la señal fluorescente de las células, se determina la cantidad promedio de CD5 en las células B en la muestra.

Aunque este ejemplo se describe en el contexto de CD5, debe entenderse que este concepto de obtener un recuento aproximado para guiar una adición de una cantidad deseada de material para su uso en una etapa posterior, no se limita a CD5 y no se excluye uso de este concepto con otros tipos de células, analitos u objetos.

Ejemplo 6

Las células sanguíneas se pueden visualizar, identificar y cuantificar de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, imágenes bidimensionales de células en una muestra biológica, donde las células se marcan (p. ej., con marcas fluorescentes, quimioluminiscentes, enzimáticas u otras) y se siembran (p. ej. se dejan sedimentar sobre un sustrato) y se visualizan por medio de una cámara, se puede preparar y analizar como se describe en el presente ejemplo. La cámara puede incluir una lente, y se puede acoplar a, o utilizar, junto con un microscopio. Las células se pueden identificar en las imágenes bidimensionales por sus marcas ancladas (p. ej., a partir de la luz emitida por las marcas).

- 5 Se cargaron 80 microlitros de sangre completa obtenida de una punción digital en un recipiente de muestra tapado precargado con 2 mg/ml de EDTA. En este caso, se utilizó un contenedor de muestra cerrado (con una tapa retirable o perforable); se entenderá que se puede utilizar cualquier recipiente adecuado para contener tal muestra de pequeño volumen, incluyendo, pero sin limitarse a, un recipiente tapado o un recipiente sin tapón. El contenedor de la muestra se centrifugó a 1200 xg durante 5 minutos, para separar las células sanguíneas del plasma sanguíneo. La centrifugación del contenedor de la muestra dio como resultado la separación de la muestra de sangre en el contenedor de la muestra en dos componentes principales (desde la parte superior del recipiente de la muestra hasta la parte inferior): 1) plasma sanguíneo y 2) células sanguíneas empaquetadas. Este procedimiento garantiza que no queden aisladas gotas de sangre, sino que se unan con el cuerpo principal del líquido. Además, este procedimiento separa las células de los elementos del plasma reduciendo de ese modo el metabolismo y permitiendo un almacenamiento más prolongado de la muestra.
- 10 20 El contenedor de la muestra centrifugada se cargó en un cartucho que contenía múltiples reactivos aislados fluidamente, puntas y una cubeta de citometría. El cartucho contenía todos los reactivos requeridos para el ensayo. El cartucho se cargó en un dispositivo equipado con al menos una centrífuga, una pipeta y una plataforma para cargar la cubeta. La pipeta en el dispositivo tiene una pluralidad de boquillas, teniendo algunas boquillas un tamaño diferente al de las otras boquillas.
- 15 25 30 En el interior del dispositivo, se hizo descender una boquilla en la pipeta sobre una herramienta portadora de la cubeta haciendo que se acoplara al orificio correspondiente en la herramienta portadora. Esta herramienta se movió posteriormente al cartucho y se bajó sobre la cubeta del citómetro. Los pasadores de la herramienta se pudieron acoplar a continuación a los orificios correspondientes en la cubeta y levantarla. La cubeta se transfirió a una estación de carga en otro lugar del dispositivo.
- 35 40 A continuación, dentro del dispositivo, se hizo descender una boquilla más grande de la pipeta al cartucho para acoplar una punta de pipeta almacenada en el cartucho. La pipeta y la punta juntas se utilizaron después para mezclar las células y el plasma en el contenedor de la muestra colocando la punta de la pipeta dentro de la muestra en el contenedor de la muestra y aspirando repetidamente el material y dispensando el material desde la punta. Una vez que las células se resuspendieron en el plasma de modo que la muestra de sangre completa se mezcló completamente, se aspiraron 5 microlitros de la sangre total mezclada para proporcionar una alícuota para las mediciones de las propiedades de la muestra de sangre. Esta alícuota de 5 microlitros se usó para las mediciones dirigidas a los glóbulos rojos y las plaquetas en la muestra. Como se discute a continuación, se utilizó una porción de la muestra que quedaba después de la eliminación de esta alícuota de 5 microlitros para las mediciones dirigidas a los glóbulos blancos de la muestra.
- 45 50 55 60 Despues de mezclar 5 microlitros de la muestra de sangre completa en el cartucho, se dispusieron los 95 microlitros restantes en un recipiente que contenía una mezcla de solución salina tamponada con fosfato y 2% en peso de albúmina de suero bovino, para diluir veinte veces la sangre completa (lo que dio como resultado 100 microlitros de muestra diluida). Despues de mezclar vigorosamente, se transfirieron 5 microlitros de esta muestra a otro recipiente que contenía un cóctel de reactivos de anticuerpo marcaje: anti-CD235a conjugado con Alexa Fluor® 647 (AF647), anti-CD41 y anti-CD61 conjugado con ficoeritrina (PE). La mezcla se incubó durante 5 minutos. Posteriormente, se mezclaron 10 microlitros de esta mezcla con 90 microlitros de un tampón que contenía un tensioactivo zwitteriónico a <0,1% en peso. Las moléculas de tensioactivo modifican las propiedades de flexión de la membrana de los glóbulos rojos de modo que todas las células adquieren una forma esférica estable. Esta transformación es isovolumétrica ya que el tampón utilizado es isotónico con el citoplasma; por lo tanto, no se puede producir un intercambio de fluido conducido osmóticamente a través de la membrana celular. Despues de incubar esto durante otros 2 minutos, se mezclaron 30 microlitros de esta solución con una solución que contenía glutaraldehído, un fijador y cuentas no fluorescentes de 10 µm de diámetro. La mezcla tenía una concentración final de glutaraldehído al 0,1% y 1000 cuentas por microlitro. El glutaraldehído fija rápidamente las células, evitando así la lisis celular y otros procesos biológicos activos.
- En este ejemplo no limitante, la pipeta acopló una punta en el cartucho, aspiró 7 microlitros de la mezcla anterior y cargó los 7 microlitros en un canal dentro de la cubeta colocada en una plataforma con la herramienta portadora. Despues de cargar la mezcla en la cubeta, la pipeta aspiró 10 microlitros de aceite mineral de un recipiente en el cartucho y colocó una gota de aceite mineral en ambos extremos abiertos del canal cargado de la cubeta. Se añadió hexadecano a los extremos del canal abierto para evitar la evaporación del líquido del canal de la cubeta cargada (el aceite mineral tambien funcionaría). A continuación, el aparato de manejo de muestras a nivel de dispositivo acopló la combinación de portador de cubeta/cubeta y transportó la combinación de portador de cubeta/cubeta desde el

5 módulo que contenía el cartucho hasta el módulo de citometría del dispositivo. En el módulo de citometría, el aparato de manejo de muestras a nivel de dispositivo colocó la combinación de portador de cubeta/cubeta en la plataforma del microscopio del módulo de citometría. El tiempo requerido para estas operaciones, además de un tiempo de espera de 2 minutos, permitió que las células hinchadas se sedimentaran en el fondo de la cubeta antes de la obtención de las imágenes.

10 Después de colocar el portador de cubeta/cubeta en la plataforma del microscopio, la plataforma se trasladó a una localización predeterminada de manera que el sistema óptico del citómetro pudiera ver un extremo del canal que contenía la muestra. En este lugar, el sistema óptico retransmitía imágenes de la muestra adquirida con iluminación de campo oscuro de una luz anular. Estas imágenes, junto con la actuación del sistema óptico en un eje perpendicular al plano de la cubeta, se utilizaron para encontrar el plano de mejor enfoque. Una vez enfocado, el sistema óptico se usó para adquirir imágenes de fluorescencia de la muestra a diferentes longitudes de onda, de acuerdo con los fluoróforos que se estaban utilizando. Por ejemplo, para visualizar glóbulos rojos que habían sido etiquetados con anti-CD235 conjugado con Alexa Fluor® 647, se utilizó una fuente de luz roja (630 nm de longitud de onda) para excitar la muestra y se utilizaron longitudes de onda entre 650 nm y 700 nm para obtener imágenes de la muestra. Se utilizó una combinación de un espejo policróico y un filtro de emisión de paso de banda para filtrar las longitudes de onda no deseadas de la señal óptica. Puesto que las células se habían sedimentado en el fondo de la cubeta, las imágenes en un solo plano de enfoque eran suficientes para visualizar todas las células en la región.

15 20 Los datos de las imágenes fueron procesados por un controlador asociado con el dispositivo de procesamiento de muestras. Los algoritmos de procesamiento de imágenes empleados aquí utilizaron imágenes de fluorescencia de células para detectarlas mediante una combinación de umbrales adaptativos y detección de bordes. Según la intensidad local y los gradientes de intensidad, se crearon regiones de interés (RoI) alrededor de cada célula. Utilizando imágenes de campo oscuro, las cuentas en la muestra también se identificaron y se crearon RoI alrededor de las cuentas. Se enumeraron todos los RoI en cada campo de visión y se calculó su intensidad en cada imagen de ese campo de visión. La información generada por el algoritmo de procesamiento de imágenes consistió en 25 mediciones de forma o morfométricas y de intensidades de fluorescencia y campo oscuro para cada RoI. Esta información se analizó mediante métodos estadísticos para clasificar cada objeto como un glóbulo rojo (positivo para CD235a, pero negativo para CD41/CD61), una plaqueta (positiva para CD41/CD61 y negativa para CD235a) o una cuenta. Los descriptores de forma, tales como el perímetro, el diámetro y la circularidad, se utilizaron para calcular el volumen de cada glóbulo rojo y plaqueta. Dado que las cuentas se añadieron a una concentración conocida, la razón 30 promedio de cuentas con respecto a células en todo el canal se utilizó para calcular la concentración de células en términos de células/microlitro. Basándose en las etapas realizadas para procesar la muestra, esta concentración se corrigió para que la dilución llegara a la concentración de células en la muestra de sangre completa original. Las siguientes cantidades se calcularon a partir de una muestra: 1) número de glóbulos rojos en la cubeta; 2) volumen promedio de glóbulos rojos en la cubeta; 3) amplitud de distribución de los glóbulos rojos (ADE) de los glóbulos rojos 35 en la cubeta; 4) número de plaquetas en la cubeta; y 5) volumen promedio de plaquetas en la cubeta. Sobre la base de estos cálculos, se calculó lo siguiente para la muestra de sangre original.

Valor medido	Resultado	Intervalo ilustrativo
Concentración de glóbulos rojos (millón de células por microlitro)	4,8	4-6
Volumen medio de glóbulos rojos, femtolitros	88	80-100
Amplitud de distribución eritrocitaria (ADE), (%)	12	11-14,6
Concentración de plaquetas (mil células por microlitro)	254	150-400
Volumen medio de plaquetas, femtolitros	10,4	7,5-11,5

40 Despues de la eliminación de la alícuota de 5 microlitros utilizada para el análisis de la información de los GR y de las plaquetas, los 75 microlitros restantes de la muestra se utilizaron para analizar la población de glóbulos blancos de la muestra de sangre completa. Los 75 microlitros restantes de sangre completa también se mezclaron aspirando y dispensando repetidamente la muestra dentro del mismo recipiente por medio de la pipeta. Se aspiraron aproximadamente 40 microlitros de los 75 microlitros restantes de la sangre completa mezclada a una punta de pipeta y se transfirieron mediante la pipeta a un tubo de centrífuga en el cartucho. El tubo de centrífuga que contenía la muestra de sangre se acopló a la pipeta y se transfirió y depositó en una cubeta giratoria en una centrífuga dentro del módulo. La centrifugadora se accionó para proporcionar 1200 xg durante 3 minutos, separando la sangre en plasma que contenía EDTA como sobrenadante y células empaquetadas en el sedimento.

45 50 Después de la centrifugación, el tubo de centrífuga se retiró de la centrífuga y se devolvió al cartucho. El sobrenadante de plasma se eliminó con la pipeta y se transfirió a un recipiente de reacción separado en el cartucho. Desde un recipiente de reactivo en el cartucho, se aspiraron 16 microlitros de tampón de resuspensión con la pipeta y se añadieron al sedimento celular en el tubo de centrífuga. A continuación, la pipeta resuspendió el sedimento celular en el tampón de resuspensión aspirando y dispensando repetidamente la mezcla en el tubo de centrífuga. A continuación, se aspiraron 21 microlitros de la sangre completa resuspendida con la pipeta y se añadieron a otro recipiente que contenía 2 microlitros de anti-CD14-Pacific Blue™ y DRAQ5®, se mezclaron, y se incubaron durante 2

- minutos. Se añadieron veinte microlitros de esta mezcla a 80 microlitros de un tampón de lisis. El tampón de lisis es una solución de un tensioactivo suave tal como una saponina junto con un fijador tal como paraformaldehído. El detergente hace que se formen una gran cantidad de orificios en las membranas de las células. Los glóbulos rojos, debido a sus propiedades únicas de membrana, son particularmente susceptibles a esta formación orificios y se lisan completamente, filtrándose sus contenidos hacia el líquido circundante. La presencia del fijador evita la lisis involuntaria de los glóbulos blancos. Las plaquetas también permanecen invisibles. El propósito de esta etapa es eliminar los glóbulos rojos de la mezcla, ya que superan en número a los glóbulos blancos en aproximadamente 1000:1. Las plaquetas no interfieren en la obtención de imágenes y, por lo tanto, son irrelevantes para este procedimiento. El tampón de lisis también contenía cuentas no fluorescentes 10 µM a una concentración conocida.
- 5 Despues de una incubación de 5 minutos, el recipiente se centrifugó nuevamente a 1200 xg durante 3 minutos. El sobrenadante se aspiró con una punta de pipeta, eliminando los fantasmas de glóbulos rojos y otros residuos, y se depositó en una zona de desechos en el cartucho. Estaban presentes en el sedimento celular aproximadamente 15 microlitros de líquido con glóbulos blancos empaquetados.
- 10 Para determinar una aproximación grosera del número de glóbulos blancos presentes en el sedimento celular, la pipeta resuspendió primero los glóbulos blancos en el recipiente y a continuación aspiró el líquido para su transporte e inspección mediante un espectrofotómetro. La suspensión de glóbulos blancos se iluminó con luz a una longitud de onda de 632 nm, que es la longitud de onda de excitación para el colorante Alexa Fluor® 647 y DRAQ5®. La luz emitida por la suspensión celular se filtró con un filtro de paso largo de 650 nm y se midió en el espectrofotómetro. Esta medición se correlacionó con la curva de calibración generada previamente para estimar una concentración grosera de glóbulos blancos en la suspensión celular. Típicamente, las concentraciones celulares oscilaron entre aproximadamente 1.000 células por microlitro y aproximadamente 100.000 células por microlitro. Esta estimación se utilizó para calcular un factor de dilución apropiado para asegurar que la concentración de células en la cubeta se restringiera dentro de un intervalo de dos veces alrededor de una concentración diana predefinida. El propósito de esta etapa fue asegurar que las células no estuvieran presentes a una densidad demasiado alta o demasiado baja en la cubeta. Si la densidad celular es demasiado alta, la precisión de los algoritmos de procesamiento de imágenes se ve comprometida, y si la densidad celular es demasiado baja, se muestrea un número insuficiente de células.
- 15 En base al factor de dilución calculado en la etapa anterior, se añadió a la suspensión celular un diluyente que contenía anticuerpos marcados contra CD45 (marcador pan-leucocítico), CD16 (marcador de neutrófilos) y CD123 (marcador de basófilos) y se mezcló.
- 20 Una vez que la cubeta en el complejo con el portador de cubetas se colocó en el bloque portador de cubetas, se cargaron 10 microlitros de la mezcla de glóbulos blancos resuspendidos en tampón de citometría en cada uno de los dos canales de la cubeta. Despues de cargar la mezcla en los canales de la cubeta, la pipeta aspiró 10 µL de hexadecano de un recipiente en el cartucho y colocó una gota de aceite mineral en ambos extremos abiertos de ambos canales en la cubeta cargada con glóbulos blancos.
- 25 A continuación, el aparato de manejo de muestras a nivel de dispositivo acopló la combinación de portador de cubeta/cubeta y transportó la combinación de portador de cubeta/cubeta desde el módulo que contenía el cartucho al módulo de citometría del dispositivo. En el módulo de citometría, el aparato de manejo de muestras a nivel de dispositivo colocó la combinación de portador de cubeta/cubeta en la plataforma de microscopio del módulo de citometría. Despues de colocar el portador de cubeta/cubeta en la plataforma de microscopio, se tomaron imágenes de los dos canales de la cubeta que contenían los glóbulos blancos como se describió anteriormente para la mezcla de GR/plaquetas.
- 30 Se utilizaron imágenes de campo oscuro de los glóbulos blancos para contar el número de células en un campo (como se muestra en la Fig. 9A). Se utilizaron marcadores de la superficie celular para determinar el tipo de célula de glóbulos blancos individuales en una imagen; por ejemplo, CD14 marca monocitos; CD123 marca basófilos; CD16 marca neutrófilos; y se utilizaron CD45-AF647 para marcar todos los leucocitos (Fig. 9B-9E). El colorante nuclear Draq5 se usó para marcar los núcleos celulares, y para diferenciar así las células nucleadas (tales como los glóbulos blancos) de los glóbulos rojos maduros, que no tienen núcleo (Fig. 9F).
- 35 Los algoritmos de procesamiento de imágenes empleados aquí utilizaron imágenes de fluorescencia de células para detectarlas utilizando una combinación de umbral adaptativo y detección de bordes. Sobre la base de la intensidad local y los gradientes de intensidad, se crearon límites de regiones de interés (RoI) alrededor de cada célula. Usando imágenes de campo oscuro, también se identificaron las cuentas en la muestra y se crearon límites de RoI alrededor de las cuentas. Se enumeraron todas las RoI de cada campo de visión y se calculó su intensidad en cada imagen de ese campo de visión. La información generada por el algoritmo de procesamiento de imágenes consistió en mediciones de forma o morfométricas y de intensidades de fluorescencia y campo oscuro para cada RoI. Esta información se analizó utilizando métodos estadísticos para clasificar cada objeto como linfocitos, monocitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos o cuentas. Basándose en la enumeración de células de diferentes tipos, el recuento de cuentas correspondiente y la razón de dilución implementada durante el procesamiento de la muestra, se calculó una concentración absoluta de células por microlitro de sangre completa original. Esto se calculó para todos los glóbulos blancos y cada subtipo, y se refirió como concentración absoluta (células por microlitro) y como proporción (%).
- 40 Se utilizaron imágenes de campo oscuro de los glóbulos blancos para contar el número de células en un campo (como se muestra en la Fig. 9A). Se utilizaron marcadores de la superficie celular para determinar el tipo de célula de glóbulos blancos individuales en una imagen; por ejemplo, CD14 marca monocitos; CD123 marca basófilos; CD16 marca neutrófilos; y se utilizaron CD45-AF647 para marcar todos los leucocitos (Fig. 9B-9E). El colorante nuclear Draq5 se usó para marcar los núcleos celulares, y para diferenciar así las células nucleadas (tales como los glóbulos blancos) de los glóbulos rojos maduros, que no tienen núcleo (Fig. 9F).
- 45 Los algoritmos de procesamiento de imágenes empleados aquí utilizaron imágenes de fluorescencia de células para detectarlas utilizando una combinación de umbral adaptativo y detección de bordes. Sobre la base de la intensidad local y los gradientes de intensidad, se crearon límites de regiones de interés (RoI) alrededor de cada célula. Usando imágenes de campo oscuro, también se identificaron las cuentas en la muestra y se crearon límites de RoI alrededor de las cuentas. Se enumeraron todas las RoI de cada campo de visión y se calculó su intensidad en cada imagen de ese campo de visión. La información generada por el algoritmo de procesamiento de imágenes consistió en mediciones de forma o morfométricas y de intensidades de fluorescencia y campo oscuro para cada RoI. Esta información se analizó utilizando métodos estadísticos para clasificar cada objeto como linfocitos, monocitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos o cuentas. Basándose en la enumeración de células de diferentes tipos, el recuento de cuentas correspondiente y la razón de dilución implementada durante el procesamiento de la muestra, se calculó una concentración absoluta de células por microlitro de sangre completa original. Esto se calculó para todos los glóbulos blancos y cada subtipo, y se refirió como concentración absoluta (células por microlitro) y como proporción (%).
- 50 Se utilizaron imágenes de campo oscuro de los glóbulos blancos para contar el número de células en un campo (como se muestra en la Fig. 9A). Se utilizaron marcadores de la superficie celular para determinar el tipo de célula de glóbulos blancos individuales en una imagen; por ejemplo, CD14 marca monocitos; CD123 marca basófilos; CD16 marca neutrófilos; y se utilizaron CD45-AF647 para marcar todos los leucocitos (Fig. 9B-9E). El colorante nuclear Draq5 se usó para marcar los núcleos celulares, y para diferenciar así las células nucleadas (tales como los glóbulos blancos) de los glóbulos rojos maduros, que no tienen núcleo (Fig. 9F).
- 55 Los algoritmos de procesamiento de imágenes empleados aquí utilizaron imágenes de fluorescencia de células para detectarlas utilizando una combinación de umbral adaptativo y detección de bordes. Sobre la base de la intensidad local y los gradientes de intensidad, se crearon límites de regiones de interés (RoI) alrededor de cada célula. Usando imágenes de campo oscuro, también se identificaron las cuentas en la muestra y se crearon límites de RoI alrededor de las cuentas. Se enumeraron todas las RoI de cada campo de visión y se calculó su intensidad en cada imagen de ese campo de visión. La información generada por el algoritmo de procesamiento de imágenes consistió en mediciones de forma o morfométricas y de intensidades de fluorescencia y campo oscuro para cada RoI. Esta información se analizó utilizando métodos estadísticos para clasificar cada objeto como linfocitos, monocitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos o cuentas. Basándose en la enumeración de células de diferentes tipos, el recuento de cuentas correspondiente y la razón de dilución implementada durante el procesamiento de la muestra, se calculó una concentración absoluta de células por microlitro de sangre completa original. Esto se calculó para todos los glóbulos blancos y cada subtipo, y se refirió como concentración absoluta (células por microlitro) y como proporción (%).
- 60 Se utilizaron imágenes de campo oscuro de los glóbulos blancos para contar el número de células en un campo (como se muestra en la Fig. 9A). Se utilizaron marcadores de la superficie celular para determinar el tipo de célula de glóbulos blancos individuales en una imagen; por ejemplo, CD14 marca monocitos; CD123 marca basófilos; CD16 marca neutrófilos; y se utilizaron CD45-AF647 para marcar todos los leucocitos (Fig. 9B-9E). El colorante nuclear Draq5 se usó para marcar los núcleos celulares, y para diferenciar así las células nucleadas (tales como los glóbulos blancos) de los glóbulos rojos maduros, que no tienen núcleo (Fig. 9F).

En las Fig. 9, 10 y 11 se presentan ejemplos de imágenes y gráficos de los resultados de tales mediciones.

La Fig. 9 muestra imágenes representativas de células sanguíneas de una muestra de sangre completa; estas imágenes fueron tomadas utilizando diferentes técnicas de imagen y colorantes. La imagen que se muestra en la Fig. 9A se tomó de células de sangre completa utilizando iluminación de campo oscuro. La imagen que se muestra en la Fig. 9B se tomó de células de sangre completa que muestran fluorescencia de anticuerpos anti-CD14 marcados con colorante azul pacífico; las células fluorescentes son monocitos. La imagen mostrada en la Fig. 9C se tomó de células de sangre completa que mostraban fluorescencia de anticuerpos anti-CD123 marcados con el colorante PE/Cy5; las células fluorescentes son basófilos. La imagen mostrada en la Fig. 9D fue tomada de células de sangre completa que mostraban fluorescencia de anticuerpos anti-CD16 marcados con colorante PE; las células fluorescentes son neutrófilos. La imagen mostrada en la Fig. 9E se tomó de células de sangre completa que muestran fluorescencia de anticuerpos anti-CD45 marcados con colorante AF 647; todos los leucocitos emiten fluorescencia en estas condiciones. La imagen que se muestra en la Fig. 9F se tomó de células de sangre completa teñidas con DRAQ5® para teñir los núcleos celulares. Por lo tanto, los leucocitos y las plaquetas se tiñen y emiten fluorescencia en estas condiciones, pero los glóbulos rojos (que carecen de núcleos) no se tiñen y no emiten fluorescencia.

La Fig. 10 muestra una imagen compuesta representativa de tipos de células en sangre completa a partir de imágenes adquiridas de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. En la figura se muestran imágenes de un monocito (marcado y observado en el cuadrante superior izquierdo de la figura, con un centro rojizo rodeado por un anillo de color azul-púrpura), un linfocito (marcado y observado en el centro de la figura, con un centro rojo brillante rodeado por un anillo de color rojo más oscuro), un eosinófilo (marcado y observado en el cuadrante inferior izquierdo de la figura, con un centro de color verde rodeado por un borde de color rojo), y un neutrófilo (marcado y observado en el cuadrante inferior derecho de la figura, con un centro de color verde rodeado por un borde de color amarillo y verde).

Reviste interés identificar y cuantificar diversos tipos de células encontradas en tales muestras de sangre. Puede haber múltiples formas de abordar tal procedimiento de clasificación, que, en algunas realizaciones, puede considerarse como un problema estadístico para la clasificación multidimensional. Se entenderá que hay una amplia variedad de métodos disponibles en el campo para resolver este tipo de problemas de clasificación. Una realización particular de tal análisis se proporciona a continuación.

