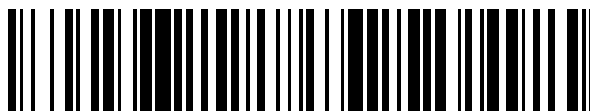


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 364**

51 Int. Cl.:

G01N 15/10 (2006.01)
G01N 1/30 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)
G01N 21/53 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/80 (2006.01)
G01N 21/05 (2006.01)
G01N 15/14 (2006.01)
G01N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2014** **PCT/US2014/030902**
87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14146030**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2014** **E 14722475 (2)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018** **EP 2972211**

54 Título: **Sistemas y métodos de célula de flujo para el análisis de partículas en muestras de sangre**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361799152 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
03.05.2019

73 Titular/es:

IRIS INTERNATIONAL, INC. (100.0%)
250 S Kraemer Blvd
Brea, CA 92821, US

72 Inventor/es:

FARRELL, GREGORY A.;
WANDERS, BART, J.;
ADAMS, THOMAS, H.;
GRONER, WARREN y
ZHAO, XIAODONG

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 711 364 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

Sistemas y métodos de célula de flujo para el análisis de partículas en muestras de sangre

5 Antecedentes de la invención

Esta divulgación se refiere al campo de aparatos, sistemas, composiciones y métodos para el análisis de partículas, incluyendo obtención de imágenes de partículas en muestras de fluido, usando dispositivos total o parcialmente automatizados para discriminar y cuantificar partículas tales como células sanguíneas en la muestra. La presente divulgación también se refiere a un líquido de alineación de partículas y/u orgánulos intracelulares (PIOAL) útil para analizar partículas en una muestra de un sujeto, a métodos para producir el líquido, y a métodos para usar el líquido para detectar y analizar partículas. También se dan a conocer composiciones, sistemas, dispositivos y métodos útiles para llevar a cabo análisis de muestras de fluidos biológicos basados en imágenes. Las realizaciones que se refieren a composiciones no son parte de la presente invención reivindicada. Las composiciones, sistemas, dispositivos y métodos de la presente divulgación también son útiles para detectar, contar y caracterizar partículas en fluidos biológicos tales como glóbulos rojos, reticulocitos, glóbulos rojos nucleados, plaquetas y para recuento diferencial, categorización, subcategorización, caracterización y/o análisis de glóbulos blancos basados en imágenes y morfológicamente.

El análisis de células sanguíneas es una de las pruebas médicas más comúnmente realizadas para proporcionar una visión general del estado de salud de un paciente. Puede extraerse una muestra de sangre del cuerpo de un paciente y almacenarse en un tubo de ensayo que contiene un anticoagulante para evitar la coagulación. Una muestra de sangre completa comprende normalmente tres clases principales de células sanguíneas incluyendo glóbulos rojos (eritrocitos), glóbulos blancos (leucocitos) y plaquetas (trombocitos). Cada clase puede dividirse adicionalmente en subclases de miembros. Por ejemplo, cinco tipos o subclases principales de glóbulos blancos (WBC) tienen diferentes formas y funciones. Los glóbulos blancos pueden incluir neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos. También hay subclases de los tipos de glóbulos rojos. El aspecto de las partículas en una muestra puede diferir según estados patológicos, madurez celular y otras causas. Las subclases de glóbulos rojos pueden incluir reticulocitos y glóbulos rojos nucleados.

Un recuento de células sanguíneas que estima la concentración de RBC, WBC o plaquetas puede realizarse manualmente o usando un analizador automático. Cuando se realizan recuentos de células sanguíneas manualmente, se aplica una gota de sangre a un portaobjetos de microscopio como un frotis delgado. De manera tradicional, se ha usado examen manual de un frotis de sangre seca y teñida sobre un portaobjetos de microscopio para determinar el número o cantidades relativas de los cinco tipos de glóbulos blancos. Se han usado colorantes y tintes histológicos para teñir células o estructuras celulares. Por ejemplo, la tinción de Wright es una tinción histológica que se ha usado para teñir frotis de sangre para examen bajo un microscopio óptico. Puede obtenerse un recuento de células sanguíneas completo (CBC) usando un analizador automatizado, un tipo que cuenta el número de partículas o células diferentes en una muestra de sangre basándose en la impedancia o dispersión de la luz dinámica a medida que las partículas o células pasan a través de un área de detección a lo largo de un tubo pequeño. El CBC automatizado puede emplear instrumentos o métodos para diferenciar entre diferentes tipos de células que incluyen RBC, WBC y plaquetas (PLT), que pueden contarse por separado. Por ejemplo, puede usarse una técnica de recuento que requiere un volumen o tamaño de partícula mínimo para contar sólo células grandes. Determinadas células tales como células anómalas en la sangre pueden no contarse o identificarse correctamente. Células pequeñas que se adhieren entre sí pueden contarse de manera errónea como una célula grande. Cuando se sospecha de recuentos erróneos, puede requerirse la revisión manual de los resultados del instrumento para verificar e identificar células.

Las técnicas de recuento de células sanguíneas automatizadas pueden implicar citometría de flujo. La citometría de flujo implica proporcionar una trayectoria de flujo estrecha, y detectar y contar el paso de células sanguíneas individuales. Se han usado métodos de citometría de flujo para detectar partículas suspendidas en un fluido, tales como células en una muestra de sangre, y para analizar las partículas en cuanto a tipo de partícula, dimensión y distribución de volumen para inferir la concentración del respectivo tipo de partícula o volumen de partícula en la muestra de sangre. Los ejemplos de métodos adecuados para analizar partículas suspendidas en un fluido incluyen sedimentación, caracterización microscópica, recuento basado en impedancia y dispersión de la luz dinámica. Estas herramientas están sujetas a errores de prueba. Por otro lado, la caracterización precisa de tipos y concentración de partículas puede ser críticas en aplicaciones tales como diagnóstico médico.