La Fig. 11 muestra gráficos de diversos tipos de células identificados y cuantificados mediante los ensayos citométricos descritos en este ejemplo. La Fig. 11A muestra un gráfico de manchas (células) por FL-17 (anticuerpo anti-CD14 marcado con colorante azul pacífico) frente a la intensidad de FL-9 (señal de dispersión de campo oscuro) para identificar monocitos. La Fig. 11B muestra un gráfico de manchas (células) por la intensidad del marcador FL-19 (anticuerpo anti-CD123 marcado con colorante PE-CY5) frente a la intensidad del marcador FL-15 (anti-CD16 marcado con colorante PE) para identificar basófilos. La Fig. 11C muestra un gráfico de manchas (células) por la intensidad del marcador FL-15 (anti-CD16 marcado con colorante PE) frente a la intensidad del marcador FL-11 (anticuerpo anti-CD45 marcado con colorante AF647) para identificar linfocitos. La Fig. 11D muestra un gráfico de manchas (células) por la intensidad del marcador FL-15 (anti-CD16 marcado con colorante PE) frente a la intensidad de FL-9 (señal de dispersión de campo oscuro) para identificar neutrófilos y eosinófilos.

La identificación inicial de monocitos (9,6%, como se muestra en la Fig. 11A) se utiliza para guiar la posterior identificación de basófilos (0,68%, como se muestra en la Fig. 11B). La identificación de monocitos y basófilos como se muestra en las Fig. 11A y 11B se utiliza para guiar la posterior identificación de neutrófilos y eosinófilos (68% de neutrófilos, 3,2% de eosinófilos, de los GB que se muestran en la Fig. 11D). Finalmente, los linfocitos se identifican como se muestra en la Fig. 11C (93% de los GB trazados en la Fig. 11C, que corresponde a 18% de las células en la muestra original).

Los presentes métodos se correlacionan bien con otros métodos. Se hicieron recuentos de glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas con muestras de sangre completa anti-coagulada con EDTA. Los glóbulos blancos se contaron adicionalmente para determinar el número de neutrófilos, monocitos y linfocitos en la muestra. En las mediciones que se muestran en la Fig. 12, las muestras de sangre completa anti-coagulada con EDTA se dividieron en dos, y una parte de las muestras se procesaron en el sistema descrito en la presente memoria, utilizando los métodos descritos en la presente memoria. La otra parte de las muestras se ejecutó en un sistema Abbott CELL-DY Ruby System (Abbott Diagnostics, Lake Forest, IL, EE.UU.), un analizador hematológico automatizado multiparamétrico comercial. En la Fig. 12 se muestra una comparación de los resultados obtenidos con ambos métodos.

Como se muestra en las Fig. 12A-12C, los números de glóbulos blancos ("GB", Fig. 12A), glóbulos rojos ("GR", Fig. 12B) y plaquetas (Fig. 12C) medidos mediante los métodos actuales se correlacionaron bien con el número de GB, GR y plaquetas medido por otros métodos en alícuotas correspondientes de las mismas muestras que se analizaron mediante los métodos actuales. Como se muestra en las Figs. 12D-12F, los números de neutrófilos, monocitos y linfocitos medidos por cualquiera de los métodos fueron muy similares y se correlacionaron bien entre sí.

En aspectos del término utilizado en la presente memoria, el término "citometría" se refiere a observaciones, análisis,

métodos y resultados con respecto a las células de una muestra biológica, donde las células están sustancialmente en reposo en un fluido o en un sustrato. Las células detectadas y analizadas por citometría pueden ser detectadas y medidas por cualquier detector óptico, eléctrico o acústico. La citometría puede incluir preparar y analizar imágenes de células en o desde una muestra biológica (p. ej., imágenes bidimensionales). Las células se pueden marcar (p. ej., con marcas fluorescentes, quimioluminiscentes, enzimáticas u otras) y sembrar (p. ej., dejar que se sedimenten sobre un sustrato) y, por lo general, se pueden obtener imágenes por medio de una cámara. Se puede utilizar un microscopio para la obtención de imágenes celulares en citometría; por ejemplo, se pueden obtener imágenes de las células por medio de una cámara y un microscopio, p. ej., por medio de una cámara que forma una imagen utilizando un microscopio. Una imagen formada por, y utilizada para, citometría incluye típicamente más de una célula.

Sistemas ópticos

Con referencia ahora a la Figura 6A y 6B, se describirán a continuación realizaciones de un sistema óptico adecuado para su uso en la presente memoria. Aunque estas realizaciones del sistema se describen en el contexto de la posibilidad de llevar a cabo la citometría, también se debe entender que las realizaciones del sistema también pueden tener usos y capacidades más allá de la citometría. A modo de ejemplo y no de limitación, las capacidades de obtención de imágenes y procesamiento de imágenes de los sistemas descritos en la presente memoria se pueden utilizar para muchas aplicaciones, incluyendo aplicaciones fuera de la citometría. Dado que las imágenes de la muestra que se analiza se capturan, y la información de la imagen suele estar vinculada o asociada en el sistema a mediciones cuantitativas, se pueden analizar adicionalmente las imágenes asociadas con la información cuantitativa para recopilar información clínica en las imágenes que de otra forma no se notificarían.

Una muestra que se vaya analizar, p. ej., mediante citometría u otro medio óptico o de formación de imágenes, se puede mantener en un portamuestras para su análisis. Por ejemplo, una cubeta puede servir como un portamuestras. La realización mostrada en la Figura 6A muestra una vista en perspectiva de una cubeta 600 que tiene una pluralidad de aberturas 602 para recibir una muestra o parte de la misma para su análisis. La forma de sección transversal horizontal de la realización de la Figura 6A es una forma de sección transversal horizontal rectangular. Aunque el sistema se describe en el contexto de una cubeta, se debe entender que también se pueden utilizar otros dispositivos portamuestras en lugar de, o combinados con, la cubeta 600.

Como se observa en la realización de la Figura 6A, las aberturas 602 pueden permitir que un sistema de manejo de muestras (no mostrado) u otro sistema de suministro deposite la muestra en la abertura 602 que puede estar conectada con, y puede llevar a, una zona de análisis 608 en la cubeta donde se puede analizar la muestra. En un ejemplo no limitante, una zona de análisis 608 puede ser una cámara. En otro ejemplo no limitante, una zona de análisis 608 puede ser un canal. En realizaciones, una zona de análisis 608 que está configurada como un canal puede conectar dos puertos de entrada 602. En otro ejemplo no limitante adicional, una zona de análisis 608 puede ser un canal en donde la muestra se mantiene de una manera sin flujo. En cualquiera de las realizaciones de la presente memoria, el sistema puede contener las muestras de una manera sin flujo durante el análisis. Opcionalmente, algunas realizaciones alternativas se pueden configurar para permitir el flujo de muestra a través de la zona de análisis antes, durante o después del análisis. En algunas realizaciones, después del análisis, la muestra se extrae de la cubeta 600 y a continuación se suministra a otra estación (en un sistema que tenga varias estaciones) para un procesamiento adicional y/o para un procesamiento y/o análisis adicionales. En algunas realizaciones se puede utilizar ventanas en el sistema para controlar el flujo de la muestra.

La Figura 6A muestra que, en algunas realizaciones de una cubeta 600, una cubeta 600 puede tener una pluralidad de aberturas 602. La muestra se puede añadir al portamuestras a través de los puertos de entrada 602. Una abertura 602 puede conectarse operablemente (p. ej., en continuidad de fluidos) con una zona de análisis 608. Una zona de análisis 608 puede conectarse operablemente (p. ej., en continuidad de fluidos) con una pluralidad de aberturas 602. Se entenderá que algunas realizaciones pueden tener más, o pueden tener menos, aberturas 602 en la cubeta 600. Algunas realizaciones pueden conectar ciertas aberturas 602, de manera que los pares seleccionados u otros conjuntos de aberturas 602 puedan acceder al mismo canal (p. ej., la zona de análisis 608 que está configurada como un canal). A modo de ejemplo no limitante, puede haber una abertura 602 en cada extremo de una zona de análisis 608. Opcionalmente, puede haber una o más aberturas 602 en un extremo de una zona de análisis 608.

Las realizaciones de una cubeta 600 pueden tener estructuras 610 que permiten que un sistema de manejo de muestras se acople y transporte la cubeta 600. Una cubeta 600 como se ilustra en la Figura 6A y la Figura 6B se puede acoplar a un sistema de manejo de muestras a través de un elemento 610, eficaz de manera que la cubeta 600 puede ser transportada de una localización a otra. También se puede utilizar un elemento 610 para asegurar una cubeta 600 en una localización deseada, p. ej., antes o después del transporte a una localización (tal como sobre un detector para imágenes ópticas y análisis), una cubeta 600 se puede mantener en posición mediante un elemento 610 o mediante una herramienta o dispositivo que utiliza un elemento 610 para mantener una cubeta 600 en posición. En un ejemplo no limitante, las estructuras 610 pueden ser aberturas en la cubeta 600 que permiten que una pipeta u otro miembro alargado se acoplen a la cubeta 600 y la transporten a la localización deseada. Opcionalmente, en lugar de o en combinación con dicha o dichas aberturas, las estructuras 610 pueden ser, o pueden incluir, una protuberancia, un gancho, un imán, un elemento magnetizable, un elemento metálico y/u otra

característica que se pueda utilizar para acoplar un dispositivo de transporte de cubetas. En realizaciones, se puede aplicarse fuerza (p. ej., compresión u otra fuerza) a una cubeta 600; por ejemplo, la compresión se puede aplicar a una cubeta 600 para presionar una cubeta 600 sobre un sustrato o superficie (p. ej., una superficie de un soporte de base 620), eficaz para colocar la cubeta 600 en contacto óptico efectivo con la superficie. En realizaciones, tal fuerza (p. ej., compresión) puede ayudar a proporcionar las propiedades ópticas deseadas, tales como proporcionar un buen contacto entre una cubeta 600 y un soporte de base 620, eficaz para permitir el paso de la luz sin distorsión significativa en la interfase, o sin una reflexión significativa en la interfase, u otra propiedad óptica deseada. En realizaciones, se puede aplicar tal fuerza (p. ej., compresión), al menos en parte, a través de una estructura 610 o a través de múltiples estructuras 610.

5 Como se muestra en la Figura 6B (en una vista en perspectiva), una cubeta 600 puede tener una forma en sección transversal horizontal circular. Una abertura 602 (o múltiples aberturas 602, que pueden estar presentes en realizaciones similares, no mostradas en la figura) puede permitir que el sistema de manejo de muestras u otro sistema de suministro depositen la muestra en la abertura 602, lo que puede conducir a continuación a una zona de análisis 608 en el cubeta donde se puede analizar la muestra. Los ejemplos no limitantes de las zonas de análisis 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 608 adecuadas incluyen una zona de análisis 608 que comprende una cámara, y una zona de análisis que comprende un canal. En realizaciones, tal zona de análisis 608 puede estar localizada dentro de una estructura anular tal como la estructura anular 604 mostrada en la Figura 6B. En realizaciones, una abertura 602 puede estar conectada a una zona de análisis 608. En realizaciones, una zona de análisis 608 dentro de una estructura 604 continuo, que conecta con una abertura 608 eficaz para permitir el flujo dentro de la cámara en cualquiera de las dos direcciones lejos de una abertura 602. En realizaciones, una zona de análisis 608 dentro de una estructura 604 puede formar un canal o cámara en forma de anillo, con un extremo que conecta con una abertura 608, y otro extremo separado o cegado desde la abertura 602, eficaz para permitir el flujo dentro de la cámara en solo una dirección lejos de la abertura 602. En realizaciones, semejante canal o cámara en forma de anillo de una vía puede tener una válvula u otra apertura en una localización distal con respecto a una abertura 602. En otro ejemplo adicional no limitante, la zona de análisis puede ser o incluir un canal en donde la muestra se mantiene de una manera sin flujo; una muestra puede ser mantenida de una manera sin flujo en una zona de análisis 608 que comprende un canal en forma de anillo, esté el canal en forma de anillo conectado a una abertura 602 desde dos direcciones, o esté el canal en forma de anillo conectado a una abertura 602 desde una sola dirección. En cualquiera de las realizaciones de la presente memoria, el sistema puede contener las muestras de una manera sin flujo durante el análisis. Opcionalmente, algunas realizaciones alternativas se pueden configurar para permitir el flujo de la muestra a través de la zona de análisis antes, durante o después del análisis. En algunas realizaciones, después del análisis, la muestra se extrae de la cubeta 600 y a continuación se suministra a otra estación (en un sistema que tiene varias estaciones) para su posterior procesamiento y/o análisis. En algunas realizaciones se puede utilizar ventanas en el sistema para controlar el flujo de la muestra.

La Figura 6B muestra solo una única estructura anular 604; sin embargo, se entenderá que, en realizaciones adicionales de una cubeta 600 con la forma ilustrada en la Figura 6B, una cubeta 600 puede tener una pluralidad de estructuras anulares 604. Por ejemplo, una cubeta 600 que tiene una pluralidad de estructuras anulares 604 puede tener estructuras anulares concéntricas 604, de diferentes tamaños, con una estructura anular exterior 604 que rodea una o más estructuras anulares internas 604. Tales estructuras anulares 604 pueden incluir zonas de análisis 608 dentro de cada estructura anular 604. La Figura 6B muestra solo una única abertura 602; sin embargo, se entenderá que, en realizaciones adicionales de una cubeta 600 con la forma ilustrada en la Figura 6B, una cubeta 600 puede tener una pluralidad de aberturas 602. Por ejemplo, una cubeta 600 que tiene una pluralidad de estructuras anulares concéntricas 604) puede tener una pluralidad de aberturas 602 (p. ej., cada estructura anular 604 puede tener al menos una abertura 602). Se entenderá que algunas realizaciones pueden tener más, o pueden tener menos, aberturas 602 en una cubeta 600. Algunas realizaciones pueden conectar ciertas aberturas 602 de modo que pares seleccionados u otros conjuntos de aberturas 602 puedan acceder al mismo canal o cámara. A modo de ejemplo no limitante, puede haber una abertura 602 en cada extremo de una zona de análisis. Opcionalmente, más de una abertura 602 puede estar en un extremo de una zona de análisis 608.

Algunas realizaciones de cubetas como se ilustra en las Figuras 6A y 6B pueden proporcionar estructuras 604 sobre zonas seleccionadas de una cubeta 600. En una realización, las estructuras 604 son nervaduras que proporcionan soporte estructural para las zonas de la cubeta que se seleccionan para tener una espesor controlado (p. ej., zonas 613). Por ejemplo, el grosor puede seleccionarse para proporcionar las propiedades ópticas deseadas, incluyendo las trayectorias deseadas para que la luz siga antes y después de la reflexión dentro de la cubeta 600. Tal reflexión puede ser una reflexión interna parcial (PIR) o una reflexión interna total (TIR). Que tal reflexión ocurra depende de muchos factores, incluyendo la longitud de onda de la luz; el ángulo de incidencia de la luz que alcanza una superficie; la composición del material (de la zona 613 y de un entorno o material fuera del límite de una zona 613); y otros factores. En las realizaciones mostradas en la Figura 6A, las estructuras 604 son de forma rectangular y tienen una sección transversal rectangular. En las realizaciones mostradas en la Figura 6B, las estructuras 604 son de forma anular, y pueden tener una sección transversal rectangular, o una sección transversal trapezoidal, o una sección transversal con otra forma. Tales estructuras pueden tener cualquier forma de sección transversal adecuada. Como se ilustra en la Fig. 8B, tales estructuras 604 pueden tener una sección transversal triangular (p. ej., formando una sección transversal en forma de diente de sierra cuando están presentes múltiples nervaduras). Se

entenderá que tales estructuras 604 también pueden tener otras formas y secciones transversales (p. ej., semicirculares, elípticas, irregulares u otras formas), y que, en realizaciones, más de una forma puede estar presente en el mismo sistema (p. ej., una cubeta puede incluir estructuras rectangulares, triangulares o con otra forma). Las estructuras 604 se pueden utilizar cuando las zonas de espesor controlado 613 tienen un grosor reducido con respecto a ciertas zonas de la cubeta y, por lo tanto, podrían beneficiarse del soporte mecánico proporcionado por las estructuras 604.

Además de proporcionar soporte estructural, las estructuras 604 pueden ser útiles para proporcionar material y trayectorias para la reflexión interna de la luz dentro de una cubeta 600. Como se muestra en las Figuras 8A-8D, la luz reflejada dentro de una cubeta 600 puede incluir trayectorias para la luz reflejada dentro de una estructura 604 (p. ej., una nervadura o una estructura que tiene una sección transversal triangular, como se muestra en las figuras, o cualquier otra forma, tal como una sección transversal circular o semicircular, u otra forma de sección transversal). Las estructuras 604 pueden proporcionar características convexas que se extienden hacia fuera desde una superficie 614 de una cubeta 600; o pueden proporcionar características cóncavas que se extienden hacia dentro desde una superficie 614 de una cubeta 600; o pueden proporcionar características tanto cóncavas como convexas en una superficie 614 de una cubeta 600. Por lo tanto, las estructuras 604 pueden proporcionar soporte mecánico a una cubeta 600, pueden proporcionar propiedades ópticas deseadas, incluyendo trayectorias ópticas, a una cubeta 600, y pueden proporcionar otras características y capacidades deseables y útiles a una cubeta 600 como se describe en la presente memoria.

Las estructuras de soporte 604 pueden ser útiles por lo tanto para proporcionar soporte estructural, incluyendo, p. ej., rigidez, a una cubeta 600. Las propiedades ópticas de una cubeta 600 pueden ser importantes para su uso en la obtención de imágenes ópticas y otras mediciones ópticas de muestras en una zona de análisis 608 y de células, partículas y otros componentes de tales muestras. El mantenimiento de la planitud apropiada de una superficie de una cubeta 600, incluyendo el mantenimiento de la planitud de una porción de base 606, o una superficie 614 o 618; el mantenimiento de la orientación y configuración adecuadas de una cubeta 600 (p. ej., sin torsión, flexión u otra distorsión); y el mantenimiento de la colocación correcta de una cubeta 600 (p. ej., sobre un soporte 620 de base, o dentro de una configuración óptica) pueden ser importantes para la integridad de las mediciones ópticas y las imágenes obtenidas utilizando la cubeta 600. Así, por ejemplo, el diseño y la construcción de las estructuras de soporte 604 y la porción de base 606 pueden ser factores importantes para proporcionar y mantener las propiedades ópticas adecuadas de una cubeta 600. El mantenimiento de las dimensiones adecuadas de una zona de análisis 608, incluyendo el mantenimiento de las distancias adecuadas y los ángulos relativos de las superficies superior e inferior (o de las paredes laterales) de una zona de análisis 608 puede ser importante para proporcionar una iluminación correcta y uniforme de una muestra dentro de una zona de análisis 608. El mantenimiento de las dimensiones adecuadas de una zona de análisis 608 también puede ser importante para asegurar que el volumen de una zona de análisis 608, y por lo tanto el volumen de muestra dentro de la zona de análisis 608, es correcto. Como se explica en la presente memoria, se puede aplicar fuerza (p. ej., compresión) a una cubeta 600 para asegurar aún más la planitud adecuada, o para disminuir la torsión o distorsión o de lo contrario, para asegurar la forma, el tamaño y la orientación adecuados de una cubeta durante el uso. Se entenderá que la compresión puede no ser necesaria para asegurar tal planitud adecuada y la forma, tamaño y orientación adecuados de una cubeta durante el uso. Por ejemplo, en realizaciones, las estructuras 604 solas pueden ser suficientes para ayudar o asegurar que una cubeta 600 tenga la planitud adecuada y la forma, el tamaño y la orientación adecuados durante el uso. Además, se entenderá que, en realizaciones, la compresión sola puede ser suficiente para ayudar o asegurar tal planitud adecuada y la forma, tamaño y orientación apropiados de una cubeta 600 durante el uso. Se entenderá que, en realizaciones, la combinación de estructuras 604 y compresión puede ayudar o asegurar el mantenimiento de la planitud adecuada y la forma, tamaño y orientación adecuados de una cubeta durante el uso.

Una cubeta 600, que incluye una estructura de soporte 606 y una porción de cubierta 612, puede estar fabricada de cualquier material que tenga propiedades ópticas adecuadas. En realizaciones, una cubeta 600, que incluye una estructura de soporte 606 y una porción de cubierta 612, puede estar fabricada de vidrio (p. ej., vidrio de cuarzo o borosilicato, vidrio de aluminosilicato, vidrio de silicato de sodio u otro vidrio). En realizaciones, una porción de cubierta 612 o un soporte de base 620 pueden estar fabricados de un polímero acrílico o uno claro (p. ej., una cicloolefina, un policarbonato, un poliestireno, un polietileno, un poliuretano, un poli(cloruro de vinilo) u otro polímero o copolímero), u otro material transparente. Además de las propiedades ópticas de dichos materiales, las propiedades físicas (p. ej., dureza, rigidez, punto de fusión, capacidad de mecanizado y otras propiedades), la compatibilidad con otros materiales, el coste, y otros factores pueden afectar a la elección del material utilizado para fabricar una cubeta 600. Como se discutió anteriormente, la presencia de estructuras 604, la disponibilidad de compresión (p. ej., como la que se puede aplicar a través de una estructura 610, o directamente a al menos una porción de una estructura de soporte 606 y una porción de cubierta 612), y otros factores, pueden permitir el uso de materiales que pueden ser menos rígidos que el cuarzo, por ejemplo, y aún así pueden proporcionar las propiedades ópticas y mecánicas necesarias para el uso en los sistemas y métodos descritos en la presente memoria. Además, la presencia de estructuras 604, la disponibilidad de compresión y otros factores pueden permitir el uso de técnicas de fabricación y tolerancias que de otro modo podrían no ser posibles (p. ej., debido a la posibilidad de deformación u otros factores) en ausencia de tal estructura, compresión, y otros factores. Adicionalmente, la presencia de estructuras 604, la disponibilidad de compresión, y otros factores, pueden permitir el uso de materiales, incluyendo materiales menos costosos, que se podrían utilizar de otro modo en ausencia de tal estructura, compresión, y otros

factores.

Por lo tanto, el diseño, la construcción y los materiales adecuados para las estructuras de soporte 604 y las porciones de base 606 son importantes para las cubetas 600 y su uso.

- En algunas realizaciones, estas zonas de espesor controlado 613 (véanse, p. ej., las Figuras 8A, 8B y 8D) se seleccionan para ubicarlas sobre las zonas de análisis 608. En algunas realizaciones, estas zonas de espesor controlado 613 pueden conferir ciertas propiedades ópticas sobre o cerca de las zonas de análisis. Algunas realizaciones pueden configurar las estructuras 604 para conferir también propiedades ópticas a la luz que pasa a través de la cubeta 600. Opcionalmente, en algunas realizaciones, las estructuras 604 se pueden configurar para que no tengan un impacto en las cualidades ópticas de la cubeta 600. En tal realización las estructuras 604 se pueden configurar para que tengan una o más superficies ópticamente absorbentes. Por ejemplo y sin limitación, ciertas superficies pueden ser de color negro. Opcionalmente, algunas realizaciones pueden tener las estructuras 604 formadas a partir de un material para absorber la luz. Opcionalmente, las estructuras 604 se pueden ubicar para proporcionar soporte mecánico pero sin interactuar con las propiedades ópticas de la cubeta 600 cerca de las zonas de análisis.
- Por ejemplo, ciertas superficies, incluyendo una superficie 614 de una zona de espesor controlado 613, y una superficie 618 de una estructura 604, se pueden recubrir con un recubrimiento de color negro u otro color. Tal recubrimiento puede incluir una capa, y puede incluir múltiples capas. Por ejemplo, los recubrimientos adecuados de una superficie 614 o 618 pueden incluir 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más capas. En realizaciones, p. ej., una superficie de una estructura 604 (p. ej., una superficie 618) o una superficie 614 puede estar cubierta por 3 o 5 capas de recubrimiento. Tal recubrimiento puede incluir un colorante, una tinta, una pintura, un tratamiento de superficie, una cinta de color u otro recubrimiento o tratamiento de superficie. En realizaciones, se puede utilizar un marcador de color negro u otro color (p. ej., Paper Mate®, o Sharpie®, o Magic Marker®, u otro marcador) para recubrir una superficie 614 de una zona de espesor controlado 613 o una superficie 618 de una estructura 604. Por ejemplo, se puede utilizar un marcador de color negro extra grande para aplicar varias capas de tinta de color negro a una superficie 614 o a la superficie exterior 618 de una estructura 604 para proporcionar una superficie ópticamente absorbente y así mejorar las cualidades ópticas de una cubeta 600. En realizaciones, una superficie 614 o 618 se puede recubrir o tratar para afectar o reducir la reflectancia (ya sea PIR o TIR) en la superficie. Una reducción de la reflectancia en una superficie puede afectar (p. ej., reducir) a la iluminación de fondo de una superficie.
- En realizaciones, ciertas superficies, incluyendo una superficie 614 de una zona de espesor controlado 613, y una superficie 618 de una estructura 604, se pueden recubrir o cubrir con un material que mejora la reflectancia en la superficie. La reflectancia en una superficie se puede aumentar, por ejemplo, recubriendo una superficie, o uniendo un material a una superficie; los materiales adecuados para aumentar la reflectancia incluyen aluminio, plata, oro y materiales dieléctricos (p. ej., fluoruro de magnesio, fluoruro de calcio u otra sal u óxido metálico; u otro material reflectante o dieléctrico). Tal recubrimiento o cubierta puede incluir una capa, y puede incluir múltiples capas. Por ejemplo, los recubrimientos y cubiertas adecuados de una superficie 614 o 618 pueden incluir 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más capas. Un aumento en la reflectancia en una superficie puede afectar (p. ej., aumentar) la trans-iluminación desde una superficie. Un aumento en la reflectancia en una superficie puede ayudar o mejorar la obtención de imágenes de una muestra dentro de una zona de análisis 608, o puede ayudar o mejorar el análisis óptico de una muestra dentro de una zona de análisis 608.
- Se debe entender que la cubeta 600 se forma típicamente a partir de un material ópticamente transparente u ópticamente transmisor. Opcionalmente, solo las partes seleccionadas de la cubeta 600 (tal como, por ejemplo, las zonas de análisis o zonas asociadas con las zonas de análisis) son ópticamente transparentes u ópticamente transmisoras. Opcionalmente, las capas o zonas seleccionadas en la cubeta 600 también se pueden configurar para que no sean transmisoras de luz. Una porción o una zona de una cubeta se pueden cubrir o recubrir para que absorban luz; por ejemplo, una superficie (o una porción de la misma) puede estar recubierta con un colorante o tinta oscura o que absorba luz. En un ejemplo adicional, una superficie (o porción de la misma) puede cubrirse con un recubrimiento oscuro o que absorba luz, tal como un material oscuro o que absorba luz, p. ej., cinta o tela, o papel o goma o plástico.
- Las Figuras 6A, 6B y 8A - 8D ilustran realizaciones en las que la cubeta 600 descansa sobre un soporte de base 620 en donde parte o todo el soporte de base 620 se forma a partir de un material ópticamente transparente o transmisor. En algunas realizaciones, las porciones ópticamente transparentes o transmisoras están configuradas para alinearse con las zonas de análisis de la cubeta 600 para permitir la interrogación óptica de la muestra en la zona de análisis. En un ejemplo no limitante, el soporte de base 620 se puede mover en los ejes X, Y y/o Z para mover la cubeta 600 a una posición deseada para la obtención de imágenes. En algunas realizaciones, el soporte de base 620 comprende una plataforma o nivel que se mueve solo en dos de los ejes. Opcionalmente, algunas estructuras de soporte pueden moverse solo en un solo eje. La cubeta 600 se puede configurar para que se acople operablemente a la estructura de soporte 600 mediante fricción, acoplamiento mecánico o mediante miembros de retención montados en uno o ambos componentes. En realizaciones, se puede aplicar compresión u otra fuerza a una cubeta 600 o un soporte de base 620, o ambos, para asegurar un contacto adecuado y un ajuste adecuado entre una cubeta 600 y un soporte de base 620. En realizaciones, tal compresión puede ayudar a asegurar que una superficie ópticamente transmisora de una cubeta 600, o de un soporte de base 620, o tales superficies de ambas,

sea ópticamente plana y sustancialmente libre de distorsión. Por ejemplo, en realizaciones, una cubeta 600 puede presionarse contra un soporte de base 620 para reducir u obviar cualquier posible distorsión óptica que pueda ser causada por imperfecciones o anomalías en una superficie óptica de una cubeta 600. En realizaciones, tal fuerza (p. ej., compresión) puede ayudar a proporcionar las propiedades ópticas deseadas, eficaces para permitir el paso de la luz sin la distorsión en la interfase que se podría producir de otro modo. En realizaciones, tal fuerza (p. ej., compresión) se puede aplicar, al menos en parte, a través de una estructura 610 o a través de múltiples estructuras 610.

Las Figuras 6A, 6B, 8A, 8B, 8C y 8D muestran adicionalmente realizaciones en las que la iluminación para la observación de campo oscuro y/o campo claro pueda ser proporcionada por una fuente de iluminación 650 (tal como, pero sin limitarse a, una luz anular, como se muestra) colocada debajo del soporte de base 620 para ubicar el equipo de iluminación por debajo del nivel de la cubeta 600. Esta configuración deja las zonas superiores de la cubeta 600 disponibles para pipetas, equipo de manejo de muestras u otro equipo para tener acceso sin obstáculos a las aberturas u otras características en una superficie superior de la cubeta 600. Opcionalmente, algunas realizaciones pueden ubicar una fuente de iluminación 660 (mostrada en trazo discontinuo) sobre la cubeta 600 para ser utilizada en lugar de, en una combinación individual o múltiple con iluminación inferior (p. ej., fuente una iluminación inferior 650 como se muestra). Un objetivo 670 se puede situar como se muestra, o en otras configuraciones, para observar cómo se ilumina la muestra. Se debe entender que el movimiento relativo entre la cubeta 600 y las porciones ópticas 650 y 670 se puede utilizar para permitir que el sistema visualice diferentes zonas de análisis en la cubeta 600. Opcionalmente, solo uno de tales componentes se pone en movimiento para interrogar diferentes zonas de la cubeta 600.

Con referencia ahora a la Figura 7A, se describirá a continuación con más detalle una realización de la presente invención de un sistema de obtención de imágenes adecuado. La Figura 7A muestra una vista esquemática en sección transversal de varios componentes colocados debajo del soporte de base 620. La sección transversal es a lo largo del área indicada por las flechas curvadas 7 en la Figura 6A.

La Figura 7A muestra una realización de la presente invención en la que la cubeta 600 comprende una porción de base 606 y zonas de análisis 608 definidas por una porción de cubierta 612. Opcionalmente, las zonas de análisis 608 se pueden definir dentro de una sola pieza. Opcionalmente, las zonas de análisis 608 se pueden definir utilizando más de dos piezas, tal como, pero sin limitarse a, una pieza de cubierta discreta para cada una de las zonas de análisis 608. En una realización, la capa 606 comprende plástico ópticamente claro, tal como, pero sin limitarse a, polímero termoplástico cicloolefínico que suministra componentes ópticos y aplicaciones superiores. Algunos pueden formar una o más capas o componentes de vidrio, polímero acrílico claro u otro material transparente. La cubeta 600 ilustrada en la Figura 7A incluye cinco zonas de análisis 608 separadas; estas zonas se muestran en sección transversal en la figura; las zonas de análisis 608 que tienen tal sección transversal pueden ser rectangulares, cuadradas u de otra forma. Por ejemplo, las zonas de análisis 608 pueden comprender canales alargados que proporcionan cámaras poco profundas con cantidades relativamente grandes de área de superficie a través de las cuales se pueden observar las muestras. Se entenderá que una cubeta 600 puede incluir una zona de análisis única 608; o puede incluir dos zonas de análisis 608; o puede incluir tres zonas de análisis 608; o puede incluir cuatro zonas de análisis 608; o puede incluir cinco (como se muestra en la Figura 7A) o más zonas de análisis 608.

En este ejemplo no limitante, la muestra que se debe interrogar se puede alojar en su totalidad o en parte en la zona 608. A modo de ejemplo no limitante, la óptica debajo del soporte 620 de base puede incluir una luz anular 650 que comprende un reflector toroidal 652 y una fuente de luz 654. Se pueden utilizar otros componentes de iluminación adecuados para iluminación de campo oscuro; por lo tanto, la óptica puede incluir otras fuentes de iluminación, solas o combinadas con tal luz anular. En algunas realizaciones se puede utilizar un espejo. En algunas realizaciones se puede utilizar una superficie reflectante recubierta. En algunas realizaciones se puede utilizar un reflector diferente a los que se muestran en la figura (p. ej., puede no utilizarse reflexión toroidal para iluminar una muestra). En algunas realizaciones se puede utilizar un reflector parabólico. En algunas realizaciones se puede utilizar un reflector parabólico en forma de un paraboloide elíptico. En algunas realizaciones se puede utilizar una pluralidad de piezas reflectoras individuales. Algunas realizaciones pueden no utilizar ningún reflector. Algunas realizaciones obtienen iluminación oblicua mediante el uso de fuentes de luz en ángulo posicionadas para dirigir la luz con o sin asistencia adicional de uno o más reflectores externos.

La realización de la presente invención ilustrada en la Figura 7A muestra fuentes de energía de excitación 680, 682 y 684, tales como, pero sin limitarse a, diodos láser a longitudes de onda específicas que se montan para dirigir la luz hacia la muestra en la zona de análisis 608. En un ejemplo no limitante para facilitar el empaquetamiento compacto, las fuentes de energía 680, 682 y 684 pueden dirigir la luz a un elemento dicroico 690 (p. ej., un espejo dicroico o un divisor de haz) que a continuación dirige las longitudes de onda de excitación hacia la zona de análisis 608. Las longitudes de onda de excitación hacen que las longitudes de onda de fluorescencia sean emitidas por fluoróforos en los marcadores, colorantes y/u otros materiales en la muestra. Las longitudes de onda de fluorescencia emitidas se canalizan a través del objetivo 670, a través del elemento dicroico 690, a través de una rueda de filtro opcional 692, y a un detector 700 tal como, pero sin limitarse a, un sistema de cámara. A modo de ejemplo no limitante, el elemento dicroico 690 se configura para reflejar longitudes de onda de excitación pero dejar pasar longitudes de onda de fluorescencia y cualquier longitud de onda deseada para la observación óptica.

En una realización, todas las longitudes de onda de excitación de fluorescencia iluminan la muestra en la zona de análisis 608 simultáneamente. Por ejemplo, un detector 700 puede estar acoplado a un procesador programable 710 que puede tomar la señal y/o imagen capturada y deconstruir qué longitudes de onda están asociadas con qué fluoróforos que están emitiendo fluorescencia. En algunas realizaciones, las fuentes de excitación pueden iluminar la muestra secuencialmente o en subconjuntos de la cantidad total de fuentes de excitación. Por supuesto, debe entenderse que el sistema no se limita a la excitación de fluoróforos basada en fluorescencia en una muestra, y que se pueden utilizar otras técnicas de detección y técnicas de excitación en lugar de, o en combinación única o múltiple con fluorescencia. Por ejemplo, en algunas realizaciones también se puede recoger la información de dispersión de iluminación de campo oscuro simultáneamente o secuencialmente combinada con la detección de fluorescencia.

- 5 La luz dispersada por un objeto en una muestra dentro de un portamuestras (p. ej., una célula, una cuenta o un cristal) se dispersará en una pluralidad de ángulos de dispersión, donde un ángulo de dispersión se puede medir con respecto a un rayo de luz incidente que pasa de una fuente de luz al objeto. Tal pluralidad de ángulos de dispersión comprende un intervalo de ángulos de dispersión. Tal portamuestras puede tener las características que se describen en la presente memoria, y puede estar configurado para proporcionar trayectorias para reflexiones de luz interna. Una lente objetivo configurada para obtener imágenes del objeto reunirá y enfocará la luz dispersada, donde la luz puede pasar a un detector. Tal luz enfocada por una lente objetivo y enfocada a un detector puede formar un punto de luz en el detector. En realizaciones, la luz que pasa desde la lente objetivo al detector puede ser enfocada por una lente adicional; tal enfoque puede reducir el tamaño del punto de luz formado en el detector. La luz enfocada en un detector, pase o no a través de una lente adicional, comprenderá luz dispersada en una pluralidad de ángulos de dispersión desde el objeto dentro del portamuestras.
- 10
- 15
- 20

Los autores de la presente solicitud describen en la presente memoria métodos, sistemas y dispositivos (p. ej., portamuestras) que permiten la detección de un intervalo menor de ángulos de dispersión de lo que de otra manera sería posible, proporcionando así una mayor resolución y una mejor obtención de imágenes de las muestras y de los objetos dentro de una muestra. Los autores de la presente solicitud describen en la presente memoria características de diseño para cubetas que se pueden utilizar para controlar los ángulos e intensidades de los rayos de luz incidentes en la muestra, p. ej., a través de PIR y TIR, eficaces para controlar los ángulos en los que se mide la luz dispersada.

Debido a las restricciones impuestas por la óptica no relacionada con la obtención de imágenes de muchos sistemas (p. ej., el alcance, o la extensión de la propagación de la luz que pasa a través del sistema), los ángulos de dispersión de la luz que llegan a un detector pueden ser más amplios de lo deseado. Por ejemplo, en algunas combinaciones de luz anular-cubeta que usan LED como fuentes de luz, los rayos de luz que encuentran la muestra pueden propagarse al menos 20 grados alrededor del ángulo principal. En otras palabras, si el rayo principal encuentra la muestra a 60 grados, los otros rayos del haz de rayos de luz pueden encontrar la muestra a ángulos de dispersión de aproximadamente 50 grados a aproximadamente 70 grados. Se entenderá que la propagación del cono de los ángulos de dispersión de la luz recogida por un objetivo depende de la apertura numérica de la lente. En tal caso, la luz recogida por la lente objetivo (p. ej., que tiene una apertura numérica de 40 grados estaría en un cono de alrededor de 30 a 70 grados). En consecuencia, la luz dispersada en una amplia gama de ángulos de dispersión llegará al detector; por ejemplo, tal sistema medirá toda la luz dispersada por la muestra en un cono grande centrado alrededor de 60 grados +/- 40 grados. Sin embargo, como se describe en la presente memoria, algunas aplicaciones requieren la detección de luz dentro de un intervalo más estrecho de ángulos de dispersión, p. ej., dentro de un intervalo muy estrecho de ángulos (es decir, 60 +/- 5 grados). Los autores de la presente solicitud describen en la presente memoria que, para proporcionar mediciones de luz dentro de este intervalo más estrecho, se puede colocar una apertura en plano el Fourier (o plano focal posterior) de la lente objetivo (o cualquier plano conjugado con este plano). En el plano de Fourier, la información del ángulo se codifica espacialmente. Por lo tanto, dependiendo de la forma y el tamaño de esta apertura, se puede evitar que la luz proveniente de la muestra a ángulos específicos alcance el detector (p. ej., se bloquea o filtra), una apertura anular bloqueará o filtrará los ángulos internos (es decir, 60 +/- 30 grados). Por lo tanto, la medición resultante se puede adaptar a los ángulos deseados.

En realizaciones, se puede proporcionar una apertura a través de la cual pasa la luz de una lente objetivo antes de contactar con un detector. En realizaciones, se puede proporcionar una apertura a través de la cual pasa la luz de una lente adicional (después de pasar a través de una lente objetivo) antes de contactar con un detector. Cuando tal apertura está configurada para limitar la luz que pasa al detector, la luz que pasa se reducirá a luz desde menos ángulos de dispersión, y a la luz desde un intervalo menor de ángulos de dispersión, que la luz que pasa a través de la ausencia de tal apertura. En realizaciones, tal apertura puede comprender un único orificio, tal como un orificio circular. En realizaciones, tal apertura puede comprender un único anillo, tal como un anillo circular a través del cual puede pasar la luz, y que tiene una zona central (p. ej., una zona circular) a través de la cual no pasa luz. En realizaciones, tal apertura puede comprender dos, o tres, o más, anillos concéntricos a través de los cuales puede pasar la luz, y puede incluir una zona central (p. ej., una zona circular) a través de la cual no pasa luz. En realizaciones, tal apertura puede comprender una forma distinta de una forma circular o anular.

Tal apertura dispuesta entre un objetivo y un detector, p. ej., dispuesta entre una lente adicional y un detector (donde la luz pasa a través de una lente objetivo antes de pasar a través de la lente adicional), ofrece la ventaja de una mejor discriminación de la luz dispersada desde la muestra, mejorando la resolución de las imágenes de dispersión de luz (p. ej., imágenes de campo oscuro) obtenidas de la muestra. En realizaciones en las que la intensidad de la

luz puede ser un factor, la intensidad de la luz aplicada (p. ej., desde una fuente de luz o desde múltiples fuentes de luz) puede incrementarse en configuraciones que tienen una apertura como se describe en la presente memoria, en comparación con configuraciones que carecen de una apertura como se describe en la presente memoria.

5 Un sistema puede incluir un portamuestras que tiene las características que se comentan y describen en la presente memoria, y fuentes de luz, espejos dicroicos y otros elementos que se muestran en la Fig. 7A. Como se ilustra en la Fig. 7B, los sistemas de acuerdo con las realizaciones de la presente invención que tienen características similares (p. ej., similares a las mostradas en la Fig. 7A y otras figuras en la presente memoria) pueden incluir un portamuestras 600, una fuente de luz 650 (p. ej., fuentes de luz 654, o una fuente de excitación 680, o ambas), una lente objetivo 670, una apertura 694, otra lente 696 y una lente de Fourier 698. Una apertura 694 puede tener un solo paso para permitir que la luz pase a través de un detector 700. Un detector 700 puede ser acoplado operablemente a un procesador (p. ej., un procesador programable) 710. En realizaciones, una apertura 694 puede comprender dos pasos para permitir que la luz pase a través de un detector 700. En realizaciones, una apertura 694 puede comprender tres pasos para permitir que la luz pase a través de un detector 700. En realizaciones, una apertura 694 puede comprender cuatro, o más pasos para permitir que la luz pase a través de un detector 700. En realizaciones, un paso en una apertura 694 puede comprender un orificio circular que permite que la luz pase a través de un detector 700. En realizaciones, un paso en una apertura 694 puede comprender dos, tres, cuatro, o más orificios circulares que permiten que la luz pase a través de un detector 700. En realizaciones, un paso en una apertura 694 puede comprender un anillo configurado para permitir que la luz pase a través de un detector 700, y puede incluir una porción central no permite que la luz pase a través de un detector 700. En realizaciones, un paso en una apertura 694 puede comprender dos o más anillos (p. ej. en realizaciones, anillos concéntricos) cada uno de los cuales está configurado para permitir que la luz pase a través de un detector 700; y tal apertura 694 puede incluir una porción central que no permite que la luz pase a través de un detector 700. Tal anillo, y tales anillos, pueden tener una forma circular, o elíptica u otra forma anular.

25 Por consiguiente, los autores de la presente solicitud describen sistemas para obtener imágenes de una muestra, que comprenden: un portamuestras, una fuente de luz para iluminar un objeto contenido dentro de dicho portamuestras, una lente objetivo configurada para recoger y enfocar la luz dispersada de un objeto mantenido dentro de dicho portamuestras, en donde dicha luz dispersada comprende luz dispersada a una pluralidad de ángulos de dispersión, una apertura óptica para pasar luz desde dicha lente objetivo, y una lente adicional configurada para enfocar la luz desde dicha lente objetivo sobre dicha apertura óptica, en donde dicha apertura óptica está configurada para permitir que solo una porción de la luz enfocada por dicha lente objetivo pase a través de la apertura, por medio de lo cual dicha porción de luz que pasa a través de dicha apertura consiste en luz dispersada en solo una parte de dicha pluralidad de ángulos de dispersión.

35 Según se utiliza en la presente memoria, los términos "epi" y "epi-iluminación" se refieren a la iluminación de una muestra por medio de una luz que se desplaza en una dirección que generalmente está alejada de un objetivo u otro elemento óptico utilizado para observar u obtener imágenes de la muestra. Por lo tanto, en ausencia de fluorescencia, se forma una imagen de una muestra iluminada por epi-iluminación con la luz reflejada o dispersada de la muestra (la luz se desplaza desde la fuente de luz a la muestra, y es reflejada o dispersada por la muestra de regreso a los elementos ópticos para observación, obtención de imágenes o medición). Segundo se utilizan en la 40 presente memoria, los términos "trans" y "trans-iluminación" se refieren a la iluminación de una muestra por medio de una luz que se desplaza en dirección hacia un objetivo u otro elemento óptico utilizado para observar u obtener imágenes del objeto (la luz se desplaza desde la fuente de luz a través de la muestra, y continúa con los elementos ópticos para la observación, obtención de imágenes o medición). Así, en ausencia de fluorescencia, se forma una imagen de una muestra iluminada por trans-iluminación con la luz que pasa a través de, o es dispersada por, la muestra.

45 Cuando una fuente de luz está dispuesta en el mismo lado de una muestra que el objetivo u otros elementos ópticos utilizados para observar u obtener imágenes de una muestra, la luz de la fuente de luz se desplaza directamente a la muestra, y típicamente se observa o se obtienen imágenes de la muestra por epi-iluminación. Sin embargo, incluso cuando se coloca una única fuente de luz en el mismo lado de una muestra que el objetivo o los elementos ópticos, un portamuestras como se describe en la presente memoria es capaz de proporcionar trans-iluminación de la muestra además de epi-iluminación. Por lo tanto, ambas direcciones de iluminación están habilitadas sin requerir la colocación de fuentes de luz a ambos lados de una muestra. Tal configuración es compacta, ahorra recursos, y, dado que la fuente de luz y otros elementos ópticos están dispuestos en un solo lado del portamuestras, la configuración permite un acceso sin obstáculos al lado del portamuestras sin interferencia de los elementos ópticos. Por lo tanto, tal configuración proporciona la ventaja de permitir la carga, mezcla y eliminación de una muestra y reactivos en el portamuestras sin interferencia con la obtención de imágenes ópticas o las mediciones, o el aparato y los elementos utilizados para la obtención de imágenes ópticas o las mediciones.

55 Como se ilustra en las imágenes que se muestran en las Figuras 4A y 4B, la adición trans-iluminación a las imágenes de campo oscuro mejora en gran medida la imagen y mejora en gran medida la información disponible de la imagen. Los métodos y sistemas descritos en la presente memoria proporcionan imágenes tan mejoradas al combinar la epi-iluminación y la trans-iluminación, utilizando la iluminación desde una sola dirección y, en realizaciones, desde una sola fuente de luz.

Como se describe en la presente memoria, un portamuestras tal como una cubeta 600 (p. ej., como se ilustra en las Figuras 8A - 8D) está configurado para permitir la reflexión interna de la luz de una fuente de luz (ya sea PIR o TIR), de modo que una muestra contenida en una zona de análisis 608 de una cubeta 600 se ilumina con luz directa (epi-iluminación; p. ej., luz que se desplaza a lo largo de la trayectoria 830) y también se ilumina con luz indirecta

5 reflejada (trans-iluminación; p. ej., luz que se desplaza a lo largo de una trayectoria 820 u 825). Como se describe en la presente memoria, la luz de una fuente de luz dispuesta en el mismo lado de una cubeta 600 que los elementos ópticos 670, 690, 700, etc., puede proporcionar tanto epi- como trans-iluminación de una muestra.

Con referencia ahora a las Figuras 8A - 8D, se describirá a continuación otra realización adicional de la presente invención. Las Figuras 8A a 8D muestran un esquema de una sección transversal de una porción de una cubeta 600

10 y la fuente de iluminación de dispersión de campo oscuro, tal como, pero sin limitarse a, la luz anular 650 que se muestra en las Figuras 6A y 6B. El soporte de base 620 también se muestra en las Figuras 8A - 8D. Las Figuras 8A a 8D incluyen corchetes y flechas para indicar estructuras o porciones de estructuras; por ejemplo, el corchete marcado 600 indica la cubeta 600 completa que se muestra en la figura; el corchete marcado 612 indica la porción de cubierta 612 de la cubeta 600. Las flechas 621 a 626 en la Figura 8A indican dimensiones para las porciones

15 indicadas de la porción de cubierta 612. Se entenderá que estas dimensiones pueden variar en diferentes realizaciones de una cubeta 600, y que tales variaciones pueden depender del tamaño, la aplicación, los materiales, las longitudes de onda ópticas, las muestras y otros elementos y factores relacionados con la construcción y el uso de una cubeta 600. Por ejemplo, en realizaciones, la distancia 621 entre las estructuras de soporte 604 puede ser entre aproximadamente 0,1 milímetro (mm) y aproximadamente 1 centímetro (cm), y en realizaciones puede estar entre

20 aproximadamente 1 mm y aproximadamente 100 mm, o entre aproximadamente 1,5 mm y aproximadamente 50 mm, o entre aproximadamente 2 mm y aproximadamente 20 mm. En realizaciones adicionales, la distancia 621 entre las estructuras de soporte 604 puede estar entre aproximadamente 0,5 mm y aproximadamente 10 mm, o entre

25 aproximadamente 1 mm y aproximadamente 5 mm. En realizaciones, la altura 622 de una estructura de soporte 604 puede estar entre aproximadamente 0,1 mm y aproximadamente 100 mm, o entre aproximadamente 0,5 mm y aproximadamente 50 mm, o entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 25 mm. En otras realizaciones, la altura 622 de una estructura de soporte 604 puede estar entre aproximadamente 0,1 mm y aproximadamente 10 mm, o entre

30 aproximadamente 1 mm y aproximadamente 5 mm. De manera similar, en realizaciones, la altura 623 de una zona de espesor controlado 613 puede estar entre aproximadamente 0,1 mm y aproximadamente 100 mm, o entre aproximadamente 0,5 mm y aproximadamente 50 mm, o entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 25 mm. En realizaciones adicionales, la altura 623 de una zona de espesor controlado 613 puede estar entre

35 aproximadamente 0,1 mm y aproximadamente 10 mm, o entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 5 mm. En realizaciones, el espesor 624 de una capa 800 puede estar entre aproximadamente 0,01 mm y aproximadamente 10 mm, o entre aproximadamente 0,05 mm y aproximadamente 1 mm, o entre aproximadamente 0,1 mm y aproximadamente 0,5 mm. En realizaciones, la anchura 625 de una zona de análisis 608 puede estar entre

40 aproximadamente 0,05 mm y aproximadamente 100 mm, o entre aproximadamente 0,5 mm y aproximadamente 50 mm, o entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 25 mm. En otras realizaciones, las anchuras 625 de una zona de análisis 608 puede estar entre aproximadamente 0,1 mm y aproximadamente 10 mm, o entre

45 aproximadamente 1 mm y aproximadamente 5 mm. En realizaciones, la anchura 626 de una estructura de soporte 604 puede estar entre aproximadamente 0,1 mm y aproximadamente 100 mm, o entre aproximadamente 0,5 mm y

50 aproximadamente 50 mm, o entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 25 mm. En realizaciones adicionales, la anchura 626 de una estructura de soporte 604 puede estar entre aproximadamente 0,05 mm y aproximadamente 10 mm, o entre

55 aproximadamente 0,5 mm y aproximadamente 5 mm.