En técnicas de recuento basadas en obtención de imágenes, se capturan imágenes de datos de píxeles de una muestra preparada que pueden pasar a través de un área de visualización usando una lente objetivo de microscopía acoplada a una cámara digital. Los datos de imágenes de píxel pueden analizarse usando técnicas de procesamiento de datos, y también presentadas en un monitor.

Se dan a conocer aspectos de sistemas de diagnóstico automatizados con células de flujo en la patente estadounidense n.º 6.825.926 de Turner *et al.* y en las patentes estadounidenses n.ºs 6.184.978; 6.424.415; y 6.590.646, todas de Kasdan *et al.*

Se han usado sistemas automatizados que usan dispersión de la luz dinámica o impedancia para obtener un recuento de células sanguíneas completo (CBC): recuento de glóbulos blancos total (WBC), volumen celular total de glóbulos rojos (de distribución RBC), hemoglobina HGB (la cantidad de hemoglobina en la sangre); volumen celular medio (MCV) (volumen medio de los glóbulos rojos); MPV (volumen de PLT medio); hematocrito (HCT); MCH (HGB/RBC) (la cantidad promedio de hemoglobina por glóbulo rojo); y MCHC (HGB/HCT) (la concentración promedio de hemoglobina en las células). Se han usado procesos automatizados o parcialmente automatizados para facilitar el recuento diferencial en cinco partes de glóbulos blancos y los análisis de muestras de sangre.

Aunque tales sistemas y métodos de análisis de partículas conocidos actualmente, junto con técnicas de diagnóstico médico relacionadas, pueden proporcionar beneficios reales a médicos, facultativos y pacientes, todavía son deseables mejoras adicionales. Las realizaciones de la presente invención proporcionan disoluciones para al menos algunas de estas necesidades excepcionales.

El documento WO 01/48455 describe el uso de un fluido envolvente y una muestra con adición de un agente de aumento de la viscosidad para dar una viscosidad mayor que la del agua, lo que garantiza que el flujo en la sección previa al análisis es flujo laminar completamente desarrollado, y que el flujo en la sección de análisis será laminar. Se prefieren polímeros solubles en agua porque aumentan la velocidad de fluido con efectos osmóticos despreciables.

El documento WO 00/11449 se refiere a mecanismos de alta velocidad para identificar automáticamente y seleccionar físicamente organismos multicelulares u otros objetos grandes con características predeterminadas de poblaciones mixtas y depositarlos en ubicaciones diferenciadas.

El documento EP 0486747 se refiere a un citómetro de obtención de imágenes de flujo para obtener imágenes de las dimensiones y formas de componentes de partícula en un flujo de una disolución de muestra que tiene un filamento delgado que sirve como referencia de enfoque en una zona de obtención de imágenes plana a través de la cual fluye la disolución de muestra para obtener imágenes de los componentes de partículas.

El documento EP 0468100 se refiere a citometría de obtención de imágenes de flujo en la que se introduce una muestra tal como sangre u orina teñida de manera adecuada en una célula de flujo para formar un flujo plano y envolvente dentro de la célula, la zona de flujo envolvente se irradia con luz estroboscópica y se analiza una imagen de la célula obtenida mediante una cámara de vídeo mediante un procesador de imágenes. Más particularmente, se refiere a un método de ajuste automático del punto focal usado en tal citometría de obtención de imágenes de flujo.

El documento US 5812419 da a conocer un método de análisis completamente automatizado con un sistema óptico para un analizador de células sanguíneas.

Breve resumen de la invención

Las realizaciones de la presente invención se refieren a aparatos, sistemas y métodos para analizar una muestra preparada que contiene partículas. Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para obtener imágenes de partículas usando un sistema de análisis de partículas configurado para hidroenfoco combinado de la viscosidad y geometría de las partículas incluidas dentro de una muestra de fluido sanguíneo, tal como se establece en la reivindicación 1. Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un sistema de análisis de partículas que realiza hidroenfoco combinado de la viscosidad y geometría para obtener imágenes de partículas en una muestra de fluido sanguíneo, tal como se establece en la reivindicación 7. En algunos aspectos, el sistema comprende un analizador que puede ser un analizador visual. En algunos aspectos, el aparato contiene un analizador visual y un procesador. En un aspecto, esta divulgación se refiere a un sistema de obtención de imágenes de partículas automatizado en el que una muestra de líquido que contiene partículas de interés se hace fluir a través de una célula de flujo que tiene una ventana de observación mediante la cual un dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución óptica captura una imagen. En algunos aspectos, el dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución óptica comprende una cámara tal como una cámara digital. En un aspecto, el dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución óptica comprende una lente objetivo.

La célula de flujo se acopla a una fuente de fluido de muestra, tal como una muestra preparada, y a una fuente de líquido de alineación de partículas y/u orgánulos intracelulares (PIOAL). El sistema permite la captura de imágenes enfocadas de partículas en flujo. En algunas realizaciones, las imágenes pueden usarse en procesos automatizados ultrarrápidos para categorizar y subcategorizar partículas. Un analizador visual a modo de ejemplo puede incluir un procesador para facilitar el análisis automatizado de las imágenes. En algunos casos, el analizador visual puede usarse en métodos de esta divulgación para proporcionar recuento diferencial automatizado de WBC basado en imágenes u otros protocolos de análisis de partículas de muestras de sangre. En algunos casos, los métodos de esta divulgación se refieren a la identificación automatizada de anomalías morfológicas para determinar, diagnosticar, pronosticar, predecir y/o respaldar un diagnóstico de si un sujeto está sano o tiene una enfermedad, estado, anomalía y/o infección y para monitorizar si un sujeto responde o no al tratamiento.