Se entenderá que los componentes ópticos y las disposiciones para la iluminación, para la excitación, para la observación de la emisión, y similares, como se ilustra en cualquiera de las figuras de la presente memoria, pueden sugerir componentes y disposiciones que se pueden aplicar en realizaciones de otras figuras, incluso si tales componentes o disposiciones particulares no se muestran explícitamente en cada figura. Por ejemplo, aunque no se incluye una luz anular 650 u otra fuente de iluminación 650 en la Figura 8D, en ninguna de las realizaciones mostradas y en otros ejemplos, se puede utilizar una luz anular 650 u otra fuente de iluminación 650 (véanse, p. ej., las Figuras 8A, 8B y 8C) para iluminar la zona de análisis 608 (la zona de análisis 608 se muestra en las Figuras 8A y 8B).

Como ejemplos de componentes ópticos que son adecuados para su uso con una cubeta 600, los componentes de luz anular 652 y 654 se muestran en las Figuras 8A, 8B y 8D; en realizaciones, se pueden utilizar otros, u otras cantidades de, componentes de iluminación. Por ejemplo, la fuente de luz 654 puede ser fuentes luz blanca o fuentes de luz tales como, pero sin limitarse a, diodos emisores de luz (LED) o diodos láser con salida o intervalos de salida de longitud de onda específica. Opcionalmente, el anillo de la fuente de luz 654 podría ser un cable de fibra óptica configurado para proporcionar un anillo de luz (p. ej., con muchos empalmes). Opcionalmente, la fuente de luz 654 puede ser un LED que tiene un ángulo de divergencia estrecho específico controlado por el reflector. Puede ser deseable controlar el ángulo de divergencia desde una luz anular a través de la selección de la fuente de luz y/o mediante el diseño del reflector.

60 A modo de ejemplo no limitante, una fuente de luz 654 puede utilizar iluminación láser para proporcionar un patrón de luz estrecho, dando como resultado un fondo de trans-iluminación inferior en la presente configuración de iluminación de tipo epi (donde los componentes de iluminación están a un lado de la muestra) debido a la fuente de luz: proporciona un punto de luz estrecho (dirigido al interior de la zona de análisis de la muestra 608); proporciona luz de una amplitudpectral estrecha (p. ej., luz de longitudes de onda dentro de un intervalo estrecho centrado en

- torno a una longitud de onda principal concreta); y es una fuente coherente. Opcionalmente, el uso de un LED como fuente de iluminación 654 también puede proporcionar un pequeño tamaño de punto (p. ej., pequeño un tamaño de punto dentro de una zona de análisis 608) y así proporcionar algunas de las propiedades beneficiosas logradas por una fuente de luz láser. Por estas y otras razones, una fuente de luz láser (o un LED que proporciona un pequeño tamaño de punto) es eficaz para reducir los niveles de la señal de fondo en comparación con otras configuraciones de iluminación. La iluminación con láser puede reducir la luz dispersada en comparación con la que se produce normalmente con fuentes de luz más difusas, y puede así reducir el fondo en un canal (p. ej., dentro de una primera zona de análisis 608) al reducir la luz dispersada en ese canal desde un canal adyacente (p. ej., desde una segunda zona de análisis adyacente 608). Así, la iluminación con láser puede dar como resultado menos fondo de trans-iluminación de lo que se esperaría de la iluminación por fuentes de luz más difusas. Por supuesto, es deseable que la disminución en la trans-iluminación sea menor que la disminución en el fondo, donde la caída más significativa en el fondo da como resultado una señal más distinguible. Opcionalmente, el uso de un LED como fuente de iluminación 654 proporciona un patrón de luz difusa, con mayor fondo y mayor trans-iluminación. Por supuesto, es deseable que el aumento en la trans-iluminación sea mayor que el aumento en el fondo.
- Algunas realizaciones de cubetas pueden incluir cubetas formadas a partir de una pluralidad de capas individuales adheridas entre sí, que tienen la cubeta moldeada de uno o más materiales y/o que tienen capas reflectantes añadidas a la cubeta en diferentes superficies para mejorar las reflexiones internas únicas o múltiples (p. ej., para mejorar TIR o PIR).
- En realizaciones, los sistemas, cubetas y elementos ópticos descritos en la presente memoria pueden funcionar combinados con fluorescencia, puede ser deseable que la iluminación de campo oscuro utilizada con tales sistemas y cubetas no sea iluminación de luz blanca. Sin embargo, algunas realizaciones pueden utilizar solo luz blanca, p. ej., si la detección de fluorescencia no se usa combinada con microscopía de campo oscuro y/o campo claro.
- Las Figuras 8A y 8B muestran que en algunas realizaciones de la presente invención, el dispositivo puede tener capas en la cubeta 600 que son ópticamente no transmisoras, tales como la capa 800. Esto puede ser útil en realizaciones en las que la fuente de luz 654 es difusa y la luz no es dirigida a lugares específicos. La capa 800 puede bloquear la luz que no ingresa a la cubeta 600 a los ángulos y/o ubicaciones deseados. La capa 800 se puede configurar para que se coloque de modo que evite la iluminación, excepto a través de la zona por debajo de las zonas de análisis 608. Algunas pueden tener sólo zonas específicas que están oscurecidas más cerca de las zonas de análisis 608. Algunas realizaciones pueden tener material oscurecido o no transmisor en más de una capa. Algunas pueden tener material oscurecido o no transmisor en diferentes orientaciones, tales como, pero no limitadas a, aquellas que son horizontales y aquellas que son verticales o no horizontales.
- Se entenderá que, en realizaciones, una capa 800 puede ser ópticamente transmisora. Por ejemplo, la Figura 8D presenta una realización en la que una capa 800 es ópticamente transmisora. En algunas realizaciones, una capa 800 puede comprender un material ópticamente transmisor que tiene un índice de refracción que es diferente del índice de refracción de una zona 613 de espesor controlado, o de un soporte de base 620, o de ambos. En algunas realizaciones, una capa 800 puede comprender un material ópticamente transmisor que tiene un índice de refracción que es el mismo que el índice de refracción de una zona de espesor controlado 613, o de un soporte de base 620, o de ambos.
- En las Figuras 8A, 8B y 8C, se muestra una fuente de luz ubicada debajo de una cubeta 600 (cerca de la óptica 652 y 654) y proporciona luz dirigida desde la porción de base inferior 606. Se puede entender que tal fuente de luz está en su sitio en el ejemplo ilustrado en la Figura 8D también. Como se muestra en estas figuras, una fuente de luz 650 puede incluir una luz anular 654 y un reflector toroidal 652. Se pueden incluir otros elementos, incluyendo, sin limitación, lentes, filtros, rejillas, espejos y otras superficies reflectantes, fibras ópticas, prismas y otros elementos. En realizaciones, una fuente de luz puede comprender un láser, o un LED, u otra fuente de luz; y puede comprender una fibra óptica que transporta luz desde tal fuente a otra localización, y/o que dirige la luz hacia un elemento óptico. Un criterio de diseño para los sistemas ópticos es la divergencia, o ángulo de divergencia, de la luz de la fuente de luz; un haz de luz de ancho D con baja divergencia proporciona un punto más pequeño a una distancia dada de la fuente que un haz de luz de ancho D con alta divergencia. En general, se prefiere una fuente de luz 650 que proporcione luz con baja divergencia. Tales elementos y configuraciones ópticos pueden diseñarse para proporcionar luz que esté sustancialmente colimada, p. ej., la mayoría o toda la luz se dirige a lo largo de trayectorias sustancialmente paralelas hacia la muestra (p. ej., hacia una zona de análisis 608). Sin embargo, en realizaciones en las que se prefiere luz difusa o dispersa, se puede utilizar una fuente de luz 650 con alta divergencia.
- Como se muestra en la Figura 8C, una realización de la presente invención de un sistema óptico adecuado como parte del dispositivo o sistema como se describe en la presente memoria puede incluir ópticas (p. ej., una fuente de luz 650, p. ej., como se muestra en la Figura 8C como luz anular 654, y un objetivo 670), una cubeta 600 y un soporte de base 620 configurados para sostener y posicionar una cubeta para la obtención de imágenes. En realizaciones como las mostradas en la Figura 8C, un soporte de base 620 puede incluir características ópticas 802 configuradas para refractar (o difractar, o alterar de otro modo la trayectoria de) luz desde una fuente de luz 650. Como se ilustra en la Figura 8C, las características ópticas 802 pueden comprender una serie de microlentes ("lenslets"). Se entenderá que las características ópticas 802 pueden comprender cualquier característica óptica adecuada. En realizaciones, las características ópticas 802 pueden comprender microlentes, o rejillas de difracción,

o lentes de Fresnel, o convexidades, o concavidades, u otras formas y características que pueden refractar, difractar o alterar de otro modo la luz, o combinaciones de las mismas. En realizaciones, tales características ópticas 802 pueden comprender un material diferente al del soporte de base 620, y pueden tener un índice de refracción diferente al soporte de base 620. Por ejemplo, la luz afectada por las características ópticas 802 puede dirigirse hacia una zona de análisis 608, ya sea directamente, o indirectamente a través de la reflexión (p. ej., reflexión interna) adecuada para su uso en los métodos descritos en la presente memoria, p. ej., para proporcionar tanto epi-iluminación como trans-iluminación de una muestra en una zona de análisis 608.

Como se ilustra en la realización que se muestra en la Figura 8C, tales realizaciones también pueden incluir una trayectoria de luz que evite las características ópticas 802. Tal trayectoria de luz se puede adaptar mejor para la obtención de imágenes de una muestra dentro de una zona de análisis 608 que las trayectorias que se requerirían para la obtención de imágenes a través de una característica óptica 802. En realizaciones, se pueden proporcionar ambos tipos de trayectorias de luz (es decir, evitando las características ópticas 802 y pasando a través de las características ópticas 802) al mismo tiempo, proporcionando de ese modo una óptica adecuada para el análisis de imágenes de una muestra iluminada tanto por epi-iluminación como por trans-iluminación a partir de una fuente de luz situada al mismo lado de una cubeta 600 como fuente de luz 650.

La cubeta 600 incluye características que afectan a la trayectoria de la luz que ilumina la cubeta y la muestra dentro de la cubeta. Tal trans-iluminación puede efectuarse por la luz reflejada dentro de una cubeta 600 (p. ej., por reflexión interna, incluyendo o principalmente por reflexión interna parcial (PIR) o reflexión interna total (TIR) desde, p. ej., una superficie 612, una superficie 604 u otras superficies o combinaciones de superficies. Otros ejemplos de trayectorias de luz que se someten a TIR se muestran, por ejemplo, en las Figuras 8A, 8B y 8D.

Como se ilustra en la Figura 8D, en realizaciones de la presente invención, una cubeta 600 de un sistema óptico de un dispositivo o sistema como se describe en la presente memoria, y adecuada para su uso en los métodos descritos en la presente memoria, puede incluir características que afectan a la trayectoria de la luz que ilumina partes internas de la cubeta 600, tal como la luz que ilumina una zona de análisis 608, y la muestra dentro de una zona de análisis 608 de una cubeta 600. Como se muestra en la Figura 8D, una capa 800 puede incluir características que refractan, difractan, o afectan o alteran de otro modo la trayectoria de la luz que entra en una zona de análisis 608. Tal alteración de las trayectorias de luz puede afectar, y puede mejorar, la iluminación de la muestra dentro de una zona de análisis 608. En el ejemplo que se muestra en la Figura 8D, la luz entra en la capa 800 desde una dirección transversal; las trayectorias de luz se alteran por la forma (y propiedades del material) de la capa 800, y se dirigen según lo deseado a la zona de análisis 608. Por ejemplo, una superficie externa de una capa 800 puede ser plana (p. ej., superficie externa 674) o puede estar curvada (p. ej., superficie externa 676). Por ejemplo, una superficie interna de una capa 800 puede ser plana (no se muestra en la Fig. 8D; véanse, sin embargo, tales superficies en las Fig. 8A y 8B (aunque las capas 800 en las Figuras 8A y 8B no son ópticamente transmisoras, estas superficies se muestran como planos) o puede ser curvada (p. ej., la superficie interna 678 mostrada en la Fig. 8D). En realizaciones, tal alteración de las trayectorias de luz es eficaz para proporcionar tanto epi-iluminación como trans-iluminación de muestras en una zona de análisis 608.

Las Figuras 8A, 8B, 8C y 8D ilustran trayectorias de luz dentro de un portamuestras que proporcionan ejemplos de TIR y PIR dentro de una porción de cubierta 612 en una superficie superior 614 y/o en la superficie 618 en una estructura de soporte 604. Un portamuestras, tal como una cubeta 600, puede tener una superficie ópticamente transmisora a través de la cual puede pasar la luz; en realizaciones, tal superficie ópticamente transmisora puede permitir que la luz pase sin una distorsión o disminución significativa en la intensidad de la luz. Un portamuestras, tal como una cubeta 600, puede estar fabricado de material ópticamente transmisor, eficaz para que la luz pueda pasar dentro del portamuestras. En realizaciones en las que un portamuestras está fabricado al menos parcialmente de material ópticamente transmisor, la luz puede pasar a través de una superficie ópticamente transmisora de un portamuestras, y se puede desplazar dentro del portamuestras. En realizaciones, la luz que se desplaza dentro de un portamuestras puede reflejarse en una o más superficies y desplazarse a lo largo de una trayectoria de reflexión dentro de un portamuestras. Cuando la luz de una fuente de luz dispuesta fuera de un portamuestras ingresa a un portamuestras a través de una superficie ópticamente transmisora de un portamuestras, tal luz puede desplazarse dentro del portamuestras lejos de la fuente de luz y puede reflejarse en una superficie del portamuestras, de modo que la luz reflejada pueda desplazarse en una dirección hacia la fuente de luz después de ser reflejada. Tales reflexiones pueden ser por PIR o TIR.

Es decir, la luz que pasa dentro de una cubeta 600 se puede reflejar sobre una superficie (p. ej., una superficie 614 o una superficie 618). Tales reflexiones internas pueden ser eficaces para iluminar una muestra dentro de una zona de análisis 608 con luz indirecta; combinada con iluminación directa (donde la luz no se refleja antes de alterar una muestra), la muestra puede recibir de este modo epi-iluminación (iluminación desde el mismo lado que los elementos de detección óptica) y trans-iluminación (iluminación desde el lado opuesto a los elementos de detección óptica).

Se entenderá que las longitudes de onda de la luz, el material, las superficies y las configuraciones que promueven o mejoran la PIR pueden no ser adecuados o eficaces para promover o mejorar la TIR. Se entenderá que las longitudes de onda de la luz, el material, las superficies y las configuraciones que promueven o mejoran la TIR pueden no ser adecuados o eficaces para promover o mejorar la PIR. Por lo tanto, existen diseños y construcciones en los que se pueden promover una u otra de PIR y TIR, en ausencia de la otra. En realizaciones, existen diseños y construcciones en los que se pueden promover tanto PIR como TIR. En realizaciones, existen diseños y

construcciones en los que no se promueven ni PIR ni TIR.

Como se ilustra en la Figura 8A, las estructuras de soporte 604 pueden tener secciones transversales rectangulares o cuadradas. Se entenderá que una estructura de soporte 604 puede tener una forma de sección transversal distinta de cuadrada o rectangular; por ejemplo, como se muestra en la Figura 8B, una estructura de soporte 604 puede tener una forma de sección transversal triangular; otras formas de sección transversal (p. ej., redondeadas o semicirculares, o dentadas o irregulares) también pueden ser adecuadas para su uso con sistemas y cubetas descritos en la presente memoria. La PIR y la TIR son características ajustables que se pueden seleccionar en función del material utilizado para la cubeta 600, cualquier recubrimiento, revestimiento o cobertura aplicados, y la geometría y/o espesor de la zona de espesor controlado 613 de la cubeta 600. En realizaciones, se puede preferir PIR, y se pueden seleccionar la luz, los materiales y las configuraciones para mejorar la PIR.

En realizaciones, se puede preferir la TIR. En realizaciones, se pueden seleccionar la longitud de onda o longitudes de onda de la luz de una fuente de luz 650 para mejorar la TIR. En realizaciones, se pueden seleccionar el material, el espesor, la configuración de la superficie y otras características de una cubeta 600 para mejorar la TIR. Por ejemplo, la altura (medida desde la base de la porción de cubierta 612 en contacto con la capa 800) de la zona de espesor controlado 613 afectará al ángulo y la intensidad de la luz reflejada por TIR que llega la zona de análisis 608. Es deseable la configuración de una cubeta 600 para permitir la TIR de luz dentro de la cubeta que permite la iluminación en ángulo oblicuo de una muestra (iluminación proveniente de la parte superior de la muestra), particularmente para microscopía de campo oscuro. En algunas realizaciones, es deseable maximizar la TIR desde la parte superior de la muestra. Opcionalmente, en algunas realizaciones, se puede configurar una cubeta 600 para proporcionar TIR solo desde superficies sobre las zonas de análisis 608. Opcionalmente, algunas realizaciones se pueden configurar para proporcionar TIR solo desde superficies sobre la zona de espesor controlado 613 (p. ej., en las realizaciones mostradas en las Figuras 8A y 8B, generalmente por encima de la zona de análisis 608). Opcionalmente, en algunas realizaciones, se puede configurar una cubeta 600 para proporcionar TIR de luz desde otras superficies en la cubeta 600; por ejemplo, se puede proporcionar la TIR de la luz de otras superficies en la cubeta 600 para dispersar la luz en ángulos oblicuos, de manera eficaz para que la luz se dirija nuevamente a la zona de análisis 608.

El diseño y los materiales utilizados para construir una cubeta 600 se pueden seleccionar y configurar para proporcionar una TIR de la luz. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las configuraciones que proporcionan TIR, o que proporcionan aumento o potenciación de las cantidades de TIR, incluyen, sin limitación: configuraciones en las que las dimensiones de la zona de espesor controlado 613 son compatibles con, o promueven, TIR; configuraciones en las que el ángulo o los ángulos de una superficie 614 o una superficie 618 (p. ej., con respecto a la luz incidente) son compatibles con, o promueven, TIR; configuraciones en las que la forma, textura o recubrimiento de una superficie 614 o una superficie 618 son compatibles con, o promueven, TIR; configuraciones en las que la diferencia entre el índice de refracción del material que constituye una zona de espesor controlado 613 y el del material o espacio en contacto con una superficie 614 que forma un límite de una zona de espesor controlado 613 es compatible o promueve, TIR; configuraciones en las que la diferencia entre el índice de refracción del material que forma una estructura de soporte 604 y el del material o espacio en contacto con una superficie 618 que forma un límite de una estructura de soporte 604 es compatible con, o promueve, TIR; y otras configuraciones y diseños. Para mejorar la TIR, el primer material, dentro del cual se debe reflejar (internamente) la luz, debe tener un índice más alto que el del segundo material al que pasaría la luz si no se reflejara internamente; dado que este segundo material suele ser aire, con un índice de refracción cercano a 1, esto no suele ser difícil de asegurar. El ángulo de incidencia debe ser mayor que el ángulo crítico para proporcionar la TIR. Por ejemplo, con referencia a las realizaciones mostradas en la Figura 8, los materiales que forman el área de espesor controlado 613 y las estructuras 604 (p. ej., las regiones externas a las superficies 614 y 618) deben tener un índice de refracción mayor que el del aire. En realizaciones en las que se desea TIR dentro de una capa 800, el material de la capa 800 debería tener un índice de refracción más bajo que el de la zona de espesor controlado 613 para garantizar que se produzca la TIR en las paredes ilustradas en la Figura 8A, 8B y 8D. En realizaciones alternativas, el material de una capa 800 puede tener un índice de refracción que sea superior al índice de refracción del material de la zona de espesor controlado 613, lo que creará una TIR en ese límite (entre una capa 800 y una zona de espesor controlado 613) eficaz de manera que los ángulos y los materiales se puedan ajustar para optimizar en componente de trans-iluminación de la luz dirigida a una muestra en una zona de análisis 608.

En realizaciones, una superficie 614 o 618 se puede recubrir o tratar para afectar a, o reducir, la reflectancia (ya sea PIR o TIR) en la superficie. En realizaciones, una superficie 614 o 618 se puede recubrir o tratar para reducir la pérdida de luz fuera de la superficie. Por ejemplo, incluso cuando una superficie 614 o 618 es compatible con, o mejora la cantidad de TIR, también se puede transmitir o refractar un poco de luz fuera de la superficie 614 o 618. Se puede colocar o aplicar un recubrimiento o material absorbente de luz a tal superficie 614 o 618, o a una porción o porciones de la misma, para reducir la cantidad de luz lateral que se pierde de una cubeta 600. Tal recubrimiento absorbente de luz puede ser, por ejemplo, un colorante, una tinta, una pintura, un tratamiento de superficie, una cinta de color negro o de otro color, u otro recubrimiento o tratamiento de superficie. En realizaciones, se puede colocar un material sólido de color negro u otro material sólido absorbente de luz opuesto o adyacente a una superficie 614 o 618 para proporcionar una superficie ópticamente absorbente.

Opcionalmente, en algunas realizaciones, una cubeta 600 puede configurarse para no proporcionar TIR de luz (o

para proporcionar solamente cantidades insignificantes de TIR), o para no proporcionar PIR (o solo cantidades insignificantes de PIR), de una porción, o porciones, de la cubeta. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una cubeta 600 se puede configurar para no proporcionar TIR o PIR de luz (o proporcionar solo cantidades insignificantes de TIR o PIR) desde las estructuras de soporte 604. Opcionalmente, en algunas realizaciones, una cubeta 600 puede 5 configurarse para no proporcionar TIR o PIR de luz (o proporcionar solo cantidades insignificantes de TIR o PIR) desde una superficie 618. Las configuraciones que no proporcionan TIR o PIR, o que proporcionan solo cantidades insignificantes de TIR o PIR, incluyen, sin limitación: configuraciones en las que las dimensiones de la zona de espesor controlado 613 son incompatibles con, o no promueven, TIR o PIR; configuraciones en las que el ángulo o los ángulos de una superficie 614 o una superficie 618 (p. ej., con respecto a la luz incidente) son incompatibles con, 10 o no promueven, TIR o PIR; configuraciones en las que la forma, textura o recubrimiento de una superficie 614 o una superficie 618 son incompatibles con, o no promueven, TIR o PIR; configuraciones en las que la diferencia entre el índice de refracción del material que constituye una zona de espesor controlado 613 y el del material o espacio en contacto con una superficie 614 que forma un límite de una zona de espesor controlado 613 es incompatible con, o no promueve, TIR o PIR; configuraciones en las que la diferencia entre el índice de refracción del material que forma 15 una estructura de soporte 604 y el del material o espacio en contacto con una superficie 618 que forma un límite de una estructura de soporte 604 es incompatible con, o no promueve, TIR o PIR; y otras configuraciones y diseños.

Opcionalmente, en algunas realizaciones, un material reflectante puede colocarse en, o unirse a, una superficie 614 y/o una superficie 618. Tal material reflectante puede ser, por ejemplo, un metal tal como plata u oro, o aluminio; puede ser un material dieléctrico, como el fluoruro de magnesio o calcio, u otra sal u óxido metálico; u otro material reflectante. Típicamente, tal recubrimiento reflectante puede ser muy delgado (p. ej., puede tener menos de aproximadamente 0,1 micras, o puede tener hasta aproximadamente 100 micras de espesor). Opcionalmente, un material reflectante (p. ej., un recubrimiento reflectante) puede colocarse en, o unirse a, solo la superficie 614. Opcionalmente, un material reflectante puede colocarse en, o unirse a, solo la superficie 618. Opcionalmente, la superficie 618 se puede tratar para que sea de color negro de modo que absorba la luz. En otras realizaciones, una superficie 614 se puede tratar para que sea de color negro de modo que absorba la luz. Tales realizaciones pueden seleccionar la anchura de la zona de espesor controlado 613 para que sea más amplia que la zona de análisis 608. Para algunas realizaciones en las que se utiliza iluminación láser, la capa 800 se puede retirar o ser transmisora de luz ya que la iluminación láser está suficientemente enfocada de manera que no se requiera oscurecimiento entre las zonas de análisis 608.

30 A modo de ejemplo y no de limitación, el uso de PIR, TIR, o ambas, también puede permitir que la luz que se desplaza a lo largo de la trayectoria 820 desde zonas adyacentes se dirija a la zona de análisis 608. Como se muestra en las Figuras 8A, 8B, y 8D, la luz que se desplaza a lo largo de la trayectoria 820 es reflejada hacia la zona de análisis 608, y la luz que se desplaza a lo largo de la trayectoria 825 experimenta múltiples reflexiones a medida que se desplaza dentro de la cubeta 600 y finalmente a la zona de análisis 608. Como se muestra, la luz que se desplaza a lo largo de la trayectoria 820 en la Figura 8B experimenta múltiples reflexiones a medida que se desplaza dentro de la cubeta 600 y finalmente al zona de análisis 608. Como se ilustra en la Figura 8B, tales reflexiones pueden ser PIR o pueden ser TIR. Según la terminología tradicional, la iluminación mostrada en la Figura 8A por la luz que se desplaza a lo largo de las trayectorias 820 y 825, y la iluminación mostrada en la Figura 8B por la luz que se desplaza a lo largo de la trayectoria 820, son trans-iluminación. La iluminación mostrada en las Figuras 8A y 8B 35 por la luz que se desplaza a lo largo de las trayectorias 830 muestra luz que proviene directamente de la luz anular y no por medio de TIR: esto es epi-iluminación. La combinación de ambos tipos de componentes de luz de una fuente de luz ubicada debajo de la muestra (o solo a un lado de la muestra) permite un mejor rendimiento en comparación con las fuentes que solo pueden proporcionar uno de esos componentes de iluminación. Esto es particularmente útil 40 para microscopía de campo oscuro.

45 Un ejemplo no limitante del uso de las realizaciones de la presente invención mostradas en las Figuras 8A-8D es la iluminación de campo oscuro para medir las propiedades de dispersión de las células en la muestra. La microscopía de campo oscuro es un método establecido que se ha utilizado principalmente como una técnica para mejorar el contraste. En la microscopía de campo oscuro, el fondo de la imagen es completamente oscuro, ya que solo se obtienen imágenes de la luz dispersada o reflejada por la muestra. La microscopía de campo oscuro cuantitativa 50 no se ha utilizado para medir las propiedades de dispersión de las células de una manera comparable al uso del parámetro tradicional de "dispersión lateral" en los citómetros de flujo.

Desde la perspectiva del equipo, se desea que la iluminación para la microscopía de campo oscuro sea oblicua, es decir, ningún rayo de luz proveniente de la fuente de luz de iluminación debería poder ingresar al objetivo sin contactar primero con la muestra. A modo de ejemplo y no de limitación, la iluminación debe estar en una longitud de onda que no excite ningún otro fluoróforo ya presente en la muestra. Opcionalmente, esta iluminación permite el uso 55 de lentes de apertura numérica (AN) alta para obtener imágenes. A modo de ejemplo y no de limitación, para tamaños de lentes tradicionales asociados con microscopios ópticos, la AN puede ser de al menos aproximadamente 0,3. Opcionalmente, la AN es de al menos 0,4. Opcionalmente, la AN es de al menos 0,5. Opcionalmente, algunas realizaciones pueden utilizar lentes de objetivo de inmersión en aceite para obtener una AN 60 deseada, particularmente cuando el tamaño de la lente está limitado por debajo de un cierto nivel.

Los métodos tradicionales para la iluminación de campo oscuro han utilizado la trans-iluminación, donde la muestra se encuentra entre la lente de obtención de imágenes y la fuente de luz del campo oscuro. Por lo tanto, en esta

disposición tradicional, los componentes de detección e iluminación no están en el mismo lado de la muestra. Los métodos tradicionales de epi-iluminación (donde la lente/objetivo de obtención de imágenes y la fuente de luz se encuentran en el mismo lado de la muestra) requieren el uso de objetivos fabricados especialmente y, por lo general, no permiten el uso de objetivos de alta AN, lo que limita las capacidades de todo el sistema.

- 5 En contraste, al menos algunas realizaciones de los sistemas de iluminación de campo oscuro descritos en la presente memoria tienen los siguientes atributos. En términos de equipo, el esquema de las realizaciones de las Figuras 8A - 8D es "epi" en el sentido de que la luz anular utilizada para iluminación de campo oscuro está en el mismo lado de la muestra que el objetivo. Esto puede ser deseable desde la perspectiva del sistema, aunque se pueden utilizar realizaciones alternativas con fuentes de luz en el otro lado, solas o combinadas con las realizaciones descritas en la presente memoria. En un ejemplo no limitante, la luz anular está diseñada de tal manera que los LED 10 y/o los láseres de la fuente de luz 654 están todos en el mismo plano y tienen la misma orientación (fuentes de luz en el mismo plano horizontal y dirigiendo la luz hacia arriba). Algunas realizaciones pueden tener luz en el plano de la muestra, pero dirigir la luz de una manera no paralela, tal como, pero sin limitarse a, una forma similar a un cono. Algunas realizaciones pueden tener luz en diferentes planos pero dirigir la luz en la misma orientación. Algunas 15 realizaciones pueden tener luz en diferentes planos pero dirigir la luz de una manera no paralela, tal como, pero sin limitarse a, una forma similar a un cono. En algunas realizaciones, la luz es reflejada por un espejo toroidal 652 para lograr la iluminación oblicua de la muestra.

Además de las propiedades ópticas de la luz anular y el reflector toroidal, las propiedades ópticas de la cubeta 600 mostradas en las realizaciones de las Figuras 8A-8D también afectan significativamente a la iluminación de campo oscuro. En esta realización, la cubeta de citometría 600 está diseñada de tal manera que la luz que proviene de la 20 luz anular 650 cae directamente sobre la muestra; pero además de esto, la luz también se "refleja" sobre la muestra desde características de la cubeta para emular la iluminación "trans". Esta reflexión puede ser a través de TIR y/o reflexión verdadera.

Obsérvese que cualquier esquema de trans-iluminación permite medir la luz dispersada frontal desde una muestra, 25 mientras que un esquema epi permite medir solo la luz retrodispersada desde la muestra. La luz de dispersión frontal es generalmente dos órdenes de magnitud mayor en intensidad que la luz retrodispersada. Por lo tanto, el uso de la trans-iluminación permite el uso de intensidades de iluminación mucho más bajas y reduce los efectos secundarios dañinos en la muestra.

Como se observa en la realización de la presente invención de la Figura 8A, la luz anular 650 (u otra fuente de 30 iluminación) y la cubeta 600 proporcionan un sistema que se puede sintonizar de tal manera que las intensidades de la trans- y la epi-iluminación se ajustan para mejorar el rendimiento en comparación con la epi-iluminación tradicional. De modo similar, la luz anular 650 (u otra fuente de iluminación) y la cubeta 600 proporcionan un sistema en la realización de la Figura 8B que se puede sintonizar de tal manera que las intensidades de la trans- y la epi-iluminación se ajusten para mejorar el rendimiento en comparación con la epi-iluminación tradicional. Esta 35 sintonización se puede lograr en virtud de los materiales elegidos (p. ej., por sus propiedades ópticas) y el diseño de la geometría de la cubeta para controlar los ángulos y la extensión de la reflexión interna total.

Como se muestra en la Figura 8C, las características 802 pueden alterar la trayectoria de la luz incidente y, por lo tanto, utilizarse para realizar tanto la trans-iluminación como la epi-iluminación. Como se muestra en la Figura 8D, la forma y configuración de las superficies 674, 676 y 678 pueden alterar la trayectoria de la luz incidente (p. ej., iluminación transversal) y, por lo tanto, utilizarse para proporcionar o mejorar la trans-iluminación, la epi-iluminación 40 o ambas.

La Figura 8E proporciona una representación esquemática del transporte de una cubeta 600 desde una localización de preparación de la muestra a una localización de observación de la muestra cerca de un detector óptico D. Como 45 se indica en la figura, un portamuestras 600 se puede mover de una localización a una localización adyacente a, o sobre, un detector D. Un detector D puede incluir una plataforma configurada para recibir, mantener y colocar una cubeta 600. La muestra se puede añadir al portamuestras a través de los puertos de entrada 602 (p. ej., se muestran seis puertos de entrada 602 en el ejemplo que se muestra en la Figura 8E), y a continuación puede estar en una posición para observación óptica y medición dentro de una zona de análisis 608 (no mostrada, como interior a las superficies (p. ej., de una estructura de soporte 604) de la cubeta 600 que se muestra en la Figura 8E. La muestra 50 que se mantiene dentro de una zona de análisis 608 puede iluminarse y puede ser detectada por un detector D. En realizaciones, un detector D se puede configurar para realizar observaciones o imágenes cualitativas, y en realizaciones, un detector D se puede configurar para realizar observaciones o imágenes cuantitativas.

Un detector D como se muestra en la Figura 8E puede comprender, o formar parte de, una unidad de citometría o un 55 módulo de citometría. Tal unidad de citometría o módulo de citometría puede comprender una unidad o módulo independientes para análisis de muestras. En realizaciones, se pueden incluir otras capacidades y dispositivos de análisis en un detector D, o se pueden alojar junto con, o se pueden configurar para su uso junto con un detector D. En realizaciones, los sistemas para análisis de muestras como se describe en la presente memoria pueden comprender tal unidad de citometría o módulo de citometría, p. ej., que comprenden un detector D utilizado para analizar una muestra en una cubeta 600. En realizaciones, los sistemas para el análisis de muestras como se describe en la presente memoria pueden comprender tal unidad de citometría o módulo de citometría y otras 60

- unidades o módulos que proporcionan otras capacidades de análisis y dispositivos además de la de un detector D utilizado para analizar una muestra en una cubeta 600. En tales sistemas, tales otras unidades o módulos pueden alojarse junto con, o se pueden configurar para su uso junto con un detector D. Tales otras capacidades y dispositivos de análisis se pueden aplicar a una muestra; por ejemplo, tales capacidades y dispositivos de análisis se
- 5 pueden utilizar para analizar la muestra o porción de una muestra que está presente en una cubeta 600. En realizaciones, tales capacidades y dispositivos de análisis se pueden utilizar para analizar una porción diferente de la muestra presente en una cubeta 600 (p. ej., una muestra se puede dividir en dos o más alícuotas, donde una alícuota se coloca en una cubeta 600 para el análisis citométrico, y otra o más alícuotas se analizan mediante otros dispositivos alojados en, o cerca, o se manejan junto con una unidad de citometría o un módulo de citometría. Así,
- 10 por ejemplo, independientemente del análisis realizado por tal módulo de citometría, una muestra (o porción de la misma) se puede medir y/o analizar en una unidad de análisis químico, en una unidad de análisis de ácido nucleico o en una unidad de análisis de proteínas (p. ej., una unidad que usa anticuerpos u otras moléculas que se unen específicamente para analizar una muestra) u otra unidad o combinación de unidades y capacidades similares. Tal análisis puede incluir análisis de moléculas pequeñas y elementos presentes en una muestra (p. ej., por una unidad de química general); análisis de moléculas de ácido nucleico presentes en una muestra (p. ej., por una unidad de
- 15 ácido nucleico); análisis para proteínas y/o antígenos reactivos con anticuerpos presentes en una muestra (p. ej., mediante una unidad de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA)); o combinaciones de estos. Además, los sistemas ilustrados en la Figura 8E y comentados en la presente memoria pueden incluir un controlador para controlar y programar operaciones en una o más de las unidades o módulos.
- 20 La Figura 8F proporciona una representación esquemática más detallada adicional del sistema que incluye un mecanismo de transporte para transportar una cubeta desde una localización de preparación de la muestra a una localización de observación de la muestra cerca de un detector óptico D. Un sistema tal como el sistema de la realización mostrada en la Figura 8F puede incluir múltiples módulos de análisis de muestras, que se pueden configurar para funcionar de manera independiente o, en realizaciones, se pueden configurar para trabajar juntos. El sistema que se muestra en la Figura 8F incluye una sola unidad de citometría 707, con un detector D; en realizaciones, las muestras (o porciones de las mismas) analizadas en cualquiera o en todos los módulos de análisis 701, 702, 703, 704, 705 y 706 se pueden transportar al módulo de citometría 707, para la observación y medición por el detector D. Independientemente del análisis realizado por el módulo de citometría 707, una muestra (o porción de la misma) se puede medir y/o analizar en una unidad de análisis químico 715. Tal análisis en una unidad de análisis químico 715 puede incluir análisis de moléculas pequeñas y elementos presentes en una muestra (p. ej., mediante una unidad de química general); análisis de moléculas de ácido nucleico presentes en una muestra (p. ej., por una unidad de ácido nucleico); análisis de proteínas y/o antígenos reactivos con anticuerpos presentes en una muestra (p. ej., mediante una unidad de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)); o combinaciones de estos.
- 25 Los sistemas ilustrados en la Figura 8F pueden incluir un controlador para controlar y programar operaciones en uno o más de los módulos 701-707. Las muestras se pueden cargar en portamuestras u otros elementos para su análisis en sistemas como se ilustra en el ejemplo que se muestra en la Figura 8E. Tales sistemas, y los módulos de tales sistemas, incluyen, p. ej., sistemas de manejo de muestras 708; pipetas para obtener, mover y tomar alícuotas de muestras, incluyendo pipetas de succión 711 y pipetas de desplazamiento positivo 712; centrifugadoras 713; espectrofotómetros 714; unidades de análisis químico 715; tubos fotomultiplicadores (PMT) 716; cartuchos 717 para contener suministros y herramientas desechables, tal como p. ej., puntas de pipeta y otras puntas; y otros elementos. Los módulos y otros elementos pueden ser soportados por un bastidor 709 u otra estructura de soporte. Las muestras, productos desechables, herramientas, y otros elementos se pueden transportar dentro de un módulo, y se pueden transportar entre módulos (p. ej., entre un módulo 701-706 y un módulo de citometría 707).
- 30 Los sistemas ilustrados en la Figura 8F muestran que el portamuestras, tal como la cubeta 600, se puede transportar desde una localización (tal como el lugar de preparación de la muestra) y a continuación a otra localización (tal como al detector D como se observa en las Figuras 8E y 8F). La cubeta 600 no libera fluidos en o sobre el detector D, sino que es una unidad autónoma que guarda toda la muestra en su interior. Puede haber una o más, dos o más, o tres o más localizaciones en o cerca del detector D en las que hay una superficie transparente en la que la cubeta 600 u otro portamuestras pueden acoplarse para proporcionar una interfase transparente para que se produzca la detección de la señal de la muestra. Los elementos de la Figura 8F y la descripción adicional referente a tales elementos y sus usos se pueden encontrar en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con el Núm. de Serie 13/769.779.
- 35 Los sistemas ilustrados en la Figura 8F pueden incluir un controlador para controlar y programar operaciones en uno o más de los módulos 701-707. Las muestras se pueden cargar en portamuestras u otros elementos para su análisis en sistemas como se ilustra en el ejemplo que se muestra en la Figura 8E. Tales sistemas, y los módulos de tales sistemas, incluyen, p. ej., sistemas de manejo de muestras 708; pipetas para obtener, mover y tomar alícuotas de muestras, incluyendo pipetas de succión 711 y pipetas de desplazamiento positivo 712; centrifugadoras 713; espectrofotómetros 714; unidades de análisis químico 715; tubos fotomultiplicadores (PMT) 716; cartuchos 717 para contener suministros y herramientas desechables, tal como p. ej., puntas de pipeta y otras puntas; y otros elementos. Los módulos y otros elementos pueden ser soportados por un bastidor 709 u otra estructura de soporte. Las muestras, productos desechables, herramientas, y otros elementos se pueden transportar dentro de un módulo, y se pueden transportar entre módulos (p. ej., entre un módulo 701-706 y un módulo de citometría 707).
- 40 Los sistemas ilustrados en la Figura 8F muestran que el portamuestras, tal como la cubeta 600, se puede transportar desde una localización (tal como el lugar de preparación de la muestra) y a continuación a otra localización (tal como al detector D como se observa en las Figuras 8E y 8F). La cubeta 600 no libera fluidos en o sobre el detector D, sino que es una unidad autónoma que guarda toda la muestra en su interior. Puede haber una o más, dos o más, o tres o más localizaciones en o cerca del detector D en las que hay una superficie transparente en la que la cubeta 600 u otro portamuestras pueden acoplarse para proporcionar una interfase transparente para que se produzca la detección de la señal de la muestra. Los elementos de la Figura 8F y la descripción adicional referente a tales elementos y sus usos se pueden encontrar en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con el Núm. de Serie 13/769.779.
- 45 Los sistemas ilustrados en la Figura 8F muestran que el portamuestras, tal como la cubeta 600, se puede transportar desde una localización (tal como el lugar de preparación de la muestra) y a continuación a otra localización (tal como al detector D como se observa en las Figuras 8E y 8F). La cubeta 600 no libera fluidos en o sobre el detector D, sino que es una unidad autónoma que guarda toda la muestra en su interior. Puede haber una o más, dos o más, o tres o más localizaciones en o cerca del detector D en las que hay una superficie transparente en la que la cubeta 600 u otro portamuestras pueden acoplarse para proporcionar una interfase transparente para que se produzca la detección de la señal de la muestra. Los elementos de la Figura 8F y la descripción adicional referente a tales elementos y sus usos se pueden encontrar en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con el Núm. de Serie 13/769.779.
- 50 Los sistemas ilustrados en la Figura 8F muestran que el portamuestras, tal como la cubeta 600, se puede transportar desde una localización (tal como el lugar de preparación de la muestra) y a continuación a otra localización (tal como al detector D como se observa en las Figuras 8E y 8F). La cubeta 600 no libera fluidos en o sobre el detector D, sino que es una unidad autónoma que guarda toda la muestra en su interior. Puede haber una o más, dos o más, o tres o más localizaciones en o cerca del detector D en las que hay una superficie transparente en la que la cubeta 600 u otro portamuestras pueden acoplarse para proporcionar una interfase transparente para que se produzca la detección de la señal de la muestra. Los elementos de la Figura 8F y la descripción adicional referente a tales elementos y sus usos se pueden encontrar en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con el Núm. de Serie 13/769.779.
- 55 Los sistemas ilustrados en la Figura 8F muestran que el portamuestras, tal como la cubeta 600, se puede transportar desde una localización (tal como el lugar de preparación de la muestra) y a continuación a otra localización (tal como al detector D como se observa en las Figuras 8E y 8F). La cubeta 600 no libera fluidos en o sobre el detector D, sino que es una unidad autónoma que guarda toda la muestra en su interior. Puede haber una o más, dos o más, o tres o más localizaciones en o cerca del detector D en las que hay una superficie transparente en la que la cubeta 600 u otro portamuestras pueden acoplarse para proporcionar una interfase transparente para que se produzca la detección de la señal de la muestra. Los elementos de la Figura 8F y la descripción adicional referente a tales elementos y sus usos se pueden encontrar en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con el Núm. de Serie 13/769.779.
- 60 Los sistemas ilustrados en la Figura 8F muestran que el portamuestras, tal como la cubeta 600, se puede transportar desde una localización (tal como el lugar de preparación de la muestra) y a continuación a otra localización (tal como al detector D como se observa en las Figuras 8E y 8F). La cubeta 600 no libera fluidos en o sobre el detector D, sino que es una unidad autónoma que guarda toda la muestra en su interior. Puede haber una o más, dos o más, o tres o más localizaciones en o cerca del detector D en las que hay una superficie transparente en la que la cubeta 600 u otro portamuestras pueden acoplarse para proporcionar una interfase transparente para que se produzca la detección de la señal de la muestra. Los elementos de la Figura 8F y la descripción adicional referente a tales elementos y sus usos se pueden encontrar en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con el Núm. de Serie 13/769.779.

Campo oscuro

- Al menos algunas realizaciones en la presente memoria incluyen una fuente de iluminación de campo oscuro y una cubeta. Las características relevantes de la cubeta 600 se refieren al diseño de las dimensiones de la cubeta y los materiales ópticos y la geometría de la cubeta. La cubeta aumenta la extensión de la iluminación del campo oscuro a través de la reflexión (p. ej., a través de TIR, PIR o ambas). En una realización, el sistema puede utilizar simultáneamente la iluminación de campo oscuro trans y de campo oscuro epi de una muestra.
- En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, la cubeta 600 combinada con la fuente de luz 650 permite la iluminación trans y epi utilizando un sistema físico en la configuración epi (es decir, con la fuente de luz y el objetivo en el mismo lado de la muestra). La cubeta básica está diseñada para contener la muestra biológica y

presentarla para su visualización. En realizaciones, la porción de cubierta 612 puede tener un diseño específico. Se sabe que diferentes materiales pueden tener diferentes índices de refracción; el material que tiene un índice de refracción deseado se puede seleccionar para su uso en la fabricación de una porción de cubierta 612, o un soporte de base 620, u otros elementos y componentes de una cubeta 600 y elementos y componentes asociados. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una porción de cubierta 612 o un soporte de base 620 pueden estar fabricados de vidrio. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una porción de cubierta 612 o un soporte de base 620 pueden estar fabricados de cuarzo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una porción de cubierta 612 o un soporte de base 620 pueden estar fabricados un polímero acrílico o claro (p. ej., una cicloolefina, un policarbonato, un poliestireno, un polietileno, un poliuretano, un polícloruro de vinilo) u otro polímero o copolímero u otro material transparente.

10 Se puede diseñar el material de la porción de cubierta superior 612 para facilitar la iluminación y la recolección de imágenes. En realizaciones, para iluminar una muestra, la fuente de luz 650 puede ser una luz anular 650 (es decir, puede ser circular), puede tener una posición de fuentes de luz 654 en un patrón discreto o continuo, y puede utilizar un reflector curvo 652 para dirigir la luz hacia la muestra.

15 En la microscopía de campo oscuro, la muestra se ilumina con rayos oblicuos. En la microscopía de campo oscuro, la luz que ingresa a la óptica del microscopio es luz dispersada por la muestra, lo que permite medir las propiedades de dispersión de las células, partículas y otros objetos y estructuras en la muestra. Si no hay células, partículas, estructuras u otros objetos presentes en la muestra, la imagen del campo oscuro es de color negro.

20 En el presente ejemplo no limitante, el reflector 652 y el LED 654 de la luz anular 650 están diseñados para reflejar la luz de modo que una fracción mínima de luz vuelva directamente al objetivo como fondo no específico. El sistema está diseñado para dirigir la luz mediante TIR a las superficies de las cubetas de regreso a la zona de análisis 608. La luz reflejada desde una superficie, ya sea por TIR u otra reflexión, se dirige así a iluminar una muestra en la zona de análisis 608. Las células, partículas, y las estructuras de la muestra en la zona de análisis 608 reciben luz directamente de la luz anular desde debajo de la célula (es decir, a través de epi-iluminación). Además, como se describe en la presente memoria, la luz que proviene de las superficies superiores (reflejada) también se dirige a la zona de análisis 608 (es decir, a través de la trans-iluminación).

25 De este modo, según los sistemas y métodos descritos en la presente memoria, con la luz anular 650 en la misma posición, la luz se puede dirigir para iluminar la zona de análisis 608 desde dos direcciones (tanto epi-iluminación como trans-iluminación) desde una única fuente de luz anular. En realizaciones, esta iluminación es toda iluminación oblicua. Se pueden controlar las intensidades relativas de los dos componentes de luz mediante el diseño de la cubeta y el material utilizado para la cubeta.

30 Esta iluminación de campo oscuro es diferente de la de campo oscuro convencional. Por ejemplo, en realizaciones descritas en la presente memoria, la iluminación de campo oscuro es proporcionada por la luz reflejada en una superficie de cubeta por TIR. A modo de ejemplo no limitante, en realizaciones, un sistema como se describe en la presente memoria puede utilizar una capa reflectante en la parte posterior de ciertas superficies de la porción de cubierta 612 para reflejar toda la luz. A modo de ejemplo no limitante, en realizaciones, un sistema como se describe en la presente memoria puede utilizar una capa reflectante en la parte posterior de ciertas superficies de una cubeta 600 para reflejar toda la luz. En algunas realizaciones se puede utilizar un fondo completamente o selectivamente reflexivo.

35 40 Por ejemplo, en realizaciones, es deseable dirigir la luz en un ángulo oblicuo, lo que mantiene la iluminación del campo oscuro. En algunas realizaciones, las fuentes de luz 654 pueden dirigir la luz en un ángulo, y por lo tanto pueden no requerir o no utilizar el reflector 652. El reflector 652 puede mejorar la capacidad de fabricación de la fuente de luz 654 ya que todas las luces están en el mismo plano, dirigidas en la misma dirección. Opcionalmente, las fuentes de luz en ángulo 654 también se pueden utilizar en lugar de o combinadas con un reflector.

45 50 Se debe entender que aunque la intensidad de la luz de un componente de iluminación por trans-iluminación puede ser, p. ej., 10 veces más débil que un componente correspondiente de epi-iluminación, la intensidad de la luz dispersada desde las células u otros objetos en la muestra debida a la trans-iluminación puede ser 200 veces más fuerte. Es decir, cuando la dispersión de una cantidad de epi-iluminación se compara con la dispersión de la misma cantidad de trans-iluminación, la intensidad de la luz dispersada debido a la trans-iluminación puede ser 200 veces más fuerte que la luz dispersada por epi-iluminación de las células u otros objetos en la muestra. Por lo tanto, una pequeña cantidad de trans-iluminación puede mejorar significativamente la dispersión de la luz desde las células.

55 Con la epi-iluminación sola, la luz recogida por un objetivo es solo la luz reflejada de una muestra. Sin embargo, la difracción es un componente sustancial de la dispersión y el uso de la trans-iluminación proporciona cierta cantidad de difracción (p. ej., luz difractada por la muestra). Sin embargo, la luz recogida de la epi-iluminación no incluye la luz difractada por la muestra (sin el reflejo de la luz de retorno hacia la fuente de luz después de la difracción). Por lo tanto, cuando se utiliza trans- y epi-iluminación, hay componentes reflectantes, refractivos y difractivos a la luz recogida por un objetivo. Los métodos tradicionales utilizan toda la iluminación de campo oscuro trans, que requiere configurar una gran cantidad de espacio, debido a la colocación de componentes ópticos en ambos lados de la muestra. Por el contrario, los sistemas y métodos que se describen en la presente memoria proporcionan tanto epi-iluminación como trans-iluminación utilizando elementos ópticos configurados para la epi-iluminación solo. Las

realizaciones descritas en la presente memoria pueden obtener el ahorro de espacio de una configuración de epi-iluminación al tiempo que proporcionan los beneficios tanto de la epi- como de la trans-iluminación.