En un aspecto, las realizaciones de la presente invención abarcan métodos para obtener imágenes de partículas usando un sistema de análisis de partículas que está configurado para hidroenfoco combinado de la viscosidad y geometría. Las partículas pueden incluirse dentro de fluidos de muestra primero y segundo de una muestra de fluido sanguíneo. Los métodos a modo de ejemplo pueden incluir hacer fluir un fluido envolvente a lo largo de una trayectoria de flujo de una célula de flujo del analizador de partículas, y el fluido envolvente puede tener una viscosidad que es diferente de una viscosidad de la muestra de fluido sanguíneo. En algunos casos, el fluido envolvente tiene una viscosidad de fluido envolvente que difiere de la viscosidad de fluido de muestra en una diferencia de viscosidad, y la diferencia de viscosidad tiene un valor en un intervalo de diferencia de viscosidad predeterminado. Los métodos también pueden incluir inyectar el primer fluido de muestra de un tubo de inyección de fluido de muestra en el fluido envolvente que fluye dentro de la célula de flujo para proporcionar una corriente de fluido de muestra que tiene un primer grosor adyacente al tubo de inyección. La trayectoria de flujo de la célula de flujo puede tener una disminución de la trayectoria de tamaño de flujo de modo que el grosor de la corriente de fluido de muestra disminuye desde el grosor inicial hasta un segundo grosor adyacente a un sitio de captura de imágenes. Los métodos de la divulgación pueden incluir además obtener imágenes de una primera pluralidad de las partículas del primer fluido de muestra en el sitio de captura de imágenes de la célula de flujo, e iniciar transitorios de fluido de muestra terminando la inyección del primer fluido de muestra en el fluido envolvente que fluye. Además, los métodos pueden incluir obtener imágenes de una segunda pluralidad de las partículas del segundo fluido de muestra en el sitio de captura de imágenes de la célula de flujo. La obtención de imágenes de la segunda pluralidad de partículas puede realizarse sustancialmente después de los transitorios de fluido de muestra y en el plazo de 4 segundos de la obtención de imágenes de la primera pluralidad de las partículas. En algunos casos, la disminución del tamaño de la trayectoria de flujo se define por una porción de trayectoria de flujo proximal que tiene un grosor proximal, y porción de trayectoria de flujo distal que tiene un grosor distal menor que el grosor proximal. Un extremo posterior del tubo de inyección de fluido de muestra puede colocarse de manera distal a la porción de trayectoria de flujo proximal. La diferencia de viscosidad entre las muestras de fluido sanguíneo y envolvente, en combinación con la disminución del tamaño de la trayectoria de flujo, puede ser eficaz para hidroenfocar los fluidos de muestra primero y segundo en el sitio de captura de imágenes, mientras que un agente de viscosidad en el fluido envolvente retiene la viabilidad de células en los fluidos de muestra primero y segundo que dejan la estructura y el contenido de las células intacto cuando las células se extienden desde la corriente de fluido de muestra en el fluido envolvente que fluye.

En algunos métodos, el tubo de inyección puede incluir un volumen interno basado en una razón de una sección transversal del área de flujo del tubo de inyección con respecto a una sección transversal de área de flujo de la célula de flujo, una razón de la sección transversal del área de flujo del tubo de inyección con respecto a un diámetro exterior de la célula de flujo, o una razón de la sección transversal del área de flujo del tubo de inyección con respecto a una sección transversal de área de flujo de la corriente de muestra. En algunos casos, la disminución del tamaño de la trayectoria de flujo puede definirse por paredes opuestas de la trayectoria de flujo que se inclinan radialmente hacia dentro a lo largo de la trayectoria de flujo generalmente simétrica sobre un plano transversal que biseca los grosores primero y segundo de la corriente de fluido de muestra. En algunos casos, la simetría en la disminución del tamaño de la trayectoria de flujo es eficaz para limitar la desalineación de la orientación de la obtención de imágenes de glóbulos rojos en la muestra de fluido sanguíneo hasta menos de aproximadamente el 20%. En algunos casos, la muestra de fluido sanguíneo incluye partículas esféricas, y una viscosidad diferencial entre el fluido de muestra y el fluido envolvente es eficaz para alinear orgánulos intracelulares de las partículas esféricas dentro de un plano focal en el sitio de captura de imágenes de la célula de flujo. En algunos casos, una porción distal del tubo de inyección de fluido de muestra se coloca a una distancia de separación axial del sitio de captura de imágenes, y la distancia de separación axial tiene un valor dentro de un intervalo de desde aproximadamente 16 mm hasta aproximadamente 26 mm. En algunos casos, el tubo de inyección tiene un volumen interno de menos de aproximadamente 30 μ l.

En algunos métodos, el tubo de inyección tiene una porción proximal que tiene una primera área de sección transversal de flujo y una porción distal que tiene una segunda área de sección transversal de flujo, y el área de sección transversal de flujo de la porción proximal es mayor de 1,5 veces el área de sección transversal de flujo de la porción distal. En algunos métodos, el tubo de inyección tiene una porción distal dispuesta entre la porción proximal y la porción distal, la porción distal tiene una tercera sección transversal de flujo, y la tercera sección transversal de flujo es mayor que las secciones transversales de flujo primera y segunda.

En algunos métodos, una porción distal del tubo de inyección de fluido de muestra incluye un puerto de salida que tiene una altura y un ancho, y la altura puede ser menor que el ancho. En algunos casos, la altura es de aproximadamente 150 μ m y el ancho es de aproximadamente 1350 μ m. En algunos casos, la altura tiene un valor dentro de un intervalo de desde aproximadamente 50 μ m hasta aproximadamente 250 μ m y el ancho tiene un valor dentro de un intervalo de desde aproximadamente 500 μ m hasta aproximadamente 3000 μ m.