El diseño conjunto del portamuestras y la fuente de luz puede permitir que una configuración de epi-iluminación aumente la cantidad de trans-iluminación de la muestra, y en particular puede proporcionar una trans-iluminación

- 5 uniforme. En algunas realizaciones se pueden utilizar superficies espejadas. Algunas realizaciones utilizan TIR, que se puede ajustar para crear la trans-iluminación deseada, incluyendo la trans-iluminación que es uniforme y en ángulos oblicuos en la zona de análisis 608 para la iluminación de campo oscuro de la muestra. Una cubeta 600 se puede configurar para proporcionar una trans-iluminación de una zona de análisis 608 únicamente desde una fuente de luz en una configuración de epi-iluminación utilizando reflexión, p. ej., utilizando TIR o PIR, o ambas. En un ejemplo no limitante, una porción de cubierta más gruesa 612 permite que la luz que se somete a TIR (o PIR, o ambas) experimente retro-reflexión a la zona diana 608. Adicionalmente, los sistemas y métodos descritos en la presente memoria no solo proporcionan luz que, debido a TIR (o PIR, o ambas), regresa a una zona de análisis 608, sino luz que regresa a una zona de análisis 608 de manera uniforme. Las realizaciones de las Figuras 8A, 8B y 8D tienen ciertas superficies en ciertos ángulos, tienen ciertas superficies de color negras y ciertas superficies reflectantes, de modo que la luz regresa uniformemente a una zona de análisis 608 eficaz para proporcionar una trans-iluminación uniforme de una muestra en una zona de análisis 608. Opcionalmente, se podría colocar una superficie totalmente reflectante en la parte superior (tal como, pero sin limitarse a, una porción de cubierta plana 612 como se muestra en las Figuras 7A y 7B, y opcionalmente sobre zonas seleccionadas de la parte superior) de una zona 613 de las Figuras 8A, 8B y 8C). En contraste, la luz que se desplaza dentro del equipo tradicional puede sufrir cierta reflexión, incluyendo posiblemente cierta TIR (o PIR, o ambas) pero la luz puede no regresar a la zona 608.

A modo de ejemplo no limitante, las realizaciones descritas en la presente memoria se sirven de una plataforma basada en imágenes y en lugar de utilizar un sistema de alto coste y alta complicación que puede tener, por ejemplo, 16 fuentes de luz láser, la presente realización aprovecha un sistema de detección más integrado para poder obtener imágenes e identificar los diferenciales de células y tipos en una muestra.

En un ejemplo no limitante, la combinación de todos estos diferentes tipos de información es útil y eficaz para lograr los objetivos deseados del análisis. Esto puede incluir mediciones cuantitativas y/o mediciones cualitativas vinculadas a mediciones cuantitativas, o imágenes vinculadas a mediciones cuantitativas. Los métodos y sistemas descritos en la presente memoria proporcionan diferentes canales de fluorescencia donde cada canal puede tener uno o más marcadores moleculares específicos elegidos como diana (es decir, información cuantitativa). Los métodos y sistemas descritos en la presente memoria pueden incluir, y se pueden utilizar con, microscopía, las realizaciones en la presente memoria pueden proporcionar la capacidad de observar y medir el fondo en el que se forma la tinción dentro de la célula (p. ej., si se encuentra en el citoplasma, se concentra en la superficie, en el núcleo, o en otro lugar) que puede vincular la imagen y/o información cualitativa que se genera a las mediciones cuantitativas que se generan. De esta manera, está disponible la vinculación de las imágenes originales que crearon los resultados cuantitativos para un análisis adicional si resulta que las mediciones cuantitativas activan las alarmas o satisfacen los umbrales, que sugieren que se desea un análisis más detallado. Las realizaciones en la presente memoria pueden interrogar las imágenes de fondo y la información que crea la tinción en una célula en una muestra dentro de una zona de análisis 608. Tales imágenes e información permiten determinar si la tinción está o no en la célula, p. ej., en el citoplasma, en el núcleo, en la membrana, u otro orgánulo o localización celular.

En algunas realizaciones de los métodos y sistemas descritos en la presente memoria, se pueden observar y medir combinaciones de las propiedades de dispersión cuantitativa de la célula, la forma de la célula y/o el tamaño de la célula, y utilizarse para identificar y/o caracterizar una muestra. En algunas realizaciones de los métodos y sistemas descritos en la presente memoria, se pueden observar las propiedades físicas, las propiedades ópticas y las propiedades bio/bioquímicas de una muestra o porción de la misma y se pueden medir todas en el mismo dispositivo al mismo tiempo. Todas estas mediciones y observaciones se pueden combinar en un procesador programable u otro sistema de procesamiento para vincular los diversos tipos de información para lograr los objetivos de los ensayos (p. ej., para lograr un objetivo clínico de los ensayos).

Aunque los dispositivos tradicionales pueden ser adecuados para uno u otro tipo de observación o medición, no son adecuados para la epi-iluminación y la trans-iluminación desde una sola fuente de luz; tampoco hay un vínculo entre esos tipos diferentes de información. Por ejemplo, en algunas realizaciones descritas en la presente memoria, donde la información de la imagen que generó las mediciones cuantitativas es recuperable, los sistemas y el método se pueden utilizar para mediciones de morfología del tejido. Opcionalmente, el sistema se puede aplicar a la prueba de Papanicolaou, que es más similar a la citología tradicional. Se puede extender a cualquier cosa que se haga usando microscopía tradicional. En al menos algunas de las presentes realizaciones, en la orina, se pueden observar y analizar cristales y no solo células. Se puede observar en cristales de sales inorgánicas y sustancias químicas de muestras de orina que se habían creado ciertas lecturas cuantitativas en una parte de un gráfico. Además, se pueden observar y analizar las células y partículas presentes en la sangre, incluyendo análisis de diferentes tipos y poblaciones de células sanguíneas, tales como, pero sin limitarse a, los que se pueden observar en la Figura 1A, donde se rodean por un círculo diferentes regiones de datos. La información de la imagen para ciertas regiones de datos se puede recuperar para analizar más a fondo las imágenes de la célula subyacente que crearon las mediciones trazadas en el gráfico o diagrama.

Algunas realizaciones en la presente memoria combinan las características de formación de imágenes con las características de patología. Por ejemplo, la preparación de tejido puede tener lugar dentro de un dispositivo o sistema configurado para incluir los elementos ópticos descritos en la presente memoria (un sistema puede ser, o incluir, por ejemplo, un módulo o múltiples módulos configurados para el análisis óptico y de otro tipo de una muestra), y se pueden obtener imágenes de tal material preparado en esta plataforma. A continuación, la imagen o el análisis se pueden enviar a los servidores para realizar análisis de imágenes, realizar diagnósticos o realizar patologías digitales eficaces para ayudar o permitir que un patólogo analice una muestra.

Las realizaciones de métodos, sistemas y dispositivos que se describen en la presente memoria, que incluyen, p. ej., sistemas y dispositivos ilustrados en las Figuras 8C y 8D, proporcionan una amplia gama de capacidades de citometría que pueden aplicarse juntas para analizar una muestra. Tales capacidades de citometría incluyen la obtención de imágenes citométricas, tales como las que típicamente se limitan a la microscopía; tales imágenes microscópicas y análisis de imágenes de muestras biológicas son proporcionados por los dispositivos, sistemas y métodos descritos en la presente memoria. Además, los sistemas y dispositivos descritos en la presente memoria están configurados para proporcionar análisis espectrofotométrico de muestras biológicas. Tal análisis de imagen incluye campo oscuro, campo claro y otro análisis de imagen. Se describen métodos nuevos y mejorados para aplicar tanto epi-iluminación como trans-iluminación desde una única fuente de luz, lo que permite imágenes y análisis de muestras de sangre más sensibles y precisos. Junto con los métodos descritos en la presente memoria, se pueden obtener mediciones separadas de los GR, GB y subcategorías de estos. El análisis de imagen y espectrofotométrico, como se describe en la presente memoria, se puede utilizar para identificar y cuantificar diferentes poblaciones de GB útiles para la caracterización de una muestra de sangre y para el diagnóstico de muchas afecciones clínicas. Los dispositivos y sistemas que se describen en la presente memoria se pueden utilizar para proporcionar informes clínicos que incluyen información de análisis químico general, información de análisis basada en ácidos nucleicos, información de análisis basada en anticuerpos (o proteínas o epítropos), información de análisis espectrofotométrico y, además, proporcionan imágenes de las células y muestras analizadas. Se cree que la capacidad de producir tal información y proporcionar tales informes, incluyendo imágenes así como otra información clínica, proporciona capacidades y resultados novedosos e inesperados.

Además, esta información, y estos informes, pueden producirse en un corto período de tiempo (p. ej., en menos de una hora, o menos de 50 minutos, o menos de 40 minutos, o menos de 30 minutos, u otro corto plazo de tiempo). Además, esta información, y estos informes, pueden producirse a partir de pequeñas muestras, p. ej., pequeñas muestras de sangre u orina. Tales pequeñas muestras pueden tener tamaños de no más de aproximadamente 500 µL, o menos de aproximadamente 250 µL, o menos de aproximadamente 150 µL, o menos de aproximadamente 100 µL, o menos de aproximadamente 75 µL, o menos de aproximadamente 50 µL, o menos de aproximadamente 40 µL, o menos de aproximadamente 20 µL, o menos de aproximadamente 10 µL, u otro pequeño volumen. En realizaciones en las que una muestra es una muestra de sangre, tal pequeña muestra puede recogerse de la yema de un dedo. Típicamente, solo se extrae una pequeña cantidad de sangre de la yema de un dedo (p. ej., la cantidad de sangre puede ser de aproximadamente 250 µL o menos, o aproximadamente 200 µL o menos, o aproximadamente 150 µL o menos, o aproximadamente 100 µL o menos, o aproximadamente 50 µL o menos, o aproximadamente 25 µL o menos, u otra pequeña cantidad).

Se cree que los informes clínicos que incluyen información e imágenes citométricas, como se describe en la presente memoria (incluyendo imágenes, gráficos de dispersión y otra información óptica y de obtención de imágenes), y que también incluyen información de análisis químico general, información de análisis basada en ácidos nucleicos, información de análisis basada en anticuerpos (o proteínas o epítropos), e información de análisis espectrofotométricos, proporcionan información clínicamente rica y amplia, útil para el diagnóstico y la caracterización de muchas afecciones clínicas, y proporcionan ventajas sobre la técnica. Tales informes se pueden preparar rápidamente en una localización de punto de servicio (o punto de atención), y se pueden comunicar rápidamente (p. ej., electrónicamente por vía inalámbrica, línea terrestre, fibra óptica u otro enlace de comunicación) a un patólogo u otro experto clínico para su análisis e interpretación. Tales análisis e interpretación por el experto pueden a su vez comunicarse rápidamente (p. ej., electrónicamente por vía inalámbrica, línea terrestre, fibra óptica u otro enlace de comunicación) a un médico que cuida al sujeto, o regresar a la localización de punto de servicio (o punto de acceso) o ambos, para un retorno rápido. Tal retorno rápido permite el tratamiento oportuno, si fuera necesario, o previene un tratamiento innecesario, al proporcionar información y análisis basados en muestras que se pueden adquirir, se pueden analizar, o ambos, en una localización de punto de servicio o punto de atención. Tales análisis, informes y retornos rápidos brindan ventajas sobre los métodos que consumen mucho tiempo y, al permitir un tratamiento oportuno y evitar un tratamiento innecesario, pueden proporcionar servicios y tratamientos clínicos más eficaces, más eficientes y menos costosos. Tales métodos que requieren más tiempo y que pueden ser obviados por los dispositivos, sistemas y métodos descritos en la presente memoria incluyen, pero sin limitarse a, los siguientes: retrasos e inconvenientes debidos a que se requiere que un sujeto viaje a un laboratorio o clínica alejados del domicilio del sujeto, y alejado del médico clínico encargado del cuidado del sujeto; retrasos y posible degradación de la muestra debido al transporte de una muestra desde un lugar de recogida a un lugar donde la muestra puede ser analizada; retrasos debidos a la transmisión de los resultados de tal análisis a un patólogo u otro experto; retrasos debidos a la transmisión de la opinión de un experto al médico del sujeto; retrasos en la transmisión del diagnóstico clínico y el tratamiento del sujeto después de la transmisión de una opinión de un experto al médico. Estos retrasos, inconvenientes, y posible degradación de la muestra se pueden reducir o eliminar

mediante el uso de los métodos, dispositivos, y sistemas descritos en la presente memoria.

Las realizaciones de los sistemas y dispositivos que se ilustran en las Figuras 6A, 6B, 7, 8A, 8B, 8C y 8D, y otras figuras y que se describen en la presente memoria, proporcionan capacidades de citometría en un formato compacto, incluso en formatos compactos para uso con una o más capacidades de análisis de muestras distintas.

- 5 Los autores de la presente solicitud describen en la presente memoria nuevos dispositivos y sistemas que incluyen las nuevas capacidades de citometría que se describen en la presente memoria en dispositivos y sistemas junto con otras capacidades de análisis de muestras. Por ejemplo, los autores de la presente solicitud describen en la presente memoria dispositivos y sistemas que proporcionan nuevas capacidades de citometría como se describe en la presente memoria junto con dispositivos y sistemas para análisis de muestras por una unidad de química general; junto con dispositivos y sistemas para el análisis de muestras mediante una unidad de análisis de ácidos nucleicos; junto con los dispositivos y sistemas para el análisis de muestras utilizando una unidad de análisis de anticuerpos (p. ej., ELISA); y combinaciones de estos. Por lo tanto, un dispositivo de procesamiento de muestras como se describe en la presente memoria puede configurarse para realizar una pluralidad de ensayos en una muestra. Tal muestra puede ser una muestra pequeña.
- 10
- 15 En realizaciones, todas las acciones o etapas de ensayo de muestra se realizan sobre una sola muestra. En realizaciones, todas las acciones o etapas de ensayo de muestra se realizan mediante un solo dispositivo o sistema y se pueden realizar dentro de una carcasa de un solo dispositivo. Se cree que tales sistemas y dispositivos que incluyen citometría, particularmente citometría que proporciona análisis de imágenes, así como análisis espectrofotométricos u otros análisis ópticos en una sola unidad, son novedosos e inesperados. Se cree que proporcionar sistemas y dispositivos que incluyen citometría, particularmente citometría que proporciona análisis de imágenes, así como análisis espectrofotométricos u otros análisis ópticos en una sola unidad, proporciona ventajas que anteriormente no estaban disponibles en la técnica.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45

Las realizaciones de los sistemas y dispositivos que se ilustran en las Figuras 6A, 6B, 7, 8A, 8B, 8C y 8D, y otras figuras y que se describen en la presente memoria, proporcionan capacidades de citometría en un formato portátil, donde tales dispositivos y sistemas pueden alojarse en recintos lo suficientemente pequeños para un fácil transporte desde una localización a otra. Por ejemplo, tales dispositivos y sistemas pueden ser fácilmente transportados para su uso en una localización de punto de atención (p. ej., un consultorio médico, una clínica, un hospital, un laboratorio clínico u otra localización). Por ejemplo, tales dispositivos y sistemas pueden ser fácilmente transportados para su uso a una localización de punto de servicio (además de tales puntos de atención mencionados anteriormente, p. ej., una farmacia, un supermercado u otra localización de venta minorista o de servicio). Una localización de punto de servicio puede incluir, p. ej., cualquier localización donde un sujeto pueda recibir un servicio (p. ej., pruebas, seguimiento, tratamiento, diagnóstico, orientación, recogida de muestras, verificación de identidad, servicios médicos, servicios no médicos, etc.). Las localizaciones de punto de servicio incluyen, sin limitación, el domicilio de un sujeto, el negocio de un sujeto, la localización de un profesional de la salud, p. ej. un doctor), hospitales, salas de emergencias, quirófanos, clínicas, despachos de profesionales de la salud, laboratorios, comercios minoristas [p. ej. (p ej., farmacia minorista, farmacia clínica, farmacia de hospital), parafarmacias, supermercados, tiendas, etc.], vehículos de transporte (p. ej. coche, barco, camión, autobús, avión, motocicleta, ambulancia, unidad móvil, coche/camión de bomberos, vehículo de emergencia, vehículo de fuerzas policiales, coche de policía, u otro vehículo configurado para transportar a un sujeto de un punto a otro, etc.), unidades de atención médica itinerantes, unidades móviles, escuelas, centros de día, localizaciones de control de seguridad, localizaciones de combate, residencias tuteladas, oficinas gubernamentales, edificios de oficinas, tiendas de campaña, sitios de adquisición de muestras de fluidos corporales (p. ej., centros de recogida de muestras de sangre), sitios en o cerca de una entrada a una localización a la que un sujeto puede desear acceder, sitios en o cerca de un dispositivo al que tal vez desee acceder un sujeto (p. ej., la localización de un ordenador si el sujeto desea acceder al ordenador), una localización donde un dispositivo de procesamiento de muestras recibe una muestra, o cualquier otra localización de punto de servicio descrita en otro lugar en la presente memoria.

Marcadores de citometría esotérmico y de citometría de especialidad

Muchos análisis citométricos avanzados o esotérmicos tradicionales requieren un sistema tradicional para medir un gran número de marcadores en las células; típicamente, estos marcadores se miden simultáneamente. El enfoque general en el campo se ha vinculado a aparatos de alta capacidad que incluyen, por ejemplo, seis o más láseres y 18 tubos PMT diferentes para medir todos estos marcadores simultáneamente. Sin embargo, en muchos entornos clínicos, no se requieren mediciones simultáneas de marcadores múltiples. En muchos requisitos clínicos, por ejemplo, se está interesado en ver cuántas células son positivas para un marcador, o cuántas son positivas para una combinación de dos o tres marcadores, u otra combinación similar de unos pocos marcadores. Algunas realizaciones en la presente memoria proporcionan combinaciones múltiples de esquemas de tinción en los que se puede tener un conjunto de, p. ej., 10 marcadores, donde se pueden combinar en conjuntos de 3-4 o 5-6 marcadores, donde se pueden combinar de tal manera que incluso si se combinan dos marcadores del mismo color, algunas realizaciones del sistema actual pueden desconvolucionar las imágenes y la información con el fin de determinar qué señal vino de qué marcador. Esto permite que algunas realizaciones del sistema actual reduzcan los requisitos de equipo en términos del número de fuentes de luz, el número de canales utilizados para el análisis de muestras y otras simplificaciones y eficiencias. Por lo tanto, el uso de subconjuntos de varios marcadores, o el uso o la medición de marcadores de manera no simultánea en un emparejamiento predeterminado puede ser útil para

permitir la citometría esotérica. Por ejemplo, algunos marcadores pueden considerarse marcadores de "selección"; tales marcadores se miden primero, y si los resultados de tales mediciones iniciales son negativos (p. ej., los marcadores no están presentes, o están presentes solo en cantidades bajas, en una muestra), pueden no ser necesarias en ese caso, mediciones que utilicen otros marcadores de seguimiento. En realizaciones, tales métodos y sistemas no simultáneos pueden reducir el volumen de muestra requerido para el análisis, y pueden reducir las cantidades de marcadores necesarios para el análisis (p. ej., si un marcador de seguimiento se utiliza típicamente en solo una pequeña fracción de las muestras analizadas).

Debe entenderse que el uso de obtención de imágenes para análisis citométricos de muestras, tales como muestras de sangre u orina, permite obtener un recuento celular real, y por lo tanto puede ser más preciso que los métodos de citometría tradicionales que no incluyen tales mediciones. La obtención de imágenes de muestras, incluyendo la obtención de imágenes de células (y partículas o estructuras) en una muestra, en realidad puede ser más precisa que otros métodos, tales como la citometría de flujo tradicional. Por ejemplo, la selección por citometría de flujo tradicional no permite recuentos reales. La selección en la citometría de flujo es subjetiva y, por lo tanto, esta puede variar de un sistema a otro. Además, la citometría de flujo tradicional no proporciona imágenes de células en una muestra.

Algunas realizaciones en la presente memoria también pueden seleccionar, pero la selección se basa algorítmicamente en diversos factores que incluyen, pero sin limitarse a, la salud del paciente. Los medios de clasificación están entrenados en una población de pacientes que saben si están sanos o enfermos. Algunas realizaciones aquí pueden señalar a un paciente que es anormal y señalarlo para su revisión. La selección por autoaprendizaje puede determinar si se desea una selección diferente en función de la información transmitida sobre la salud del paciente. Por lo tanto, la selección para la muestra para algunas realizaciones descritas en la presente memoria se realiza de forma algorítmica, posiblemente con un procesador programable, y la selección cambia en función de la salud del paciente.

En realizaciones de métodos y sistemas para la obtención de imágenes, se puede desear minimizar la cantidad y complejidad del equipo requerido, y se puede desear reutilizar parte o toda la muestra, si fuera posible, para minimizar el volumen de muestra requerido. Por lo tanto, cuanta más capacidad se pueda extraer de la imagen de una muestra, mejor se maximizará la información obtenida de una muestra y, cuando sea posible, de cantidades más pequeñas de muestra. Por lo tanto, cuanta más información se pueda obtener para diferenciar los diferentes tipos de células de un número mínimo de imágenes, más se puede minimizar el volumen de muestra requerido.

Opcionalmente, en un ejemplo no limitante, la cubeta para uso en la plataforma de microscopio se puede configurar como sigue (con referencia a las realizaciones y elementos mostrados en las Figuras 7, 8A y 8B). Una capa de canal medio comprende un núcleo de membrana delgada de plástico 800 con adhesivo sensible a la presión (psa) en ambos lados. Un lado se adhiere a la capa de la ventana 606 y el otro a la parte de la cubierta de la capa superior moldeada 612. El núcleo es una película extruida de color negro, principalmente debido a razones ópticas para evitar la dispersión de la luz y la interferencia óptica entre los diferentes canales de líquido. El espesor de la membrana del núcleo es preferiblemente uniforme a lo largo de su longitud y anchura, y puede formarse, p. ej., a partir de una película extruida de PET de color negro o HDPE (polietileno) de color negro. Las subcapas de psa en ambos lados son preferiblemente lo más delgadas posible para preservar las dimensiones ajustadas y uniformes del canal de líquido total (p. ej., la zona de análisis 608), pero son preferiblemente lo suficientemente gruesas para proporcionar un buen sello fluido alrededor del canal de líquido. En realizaciones, los adhesivos de psa útiles para tales portamuestras son de naturaleza acrílica y tienen una alta resistencia de adhesión para plásticos de baja energía superficial. Los canales de líquido, los puertos y otras características de alineamiento en la capa media pueden fabricarse utilizando procedimientos de corte por láser o troquelado.

Esta realización también muestra se pueden incorporar a la cubeta que elementos magnéticos tales como, pero sin limitarse a, pastillas o discos magnéticos, o pastillas o discos metálicos que se pueden sujetar con un imán. Por ejemplo, tales elementos magnéticos pueden estar incluidos en, o pueden comprender, la capa superior moldeada de un portamuestras o cubeta. Los elementos magnéticos se pueden utilizar para simplificar el equipo utilizado para transportar la cubeta. Por ejemplo, el sistema de acoplamiento puede activar las características magnéticas en la cubeta para transportarlo sin tener que añadir un dispositivo de manejo de muestras adicional.

Aunque la invención se ha descrito e ilustrado con referencia a ciertas realizaciones particulares de la misma, los expertos en la técnica apreciarán que se pueden realizar diversas adaptaciones, cambios, modificaciones, sustituciones, supresiones o adiciones de procedimientos y protocolos sin apartarse del alcance de la invención. Por ejemplo, se pueden utilizar diferentes materiales para crear diferentes superficies reflectantes en la cubeta u otras superficies a lo largo de una trayectoria de luz en el sistema óptico. Opcionalmente, la superficie reflectante se selecciona de modo que la reflexión solo sea difusora. Opcionalmente, la superficie reflectante se selecciona de modo que la reflexión sea solo especular. En algunas realizaciones se puede utilizar un esquema de iluminación superior plano como establecen Coumans, FAW, van der Pol, E., y Terstappen, LWMM (2012), Flat-top illumination profile in an epifluorescence microscope by dual microlens arrays. Cytometry, 81A: 324-331. doi: 10.1002/cyto.a.22029.

Además, las concentraciones, cantidades y otros datos numéricos se pueden presentar en la presente memoria en

un formato de intervalo. Se debe entender que tal formato de intervalo se utiliza simplemente por conveniencia y brevedad y se debe interpretar de manera flexible para incluir no solo los valores numéricos explícitamente citados como los límites del intervalo, sino también para incluir todos los valores numéricos individuales o sub-intervalos incluidos dentro de ese intervalo como si cada valor numérico y sub-intervalo se citara explícitamente. Por ejemplo, 5 se debe interpretar que un intervalo de tamaño de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 200 nm incluye no solamente los límites citados explícitamente de aproximadamente 1 nm y aproximadamente 200 nm, sino que también incluye tamaños individuales tales como 2 nm, 3 nm, 4 nm, y subintervalos tales como de 10 nm a 50 nm, de 20 nm a 100 nm, y otros intervalos.