En algunos métodos, una razón de la velocidad de flujo de fluido envolvente con respecto a la velocidad de flujo de fluido de muestra es de aproximadamente 70. En algunos casos, la razón de la velocidad de flujo de fluido envolvente con respecto a la velocidad de flujo de fluido de muestra es de aproximadamente 200. En algunos casos, el fluido envolvente tiene una velocidad de flujo de aproximadamente 35 μ l/s y el fluido de muestra tiene una velocidad de flujo de aproximadamente 0,5 μ l/s. En algunos casos, el fluido de muestra tiene una velocidad de entre aproximadamente 20 y 200 mm/segundo en el sitio de captura de imágenes. En algunos casos, la velocidad de

fluido envolvente y la velocidad de muestra de fluido pueden diferir en una posición de trayectoria de flujo próxima al puerto de salida del tubo del tubo de inyección, y la velocidad de fluido envolvente y la velocidad de muestra de fluido pueden ser iguales en el sitio de captura de imágenes. En algunos casos, el primer grosor de la corriente de fluido de muestra es de aproximadamente 150 μm , por ejemplo cuando el fluido de muestra sale del tubo de inyección. En algunos casos, el segundo grosor de la corriente de fluido de muestra está dentro de un intervalo de desde aproximadamente 2 μm hasta aproximadamente 10 μm , por ejemplo cuando la corriente de fluido de muestra fluye a través del sitio de captura de imágenes. En algunos casos, el segundo grosor de la corriente de fluido de muestra está dentro de un intervalo de desde aproximadamente 2 μm hasta aproximadamente 4 μm . En algunos casos, una razón del primer grosor de la corriente de fluido de muestra con respecto al segundo grosor de la corriente de fluido de muestra tiene un valor dentro de un intervalo de desde aproximadamente 20:1 hasta aproximadamente 70:1. En algunos casos, una razón del primer grosor de la corriente de fluido de muestra con respecto al segundo grosor de la corriente de fluido de muestra tiene un valor dentro de un intervalo de desde aproximadamente 5:1 hasta aproximadamente 200:1. En algunos casos, una razón del grosor proximal de la porción de trayectoria de flujo proximal con respecto al grosor distal de la porción de trayectoria de flujo distal tiene un valor de adelgazamiento geométrico seleccionado del grupo que consiste en 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90:1, 95:1, 100:1, 105:1, 110:1, 115:1, 125:1, 130:1, 140:1, 150:1, 160:1, 170:1, 180:1, 190:1, y 200:1. En algunos casos, la célula de flujo tiene una razón de compresión mínima de aproximadamente 50:1 y una razón de compresión máxima de aproximadamente 125:1.

En algunos métodos, la célula de flujo está orientada de modo que el fluido de muestra y el fluido envolvente que fluyen dentro de la célula de flujo fluyen contra la gravedad. En algunos casos, la célula de flujo está orientada de modo que el fluido de muestra y el fluido envolvente que fluyen dentro de la célula de flujo fluyen con la gravedad. Los métodos a modo de ejemplo también pueden incluir eliminar burbujas del fluido de muestra que fluye. En algunos casos, el primer fluido de muestra alcanza un estado estabilizado en el plazo de aproximadamente 1 a 3 segundos tras la inyección del primer fluido de muestra del tubo de inyección de fluido de muestra en el fluido envolvente que fluye. En algunos casos, el primer fluido de muestra alcanza un estado estabilizado en el plazo de menos de 1 segundo tras la inyección del primer fluido de muestra del tubo de inyección de fluido de muestra en el fluido envolvente que fluye. En algunos casos, el primer fluido de muestra alcanza un estado estabilizado en el plazo de aproximadamente 1,8 segundos desde la inyección del primer fluido de muestra del tubo de inyección de fluido de muestra en el fluido envolvente que fluye. En algunos casos, el fluido de muestra tiene un tiempo de tránsito a través de la célula de flujo dentro de un intervalo de desde aproximadamente 1 hasta 4 segundos. En algunos casos, el fluido de muestra tiene un tiempo de tránsito a través de la célula de flujo dentro de un intervalo de desde aproximadamente 2 hasta 4 segundos. En algunos casos, el sitio de captura de imágenes tiene un campo de visión de entre aproximadamente 150 μm x 150 μm y 400 μm x 400 μm . En algunos casos, el primer fluido de muestra tiene un volumen un intervalo de desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 150 μl . En algunos casos, una porción proximal del tubo de inyección se acopla a un puerto de muestra de un accesorio de entrada de muestra.

En otro aspecto, las realizaciones de la presente invención abarcan sistemas de análisis de partículas que realizan hidroenfoco combinado de la viscosidad y geometría para obtener imágenes de partículas en una muestra de fluido sanguíneo. Las partículas pueden incluirse dentro de los fluidos de muestra primero y segundo. Los sistemas a modo de ejemplo pueden incluir una célula de flujo que tiene una trayectoria de flujo configurada para transmitir un flujo del fluido envolvente. El fluido envolvente puede tener una viscosidad que es mayor que la viscosidad de la muestra de fluido sanguíneo. Los sistemas también pueden incluir un sistema de inyección de fluido de muestra en comunicación de fluido con la trayectoria de fluido. El sistema de inyección de fluido de muestra puede configurarse para inyectar los fluidos de muestra en el fluido envolvente que fluye dentro de la célula de flujo para proporcionar una corriente de fluido de muestra que tiene un primer grosor adyacente al tubo de inyección. La trayectoria de flujo de la célula de flujo puede tener una disminución de la trayectoria de tamaño de flujo de modo que el grosor de la corriente de fluido de muestra disminuye desde el grosor inicial hasta un segundo grosor adyacente a un sitio de captura de imágenes. Además, los sistemas pueden incluir un dispositivo de captura de imágenes alineado con el sitio de captura de imágenes para obtener imágenes de una primera pluralidad de las partículas del primer fluido de muestra en el sitio de captura de imágenes de la célula de flujo. Además, los sistemas pueden incluir un procesador acoplado con el sistema de inyector de fluido de muestra y el dispositivo de captura de imágenes. El procesador puede configurarse para terminar la inyección del primer fluido de muestra en el fluido envolvente que fluye e inyectar el segundo fluido de muestra en el fluido envolvente que fluye de modo que se inician transitorios de fluido de muestra, y para obtener imágenes de una segunda pluralidad de las partículas del segundo fluido de muestra en el sitio de captura de imágenes de la célula de flujo después de los transitorios de fluido de muestra y en el plazo de 4 segundos de la obtención de imágenes de la primera pluralidad las partículas. En sistemas a modo de ejemplo, la diferencia de viscosidad entre las muestras de fluido sanguíneo y envolvente, en combinación con la disminución del tamaño de la trayectoria de flujo, es eficaz para hidroenfocar los fluidos de muestra primero y segundo en el sitio de captura de imágenes de la célula de flujo, mientras que un agente de viscosidad en el fluido envolvente retiene la viabilidad de células en los fluidos de muestra primero y segundo que dejan la estructura y el contenido de las células intacto cuando las células se extienden desde la corriente de fluido de muestra en el fluido envolvente que fluye.

En algunos sistemas, el tubo de inyección incluye un volumen interno basado en una razón de una sección

transversal del área de flujo del tubo de inyección con respecto a una sección transversal de área de flujo de la célula de flujo, una razón de la sección transversal del área de flujo del tubo de inyección con respecto a un diámetro exterior de la célula de flujo, o una razón de la sección transversal del área de flujo del tubo de inyección con respecto a una sección transversal de área de flujo de la corriente de muestra. En algunos casos, la disminución del tamaño de la trayectoria de flujo se define por paredes opuestas de la trayectoria de flujo que se inclinan radialmente hacia dentro a lo largo de la trayectoria de flujo generalmente simétrica sobre un plano transversal que biseca los grosores primero y segundo de la corriente de fluido de muestra. En algunos casos, la simetría en la disminución del tamaño de la trayectoria de flujo es eficaz para limitar la desalineación de la orientación de la obtención de imágenes de glóbulos rojos en la muestra de fluido sanguíneo hasta menos de aproximadamente el 20%. En algunos casos, una porción distal del tubo de inyección de fluido de muestra se coloca a una distancia de separación axial del sitio de captura de imágenes, y la distancia de separación axial tiene un valor dentro de un intervalo de desde aproximadamente 16 mm hasta aproximadamente 26 mm. En algunos casos, el tubo de inyección incluye una porción proximal que tiene una primera área de sección transversal de flujo y una porción distal que tiene una segunda área de sección transversal de flujo, y el área de sección transversal de flujo de la porción proximal es mayor de 1,5 veces el área de sección transversal de flujo de la porción distal. En algunos casos, el fluido de muestra tiene un tiempo de tránsito a través de la célula de flujo dentro de un intervalo de desde aproximadamente 1 hasta 4 segundos. En algunos casos, el fluido de muestra tiene un tiempo de tránsito a través de la célula de flujo dentro de un intervalo de desde aproximadamente 2 hasta 4 segundos. En algunos casos, la célula de flujo está configurada para recibir el fluido envolvente de una fuente de fluido envolvente en la trayectoria de flujo en una primera dirección de flujo que es perpendicular a segunda dirección de flujo del fluido envolvente a lo largo de la trayectoria de flujo en el sitio de obtención de imágenes. En algunos casos, la célula de flujo incluye una diana de autoenfoco para el dispositivo de captura de imágenes.

Las características descritas anteriormente y muchas otras características y ventajas acompañantes de las realizaciones de la presente invención se harán evidentes y se comprenderán mejor haciendo referencia a la siguiente descripción detallada cuando se considera junto con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una ilustración esquemática, parcialmente en sección y no a escala, que muestra aspectos operativos de una célula de flujo, sistema de autoenfoco y dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución óptica a modo de ejemplo para análisis de imágenes de muestras usando procesamiento de imágenes digital.

La figura 2 es una ilustración en perspectiva de una célula de flujo según una realización a modo de ejemplo.

La figura 3 es una vista en sección longitudinal mediana a lo largo de las líneas 3-3 de la célula de flujo mostrada en la figura 2.

Las figuras 3A y 3B proporcionan vistas de sección adicionales de células de flujo según realizaciones de la presente invención.

La figura 4 representa aspectos de un sistema de analizador según realizaciones de la presente invención.

Las figuras 4A, 4B-1 y 4B-2 representan aspectos de células de flujo según realizaciones de la presente invención.

Las figuras 4A-1 y 4A-2 representan vistas en sección transversal de las dimensiones de la envoltura del fluido envolvente (por ejemplo, PIOAL) y de la corriente del fluido de muestra dentro de una célula de flujo en un puerto de salida de cánula y un sitio de captura de imágenes, respectivamente, según realizaciones de la presente invención.

Las figuras 4C-4G, 4C-1 y 4D-1 representan aspectos de configuraciones de cánula según realizaciones de la presente invención.

La figura 4H representa aspectos de una célula de flujo según realizaciones de la presente invención.

Las figuras 4I y 4J representan aspectos de flujo de fluido en una célula de flujo en relación con la gravedad según realizaciones de la presente invención.

Las figuras 4K y 4L representan aspectos de flujo de muestra y fluido envolvente dentro de una célula de flujo en un sitio de captura de imágenes, según realizaciones de la presente invención.

La figura 4L-1 representa aspectos de la velocidad de flujo de fluido dentro de una célula de flujo según realizaciones de la presente invención.

Las figuras 4M y 4N representan aspectos de obtención de imágenes y alineación intracelular, según realizaciones de la presente invención.