10 Las publicaciones comentadas o citadas en la presente memoria se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente memoria debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a ser anterior a tal publicación en virtud de la invención anterior. Adicionalmente, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar confirmación independiente. Todas las publicaciones mencionadas en la 15 presente memoria exponen y describen las estructuras y/o métodos en relación con los cuales se citan las publicaciones. También se hace referencia a las siguientes solicitudes: Patente de Estados Unidos Núm. 7.888.125; Patente de Estados Unidos Núm. 8.007.999; Patente de Estados Unidos Núm. 8.088.593; Patente de Estados Unidos Núm. 8.088.593; Patente de Estados Unidos Núm. 8.380.541; Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. US20120309636; Solicitud PCT Núm. PCT/US2012/057155; Solicitud PCT Núm. PCT/US2011/53188; Solicitud PCT Núm. PCT/US11/53189; Solicitud de Patente de EE.UU. Núm. de Serie 13/769.779; Solicitud de 20 Patente de Estados Unidos Núm. 13/244.946; Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 13/244.947; Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 13/244.949; Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 13/244.950; Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 13/244.951; Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 13/244.952; Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 13/244.953; Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 13/244.954; Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 13/244.956; Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 13/769.798; Solicitud de 25 Patente de Estados Unidos Núm. 13/769.820; Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 61/766.113; Solicitud de Estados Unidos Núm. de serie 61/673.245; Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 61/786.351; Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 61/697.797; y Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 61/733.886.

30 Esta solicitud reivindica prioridad sobre la Solicitud de Patente de Estados Unidos con Número de Serie 61/675.811, presentada el 25 de julio de 2012; la Solicitud de Patente de Estados Unidos con el Número de Serie 61/676.178, presentada el 26 de julio de 2012; Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 61/766.116, presentada el 18 de febrero de 2013; y la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 61/802.194, presentada el 15 de marzo de 2013.

35 Este documento contiene material sujeto a protección de derechos de autor. El propietario de los derechos de autor (el Solicitante en la presente memoria) no tiene ninguna objeción a la reproducción por fax de los documentos y descripciones de patentes, tal como aparecen en el archivo o registro de patentes de la Oficina de Marcas y Patentes de los EE. UU., pero se reserva por otra parte todos los derechos de autor de cualquier tipo. Se aplicará el siguiente aviso: Copyright 2012-2013 Theranos, Inc.

40 Si bien que lo anterior es una descripción completa de la realización preferida de la presente invención, es posible utilizar varias alternativas, modificaciones y equivalentes. Por lo tanto, el alcance de la presente invención debe determinarse no con referencia a la descripción anterior, sino que, en cambio, debe determinarse con referencia a las reivindicaciones adjuntas, junto con su alcance completo de equivalentes. Cualquier característica, ya sea preferida o no, puede combinarse con cualquier otra característica, ya sea preferida o no. No se debe interpretar que las reivindicaciones adjuntas incluyen limitaciones de medios más funciones, a menos que tal limitación se recite explícitamente en una reivindicación dada utilizando la expresión "medios para". Se debe entender que según se utiliza en la descripción en la presente memoria y a lo largo de todas las reivindicaciones que siguen, el significado de "un", "uno", "una, y "el" y "la" incluye la referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Asimismo, según se utiliza en la descripción de la presente memoria y a lo largo de todas las reivindicaciones que siguen, el significado de "en" incluye "en" y "sobre" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Finalmente, según se utiliza en la descripción de la presente memoria y en todas las reivindicaciones que siguen, los significados de "y" y "o" incluyen tanto la conjuntiva como la disyuntiva y se pueden utilizar indistintamente a menos que el contexto indique expresamente lo contrario. Por lo tanto, en contextos en los que se utilizan los términos "y" u "o", el uso de tales conjunciones no excluye un significado de "y/o" a menos que el contexto indique expresamente lo contrario.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema para analizar una muestra, comprendiendo el sistema:

un portamuestras (600) que comprende una cámara para la muestra configurada para contener dicha muestra, comprendiendo al menos una porción de dicho portamuestras un material ópticamente transmisor, comprendiendo

5 dicho material ópticamente transmisor una superficie ópticamente transmisora y una superficie reflectante; y

una fuente de iluminación (654) configurada para proporcionar luz que ilumina y pasa a través de dicha superficie ópticamente transmisora;

un objetivo (670) utilizado para obtener imágenes de la muestra;

10 en donde dicho portamuestras está configurado de manera eficaz para que dicha luz de dicha fuente de iluminación proporcione simultáneamente tanto epi-iluminación como trans-iluminación a una muestra en el portamuestras, donde la epi-iluminación comprende luz que se desplaza desde dicha fuente de iluminación a dicha muestra sin reflexión a una superficie del material ópticamente transmisor del portamuestras, y donde la trans-iluminación comprende luz que se desplaza desde dicha fuente de iluminación y dentro del material ópticamente transmisor y a la muestra después de al menos una reflexión desde al menos una superficie de dicho material ópticamente transmisor;

15 en donde dicho objetivo está configurado para recoger luz de la muestra a partir tanto de epi-iluminación como de trans-iluminación;

en donde dicho objetivo está localizado en el mismo lado del portamuestras que la fuente de iluminación,

20 en donde dicha trans-iluminación es proporcionada al menos en parte por una reflexión interna total de luz a una superficie.

2. El sistema de la reivindicación 1, en donde el portamuestras comprende una cubeta que tiene un canal alargado configurado para contener una muestra.

3. El sistema de la reivindicación 1, en donde el portamuestras comprende una o más superficies ópticamente no transmisoras.

25 4. El sistema de la reivindicación 2, en donde la cubeta tiene una forma seleccionada entre una forma transversal rectangular, horizontal.

5. El sistema de la reivindicación 1, en donde dicho portamuestras es móvil con respecto a dicha fuente de iluminación a una pluralidad de localizaciones, en donde dicha superficie ópticamente transmisora del portamuestras puede ser iluminada por la fuente de iluminación en cada una de dichas localizaciones.

30 6. El sistema de la reivindicación 1, en donde dicha fuente de iluminación comprende una luz anular.

7. El sistema de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una estructura de soporte que comprende una superficie ópticamente transmisora conformada para acoplar una superficie ópticamente transmisora del portamuestras.

35 8. El sistema de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un detector configurado para obtener imágenes de al menos una porción de un canal del portamuestras.

9. El sistema de la reivindicación 8, en donde dicho portamuestras comprende un canal alargado configurado para contener al menos una porción de la muestra, y en donde dicho detector está configurado para obtener imágenes de un canal alargado completo del portamuestras.

40 10. El sistema de la reivindicación 8, en donde el portamuestras está configurado para contener la muestra de una manera sin flujo, estática durante la obtención de las imágenes.

11. El sistema de la reivindicación 8, en donde durante la obtención de las imágenes, el portamuestras está configurado para comprender una porción de la muestra de una manera sin flujo, estática y otra porción de una manera con flujo.

45 12. El sistema de la reivindicación 8, en donde dicho portamuestras comprende adicionalmente un circuito de fluido completamente confinado en el portamuestras, y en donde la muestra está localizada en dicho circuito de fluido, de una manera eficaz para que la muestra permanezca separada de dicho detector.