La figura 4O representa aspectos del efecto de PIOAL sobre la obtención de imágenes y alineación de partículas y/o partículas intracelulares según realizaciones de la presente invención. En esta comparación de imágenes obtenidas usando PIOAL frente a imágenes obtenidas usando un fluido envolvente distinto de PIOAL, puede observarse que el uso de PIOAL dio como resultado más contenido celular enfocado tal como lóbulos, citoplasma y/o gránulo.

La figura 4R ilustra determinados resultados de alineación de partículas obtenidos usando configuraciones de célula de flujo y composiciones de fluido envolvente según realizaciones de la presente invención.

Las figuras 4P y 4Q muestran una comparación de imágenes obtenidas usando PIOAL frente a imágenes obtenidas usando fluido envolvente convencional. Puede observarse que el uso de PIOAL dio como resultado una alineación de RBC mejorado.

La figura 5 representa aspectos de los métodos de obtención de imágenes de partículas según realizaciones de la presente invención.

La figura 6 representa aspectos de los métodos de obtención de imágenes de partículas según realizaciones de la presente invención.

Las figuras 7 y 8 representan aspectos de la velocidad de deformación de la corriente de flujo según realizaciones de la presente invención.

Las figuras 9A y 9B representan aspectos de dianas de autoenfoco según los ejemplos, no siendo parte de la presente invención, pero no obstante útiles para entender la presente invención.

Las figuras 10 y 11 representan aspectos de dianas de autoenfoco según los ejemplos, no siendo parte de la presente invención, pero no obstante útiles para entender la presente invención.

Las figuras 12A y 12B representan aspectos de dianas de autoenfoco según los ejemplos, no siendo parte de la presente invención, pero no obstante útiles para entender la presente invención.

Las figuras 13A, 13B, y 13C representan aspectos de sensores de temperatura de la célula de flujo según los ejemplos, no siendo parte de la presente invención, pero no obstante útiles para entender la presente invención.

La figura 13D representa aspectos de las técnicas de eliminación de burbujas de la célula de flujo según los ejemplos, no siendo parte de la invención, pero no obstante útiles para entender la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se refiere a aparatos, sistemas, composiciones y métodos para analizar una muestra que contiene partículas. Las realizaciones que se refieren a composiciones no son parte de la invención reivindicada por la presente. En una realización, la invención se refiere a un sistema de obtención de imágenes de partículas automatizado que comprende un analizador que puede ser, por ejemplo, un analizador visual. En algunas realizaciones, el analizador visual puede comprender además un procesador para facilitar el análisis automatizado de las imágenes.

Según esta divulgación, se proporciona un sistema que comprende un analizador visual para obtener imágenes de una muestra que comprende partículas suspendidas en un líquido. El sistema puede ser útil, por ejemplo, en la caracterización de partículas en fluidos biológicos, tales como detección y cuantificación de eritrocitos, reticulocitos, glóbulos rojos nucleados, plaquetas y glóbulos blancos, incluyendo recuento diferencial, categorización y subcategorización y análisis de glóbulos blancos. También se contemplan otros usos similares tales como caracterización de células sanguíneas de otros fluidos.

La discriminación de células sanguíneas en una muestra de sangre es una aplicación a modo de ejemplo para la que la materia es particularmente adecuada. La muestra se prepara mediante técnicas automatizadas y se presenta a un dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución óptica como una corriente de muestra en forma de cinta delgada de la que se van a obtener imágenes periódicamente mientras que la corriente de muestra en forma de cinta fluye a través de un campo de visión. Las imágenes de las partículas (tales como células sanguíneas) pueden distinguirse entre sí, categorizarse, subcategorizarse y contarse, usando técnicas de procesamiento programado de datos de imágenes de píxeles, o bien exclusivamente de manera automática o bien con asistencia humana limitada, para identificar y contar células o partículas. Además de las imágenes celulares, que pueden almacenarse y hacerse disponibles en el caso de características de partículas inusuales o críticas, los datos de salida incluyen un recuento de las apariciones de cada categoría y/o subcategoría particular de célula o partícula distinguida en las imágenes de muestra registradas.

Los recuentos de las diferentes partículas encontradas en cada imagen pueden procesarse adicionalmente, por ejemplo, usarse para acumular razones precisas y estadísticamente significativas de células de cada categoría y/o

subcategoría distinguida en la muestra como un todo. La muestra usada para discriminación visual puede diluirse, pero las proporciones de células en cada categoría y/o subcategoría se representan en la muestra diluida, particularmente después de que se hayan procesado varias imágenes.

El aparato y métodos dados a conocer en el presente documento son útiles en la discriminación y cuantificación de células en muestras basadas en distinciones visuales. La muestra puede ser una muestra biológica, por ejemplo, una muestra de fluido corporal que comprende glóbulos blancos, incluyendo sin limitación, sangre, suero, médula ósea, líquido de lavado, derrames, exudados, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido peritoneal y líquido amniótico. En algunas realizaciones, la muestra puede ser una muestra de tejido sólido, por ejemplo, una muestra de biopsia que se ha tratado para producir una suspensión celular. La muestra también puede ser una suspensión obtenida del tratamiento de una muestra fecal. Una muestra también puede ser una muestra de laboratorio o de línea de producción que comprende partículas, tales como una muestra de cultivo celular. El término muestra puede usarse para referirse a una muestra obtenida de un paciente o laboratorio o cualquier fracción, porción o alícuota de la misma. La muestra puede diluirse, dividirse en porciones, o teñirse en algunos procesos.

En un aspecto, los sistemas y métodos de esta divulgación proporcionan imágenes de sorprendentemente alta calidad de células en un flujo. En un aspecto, el analizador visual puede usarse en métodos de esta divulgación para proporcionar recuento diferencial automatizado de WBC basado en imágenes. En determinadas realizaciones, los métodos de esta divulgación se refieren a la identificación automatizada de distinciones visuales, incluyendo características y/o anomalías morfológicas para determinar, diagnosticar, pronosticar, predecir y/o respaldar un diagnóstico de si un sujeto está sano o tiene una enfermedad, estado, anomalía y/o infección y/o responde o no al tratamiento. El sistema puede comprender además un contador de partículas en algunas realizaciones. Las aplicaciones incluyen categorizar y/o subcategorizar, y contar células en una muestra de fluido, tal como una muestra de sangre. También se contemplan otros usos similares para contar tipos de partículas y/o partículas adicionales en otras muestras de fluido. El sistema, las composiciones y los métodos de esta invención pueden usarse para categorización y subcategorización en tiempo real y visualización de imágenes usando cualquier algoritmo de reconocimiento de partículas automatizado adecuado. Las imágenes capturadas para cada muestra pueden almacenarse para visualizarse en una fecha posterior.

En otro aspecto, el aparato, las composiciones y los métodos de esta invención proporcionan sorprendentemente categorización y subcategorización más precisa de células basadas en imágenes y marcaje que reduce la tasa de revisión manual en comparación con la tasa de revisión manual cuando se usan analizadores automatizados actuales. Los sistemas, las composiciones y los métodos reducen la tasa de revisión manual y permiten que la revisión manual se realice en el instrumento. Además, los sistemas, las composiciones y los métodos de esta divulgación también reducen el porcentaje de muestras marcadas durante el análisis automatizado como que requieren revisión manual.

La presente divulgación se refiere además a sistemas, métodos y composiciones para combinar un contador de recuento de células sanguíneas completo (CBC) con un analizador, tal como un analizador visual, con el fin de obtener un CBC y un recuento diferencial de glóbulos blancos expandidos basado en imágenes y un recuento de plaquetas expandidas basado en imágenes, extendiendo de ese modo el rango de detección eficaz para contar plaquetas.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un aparato y un método para analizar una muestra que contiene partículas, por ejemplo, células sanguíneas. Según esta divulgación, se proporciona un analizador visual para obtener imágenes de una muestra que comprende partículas suspendidas en un líquido. En algunos ejemplos, no siendo parte de la presente invención, pero no obstante útiles para entender la presente invención, el analizador visual comprende una célula de flujo y un componente de autoenfoco, en el que una muestra de líquido que contiene partículas de interés se hace fluir a través de una célula de flujo que tiene una ventana de observación mediante la cual una cámara acoplada a una lente objetivo captura imágenes digitales de partículas. La célula de flujo se acopla a una fuente de fluido de muestra, tal como una muestra de sangre diluida y/o tratada u otra muestra de fluido corporal tal como se describe en el presente documento, y a una fuente de un fluido envolvente transparente, o líquido de alineación de partículas y/u orgánulos intracelulares (PIOAL).

En un ejemplo, no siendo parte de la presente invención, pero no obstante útil para entender la presente invención, el aparato también comprende un contador de partículas que tiene al menos un rango de detección, así como un analizador, y un procesador. El analizador y el procesador están configurados para proporcionar información adicional para corregir los errores de recuento, categorización y subcategorización asociados con el contador de partículas, y determinan además un recuento de partículas preciso o concentración de diferentes categorías y/o subcategorías de partículas en la muestra.

La presente divulgación proporciona métodos y composiciones útiles para el alineamiento de partículas y/u orgánulos intracelulares en la realización de análisis de muestras basado en imágenes. En algunos ejemplos, no siendo parte de la presente invención, pero no obstante útiles para entender la presente invención, esta divulgación se refiere a métodos y composiciones para un sistema de recuento y obtención de imágenes combinado con la capacidad de realizar un recuento de células sanguíneas completo (CBC) y un recuento diferencial de glóbulos

blancos expandido basado en imágenes (WBC) capaz de identificar y contar tipo celulares, tales como WBC, RBC y/o plaquetas, incluyendo, por ejemplo, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, reticulocitos, RBC nucleados, blastos, promielocitos, mielocitos o metamielocitos, y para proporcionar información basada en imágenes para morfologías y recuentos de WBC, morfologías y recuentos de glóbulos rojos (RBC) y morfologías y recuentos de plaquetas (PLT).

En otros ejemplos, no siendo parte de la presente invención, pero no obstante útiles para entender la presente invención, esta divulgación se refiere a un PIOAL que puede usarse en análisis de partículas basado en imágenes tal como se describe en el presente documento. Se usa recuento de categoría y/o subcategoría celular en muestras de sangre en esta divulgación como ejemplos no limitativos del tipo de muestras que puede analizarse. En algunas realizaciones, las células presentes en muestras también pueden incluir células bacterianas o fúngicas así como glóbulos blancos, glóbulos rojos y/o plaquetas. En algunas realizaciones, pueden analizarse suspensiones de partículas obtenidas de tejidos o aspirados.

La discriminación de células sanguíneas en una muestra de sangre es una aplicación a modo de ejemplo para la que la materia es particularmente adecuada. La muestra se prepara mediante técnicas automatizadas y se presenta a un dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución óptica como una corriente de muestra en forma de cinta de la que van a obtenerse imágenes periódicamente mientras la muestra fluye a través de un campo de visión. Las imágenes de las partículas (tales como células sanguíneas) pueden distinguirse entre sí, categorizarse, subcategorizarse y/o contarse, usando técnicas de procesamiento programado de datos de imágenes de píxeles, o bien de manera exclusivamente automática o bien con asistencia humana limitada, para identificar y contar células o partículas. Además de las imágenes celulares, que pueden almacenarse y hacerse disponibles en el caso de características inusuales o críticas, los datos de salida incluyen un recuento de las apariciones de cada categoría y/o subcategoría particular de célula o partícula distinguida en las imágenes de muestra registradas. Los recuentos de las diferentes partículas encontradas en cada imagen pueden procesarse adicionalmente, por ejemplo usarse para acumular razones proporcionales precisas y estadísticamente significativas, o funciones de las mismas de células de cada categoría y/o subcategoría distinguida en la muestra como un todo. La muestra usada para discriminación visual también puede estar muy diluida, pero las proporciones de células en cada categoría y/o subcategoría se representan en la distribución para la muestra diluida, particularmente después de que se hayan procesado varias imágenes.