13. El sistema de la reivindicación 12, en donde dicho portamuestras es móvil con respecto al detector.

14. El sistema de la reivindicación 12, en donde dicho detector es móviles con respecto al portamuestras.

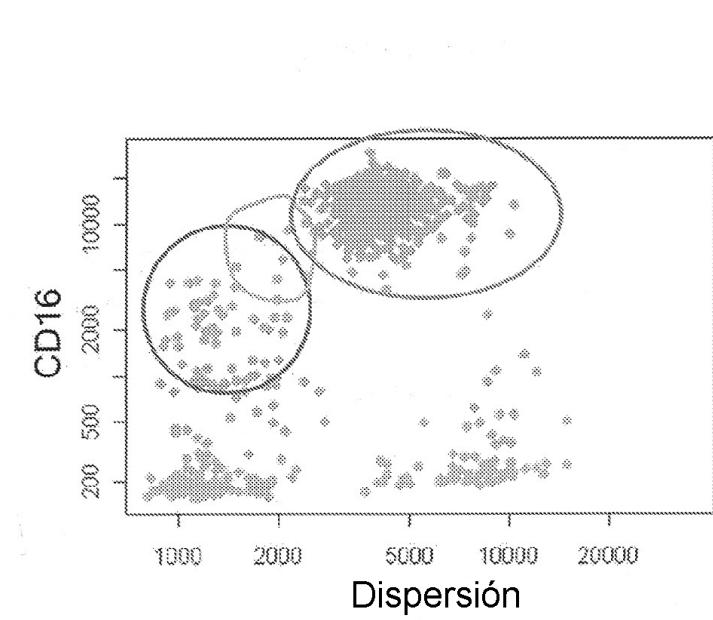


FIG. 1A

Razón del área nuclear/área celular total

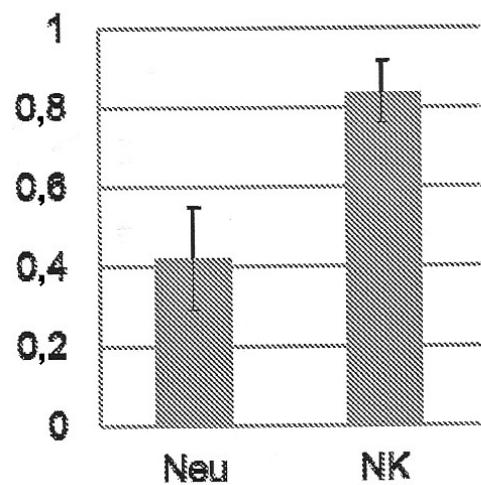


FIG. 1B

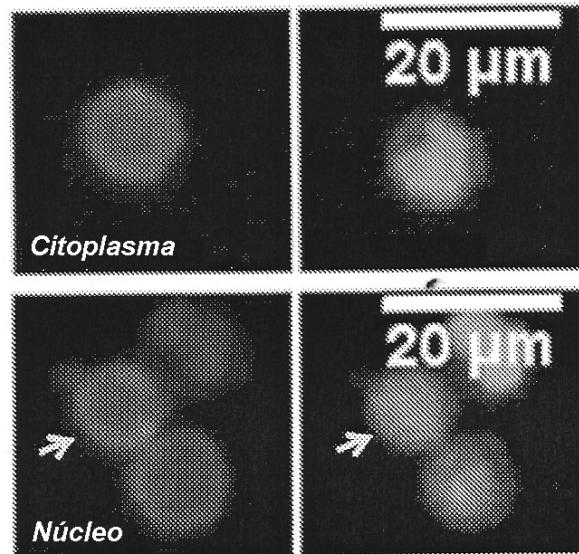


FIG. 1C

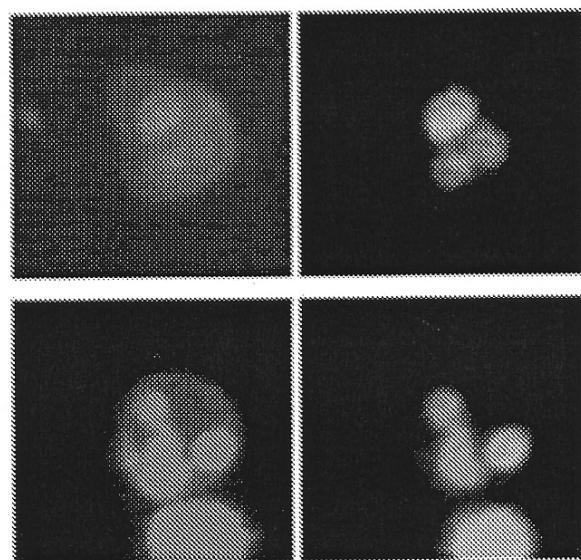


FIG. 1D

ES 2 700 498 T3

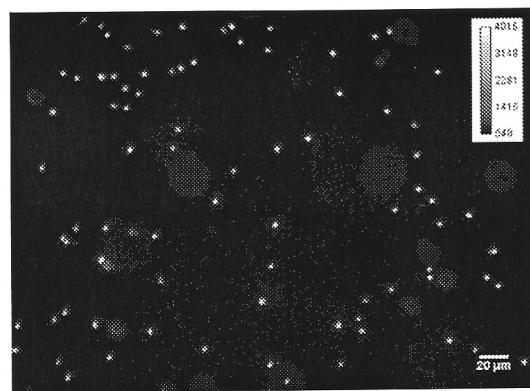


FIG. 2A

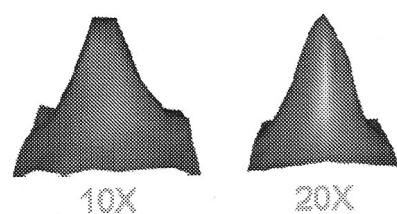


FIG. 2B

ES 2 700 498 T3

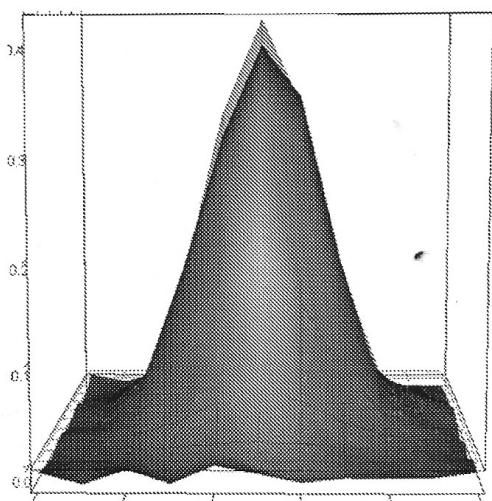


FIG. 2C

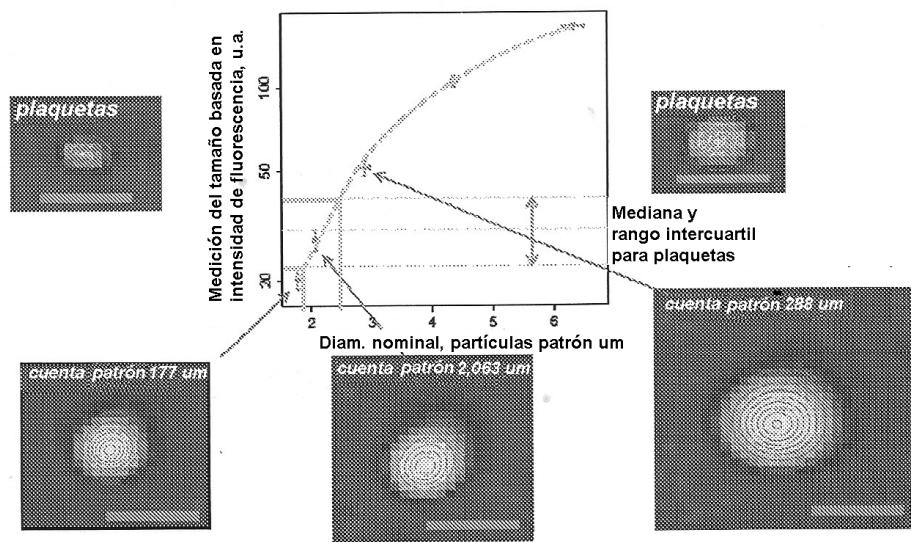


FIG. 3

ES 2 700 498 T3

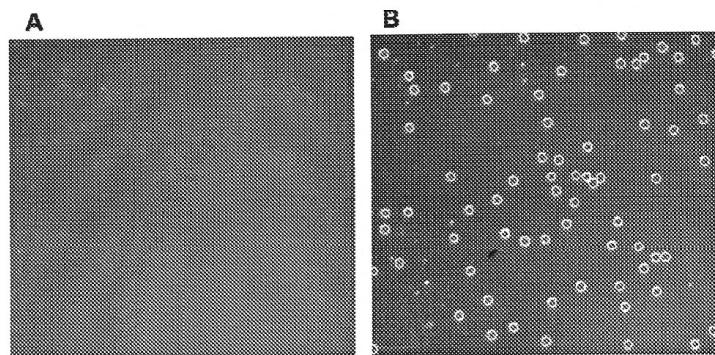


FIG. 4

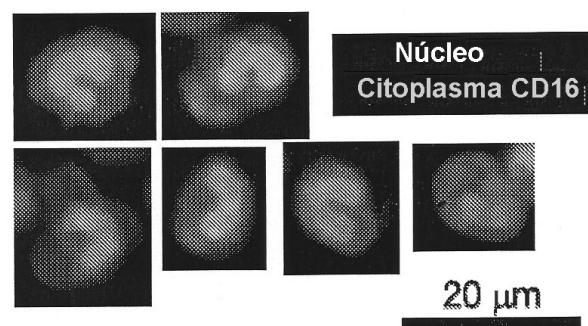


FIG. 5A

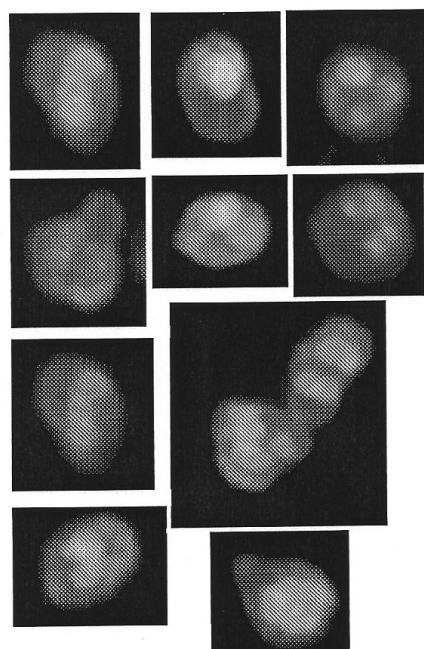


FIG. 5B

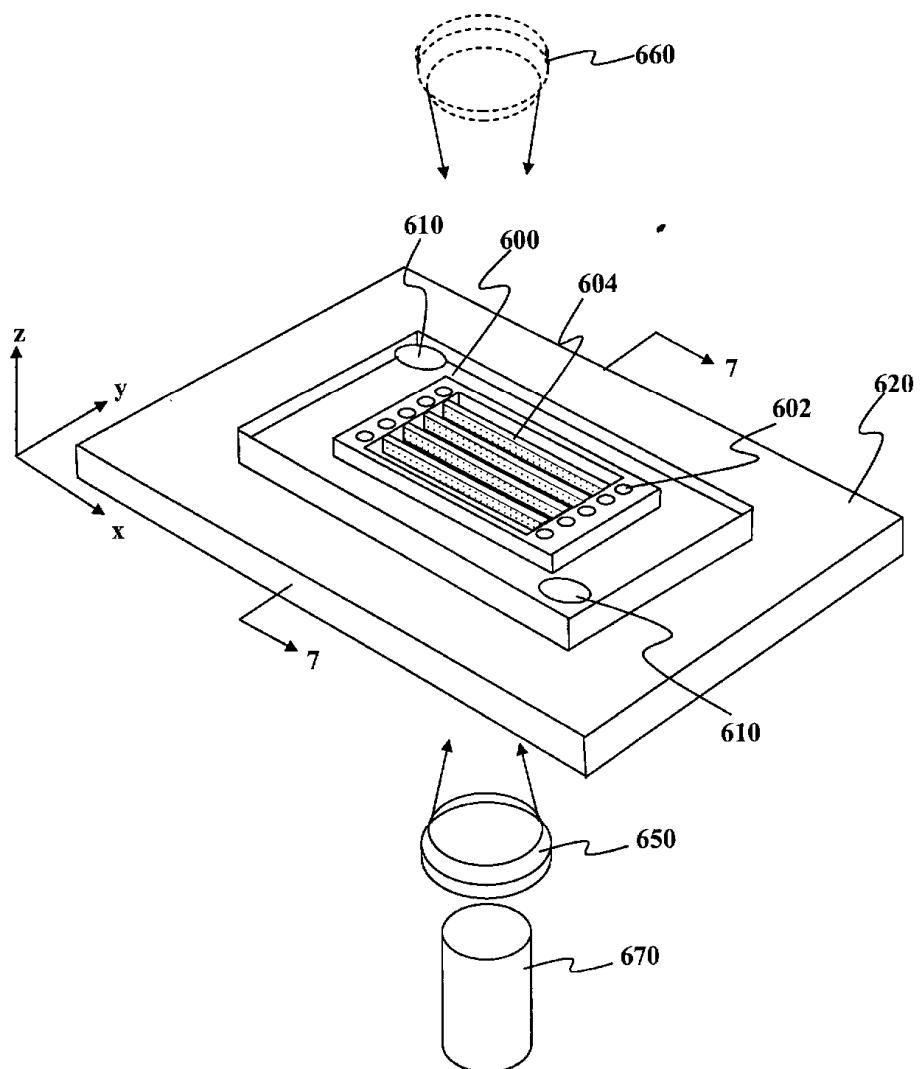


FIG. 6A

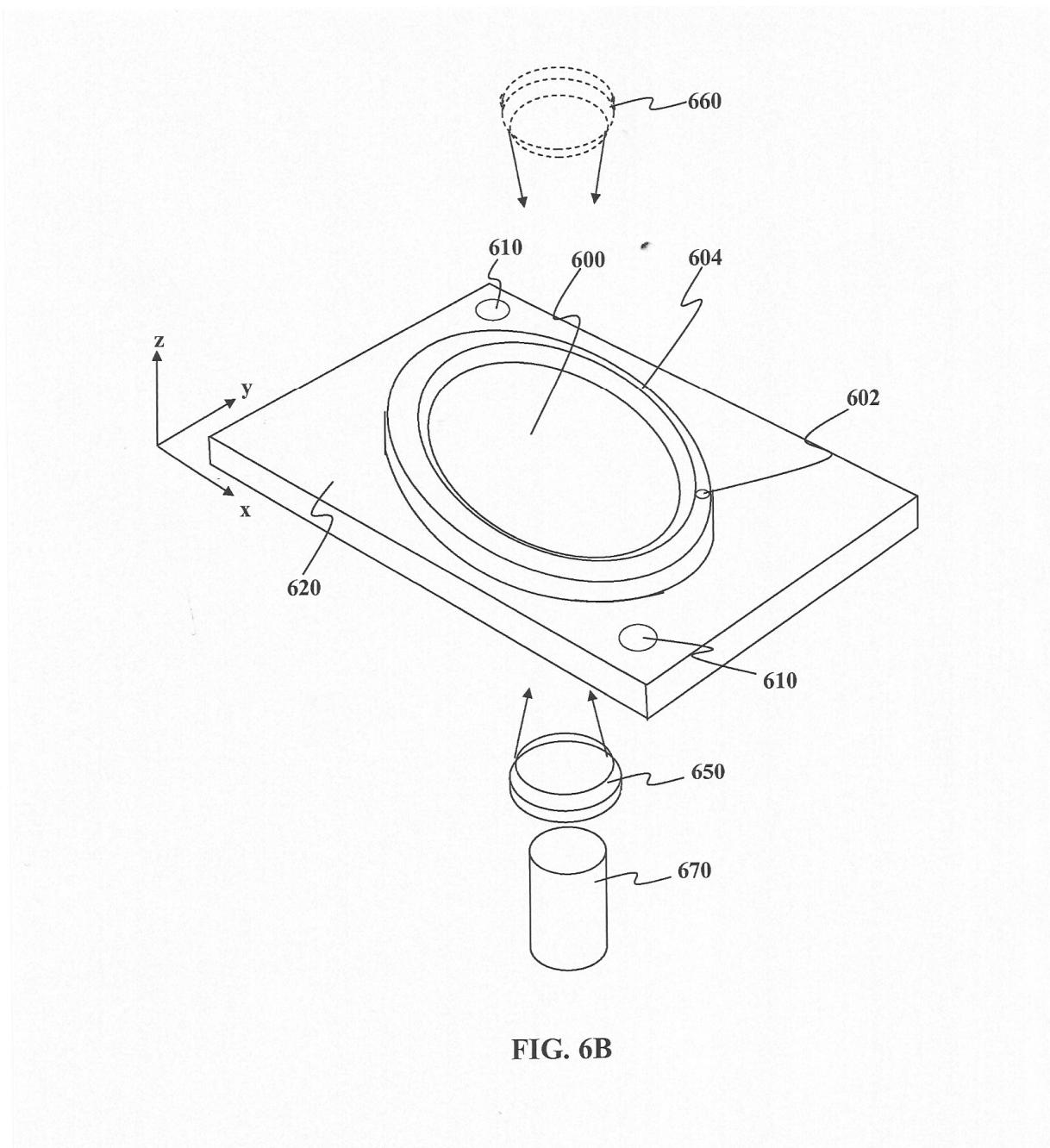


FIG. 6B

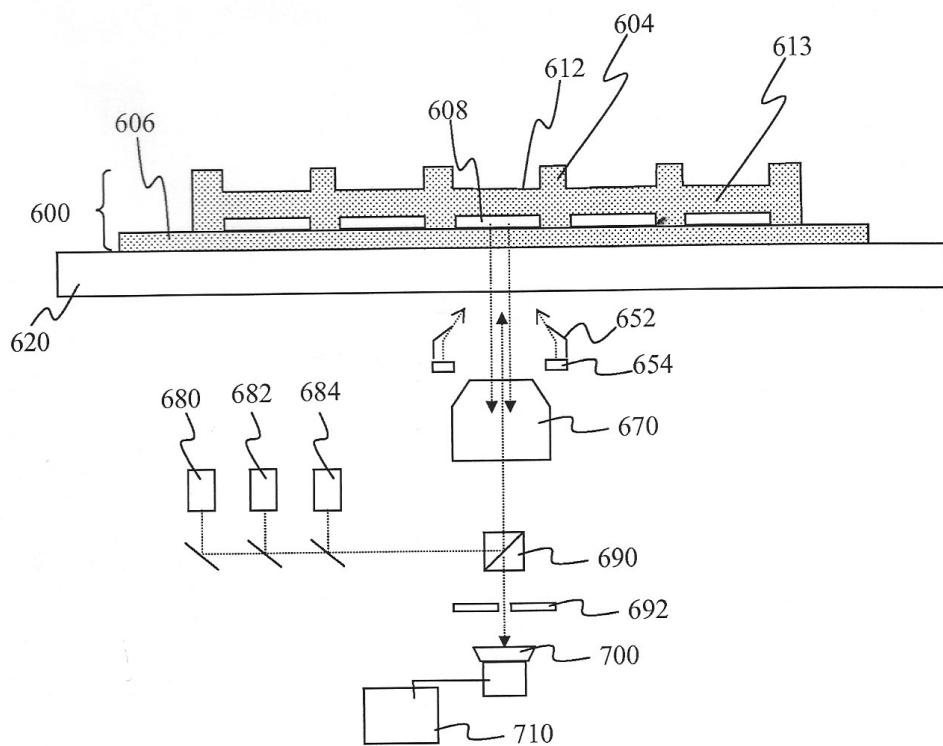


FIG. 7A

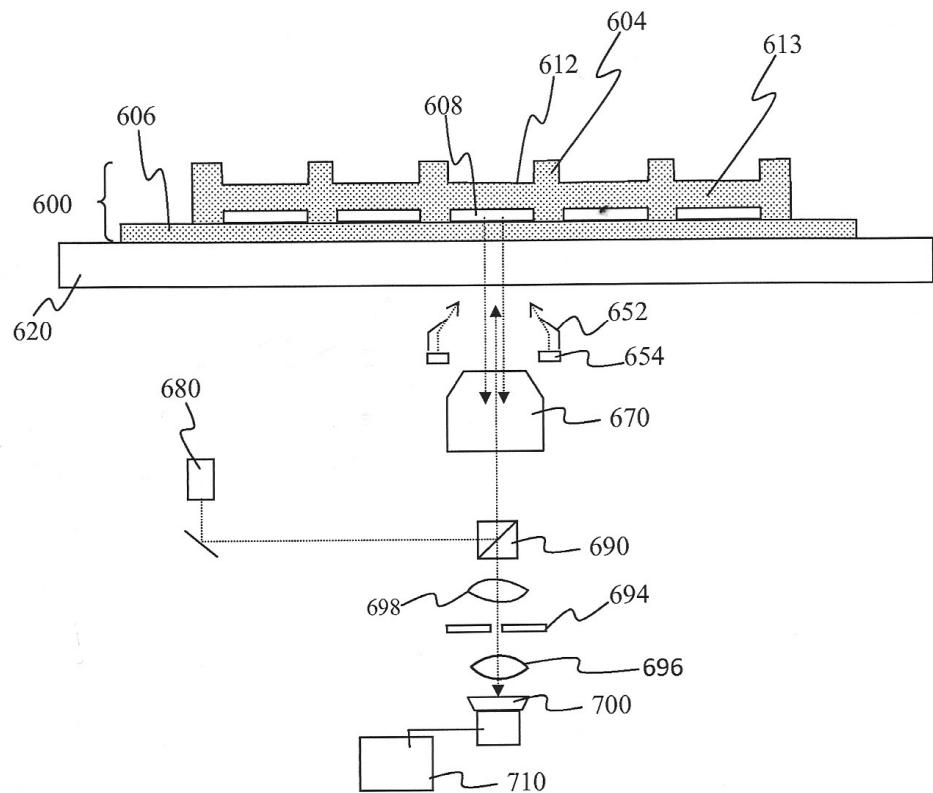


FIG. 7B

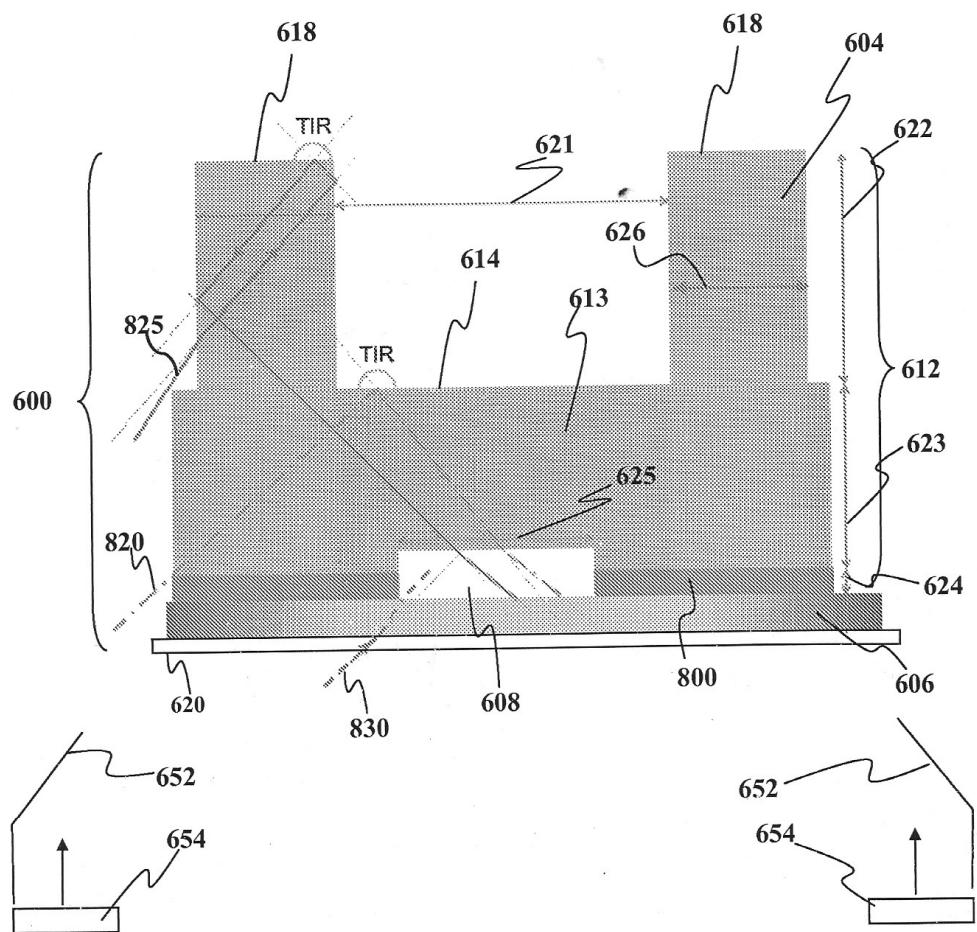


FIG. 8A

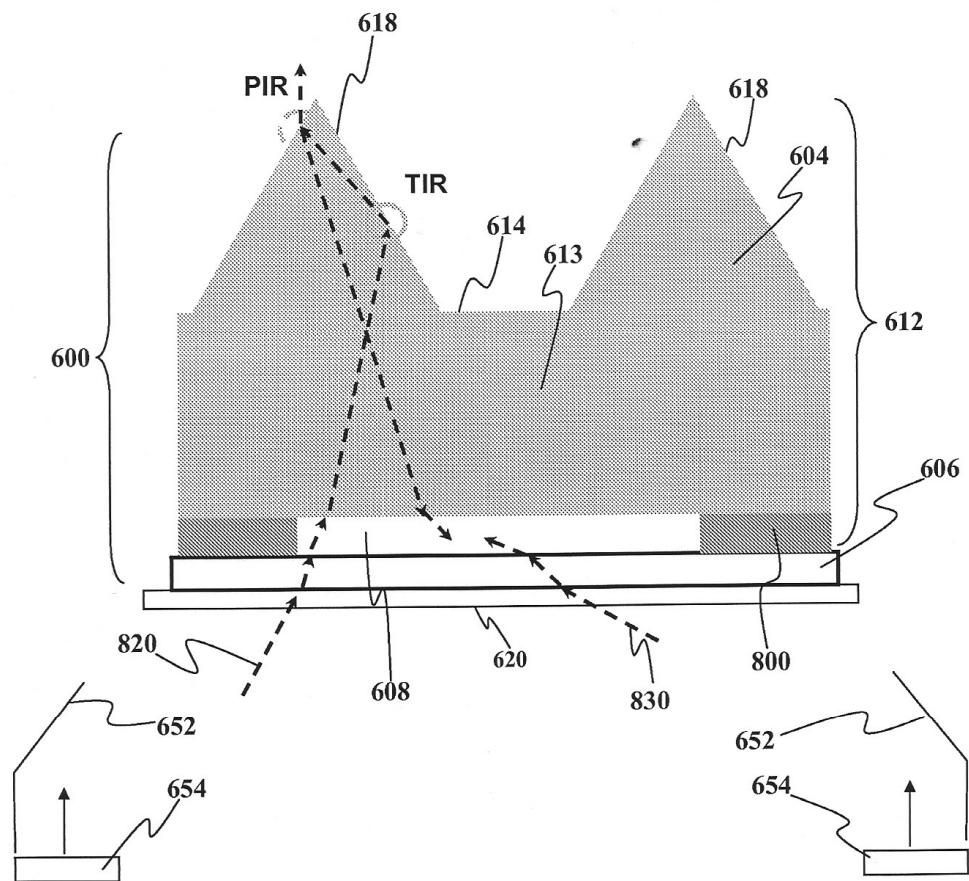


FIG. 8B

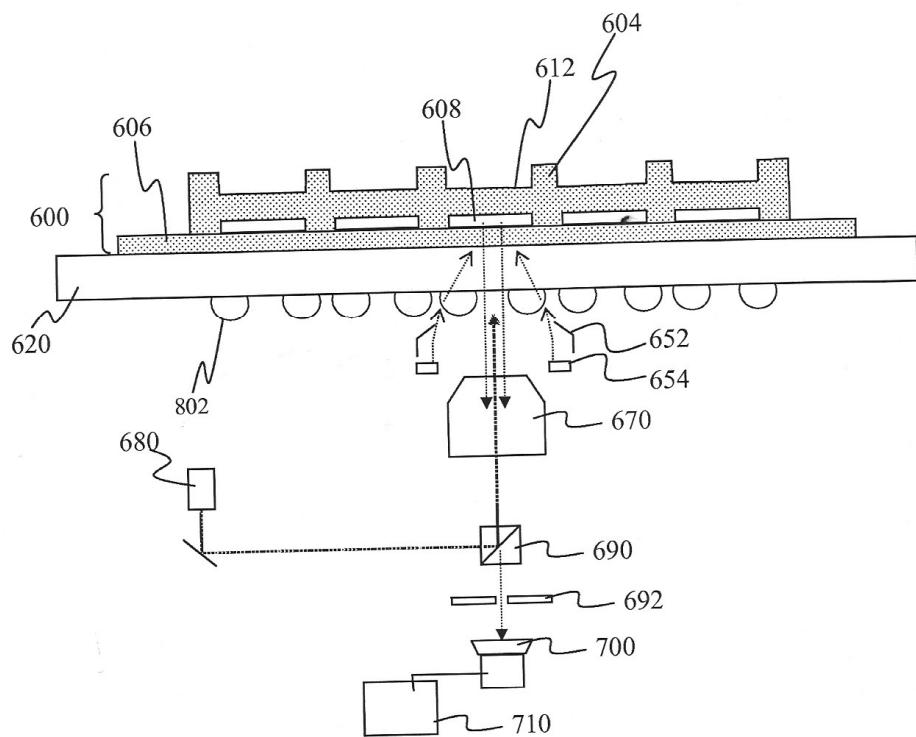


FIG. 8C

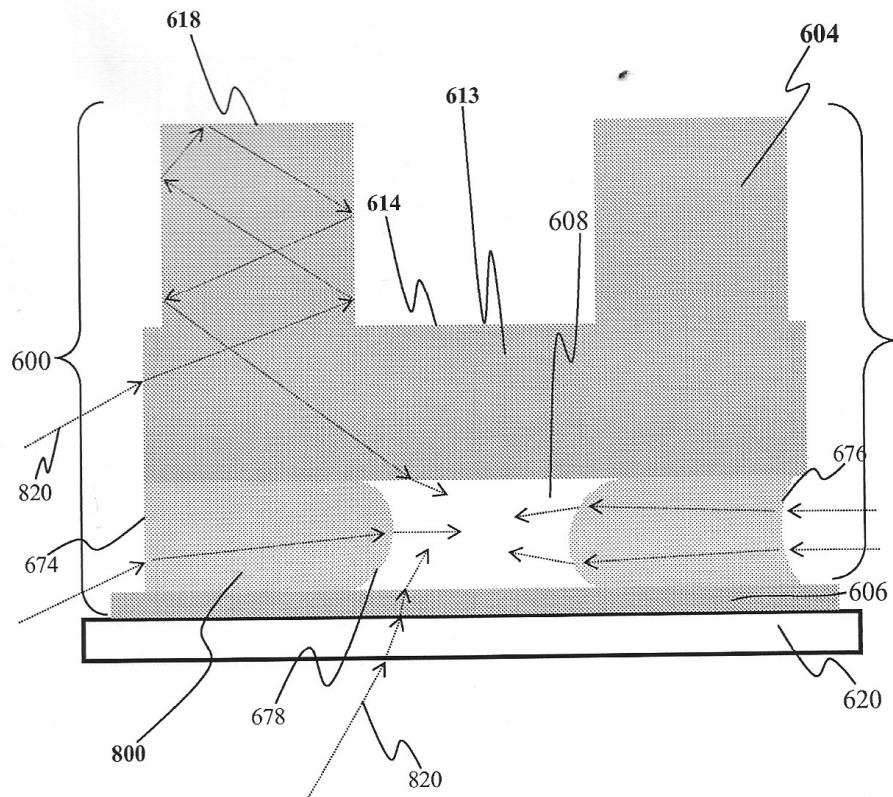


FIG. 8D

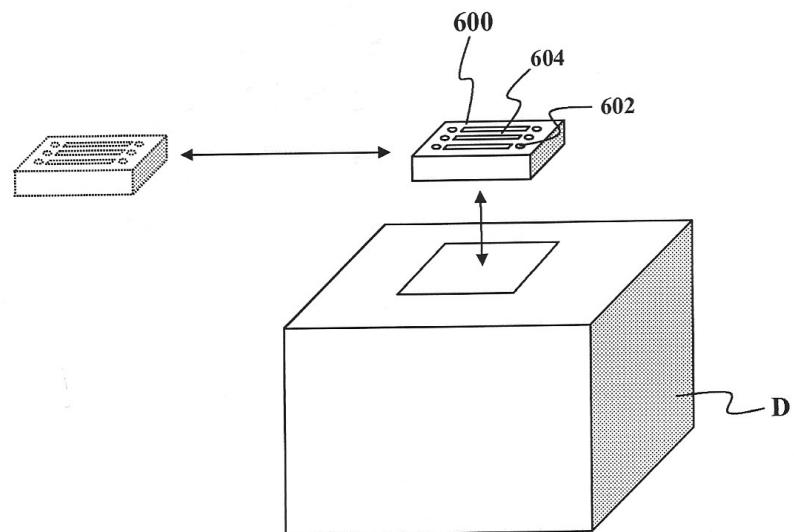


FIG. 8E

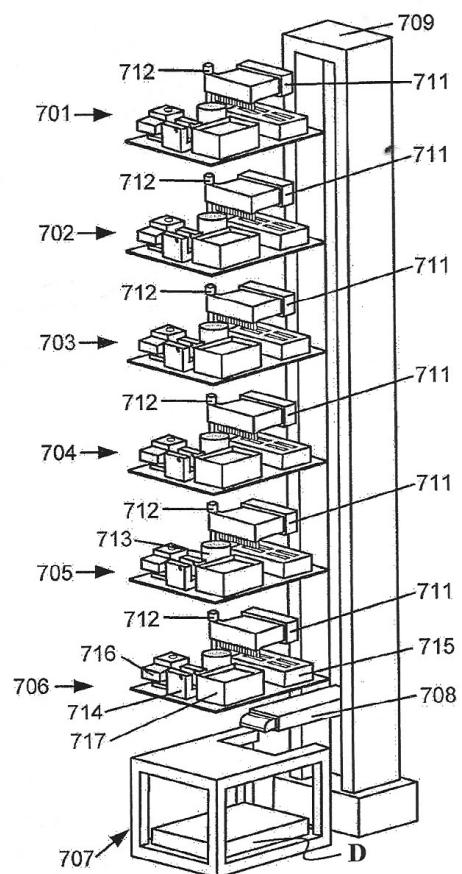
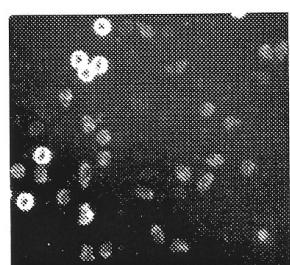
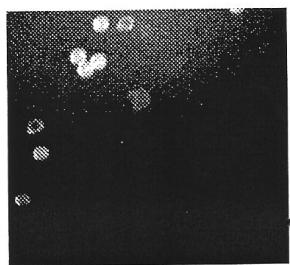


FIG. 8F



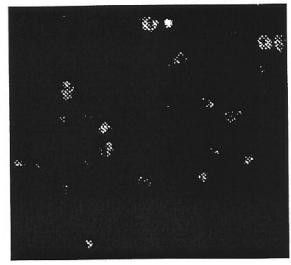
Dispersión

FIG. 9A



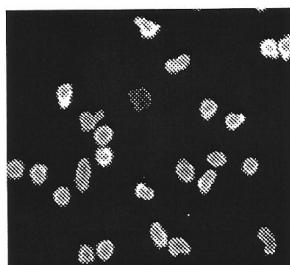
CD14-Pac Blue
para Monocitos

FIG. 9B



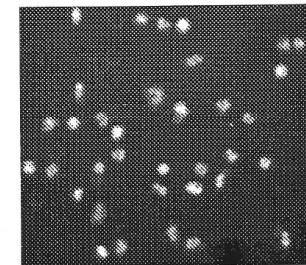
CD123-PECy-5
para Basófilos

FIG. 9C



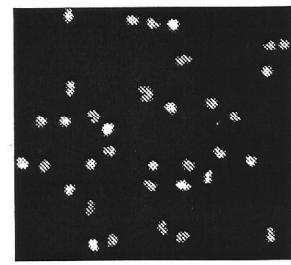
CD16-PE
para Neutrófilos

FIG. 9D



CD45-AF647
para todos los leucocitos

FIG. 9E



Draq5
como tinte nuclear

FIG. 9F

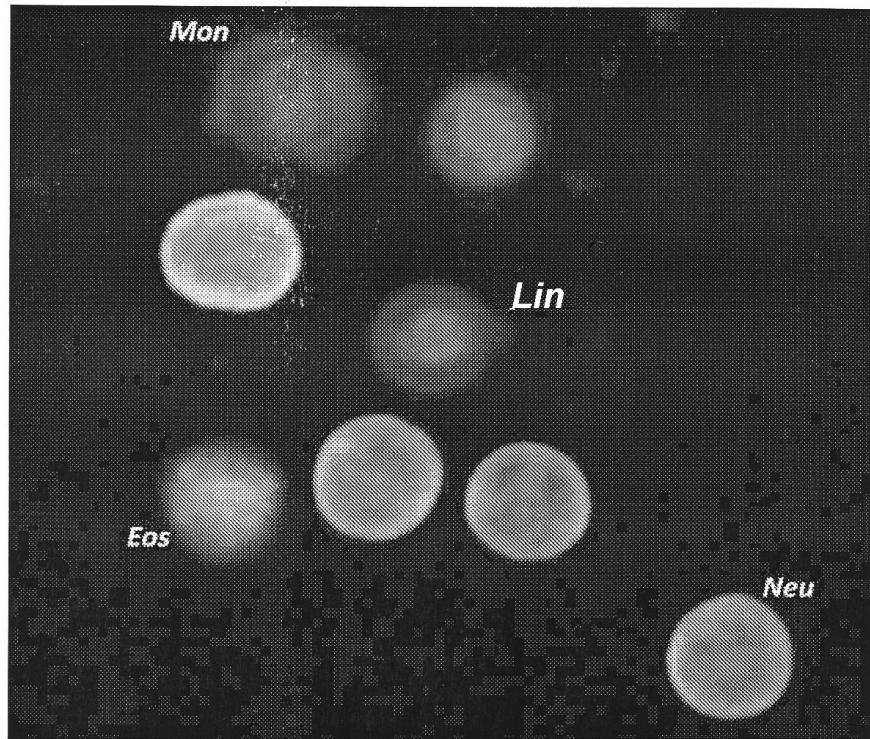


FIG. 10

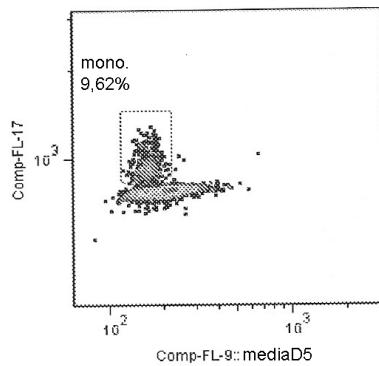


FIG. 11A

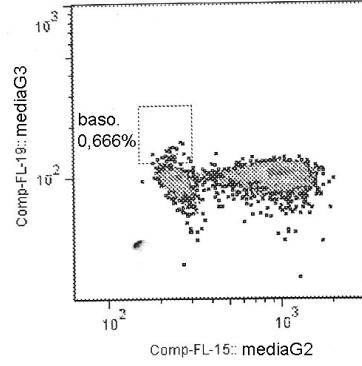


FIG. 11B

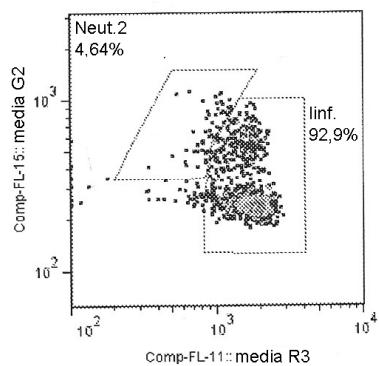


FIG. 11C

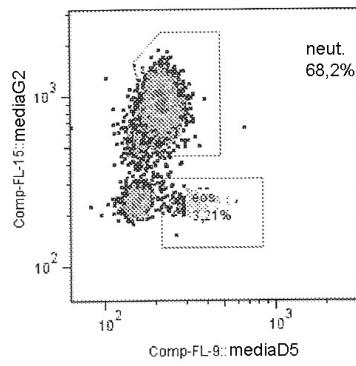


FIG. 11D

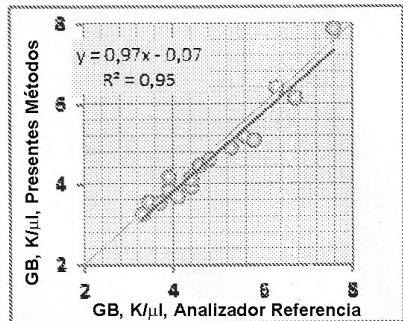


FIG. 12A

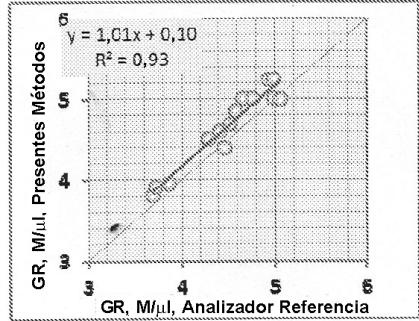


FIG. 12B

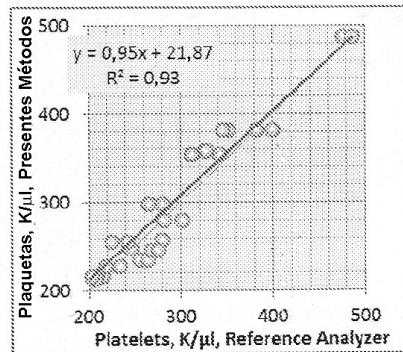


FIG. 12C

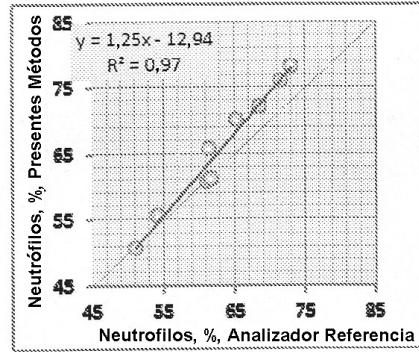


FIG. 12D

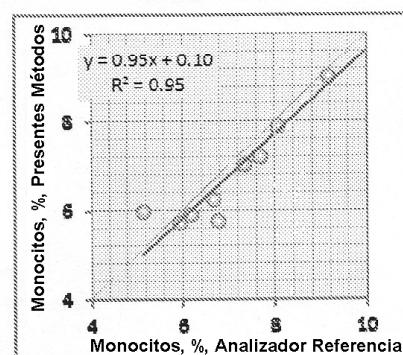


FIG. 12E

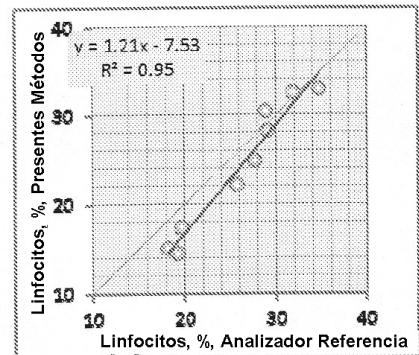


FIG. 12F