En algunos aspectos, las muestras se presentan, se les obtienen imágenes y se analizan de manera automatizada. En el caso de muestras de sangre, la muestra puede diluirse sustancialmente con un diluyente o disolución salina adecuados, que reduce el grado al que la visión de algunas células puede estar escondida por otras células en una muestra no diluida o menos diluida. Las células pueden tratarse con agentes que potencian el contraste de algunos aspectos celulares, por ejemplo usando agentes de permeabilización para hacer las membranas celulares permeables, y que los tintes histológicos se adhieran y para revelar características, tales como gránulos y el núcleo. En algunas realizaciones, puede ser deseable teñir una alícuota de la muestra para contar y caracterizar partículas que incluyen reticulocitos, glóbulos rojos nucleados y plaquetas, y para caracterización y análisis diferencial de glóbulos blancos. En otras realizaciones, las muestras que contienen glóbulos rojos pueden diluirse antes de la introducción en la célula de flujo y obtención de imágenes.

Los detalles de los aparatos y métodos de preparación de muestra para dilución, permeabilización y tinción histológica de muestras, se logran generalmente usando válvulas y bombas de precisión operadas por uno o más controladores programables, y no son fundamentales para esta divulgación. Pueden encontrarse ejemplos en patentes asignadas a International Remote Imaging Systems, Inc., tales como el documento US 7.319.907, que se refiere a controladores programables. Asimismo, pueden encontrarse técnicas para distinguir entre determinadas categorías y/o subcategorías celulares por sus atributos tales como tamaño relativo y color en el documento US 5.436.978 en relación con glóbulos blancos.

Para facilitar la capacidad, velocidad y efectividad por las que partículas tales como células se categorizan y/o subcategorizan, resulta ventajoso proporcionar imágenes nítidas de alta calidad de las células sanguíneas para análisis automatizado mediante el sistema de procesamiento de datos. Según la presente divulgación, una corriente de muestra preparada se dispone en una cinta delgada que tiene una posición estable entre paredes opuestas de una célula de flujo. La colocación de la corriente de muestra y su aplanamiento para dar una forma de cinta delgada pueden lograrse mediante flujo entre capas de un PIOAL introducido en la célula de flujo que difiere en viscosidad del fluido de muestra y se hace fluir a través de un canal de flujo simétrico.

El PIOAL tiene una viscosidad y densidad adecuadas, y las velocidades de flujo en el punto de introducción en la célula de flujo de la muestra son tales que el fluido de muestra se aplanan para dar una cinta delgada. La corriente de muestra en forma de cinta se transporta con el PIOAL, para pasar en frente de un puerto de visualización en el que están dispuestas una lente objetivo y una fuente de luz para permitir visualizar la corriente de muestra en forma de cinta. El fluido de muestra se introduce, por ejemplo, inyectado en un punto en el que la trayectoria de flujo del PIOAL se estrecha de manera simétrica. Como resultado, la corriente de fluido de muestra se aplanan y se estira para dar una cinta delgada. Puede usarse un PIOAL como fluido envolvente con cualquier analizador visual de esta divulgación. En una realización, el PIOAL puede introducirse en un extremo de la célula de flujo para transportar el

fluido de muestra hacia la descarga.

La dimensión de la corriente de muestra en forma de cinta en la zona de visualización está afectada por adelgazamiento geométrico de la trayectoria de flujo de PIOAL y velocidad lineal diferencial del fluido de muestra y PIOAL que da como resultado adelgazamiento y estiramiento de la corriente de muestra en forma de cinta. La velocidad lineal diferencial inicial de la muestra con respecto a PIOAL puede oscilar entre 0,5:1 y 5:1. La sección transversal de la trayectoria de flujo de PIOAL puede adelgazarse reduciendo la profundidad en un factor de aproximadamente 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90:1, 95:1, 100:1, 105:1, 110:1, 115:1, 125:1, 130:1, 140:1, 150:1, 160:1, 170:1, 180:1, 190:1 o 200:1. En una realización, el adelgazamiento geométrico es de 40:1. En una realización, el adelgazamiento geométrico es de 30:1. Factores tenidos en cuenta son tiempo de tránsito a través de la célula de flujo, tasa deseada de rendimiento de muestra, lograr un grosor de corriente de muestra en forma de cinta comparable con el tamaño de partícula, obtener un alineamiento de partículas y orgánulos, lograr contenido de enfoque de partículas, equilibrar la presión, flujo y viscosidad dentro de límites operativos, optimizar el grosor de corriente de muestra en forma de cinta, obtener una velocidad lineal deseada, consideraciones de fabricación y volúmenes de muestra y PIOAL requeridos.

La longitud y el volumen de la cánula y el aplanamiento de la sección transversal pueden seleccionarse para reducir el período de inestabilidad de flujo de muestra, aumentando de ese modo el rendimiento. En algunas realizaciones, el período de inestabilidad de flujo puede ser inferior a aproximadamente 3, 2,75, 2,5, 2,25, 2, 1,75, 1,5, 1,25, o inferior a aproximadamente 1 segundo. Un volumen de cánula más pequeño también puede reducir el tiempo y el volumen del diluyente necesario para limpiar la cánula entre ejecuciones de muestra. En algunas realizaciones, el tiempo de tránsito a través de la célula de flujo es de 1, 2, 3 ó 4 segundos, o cualquier intervalo entre dos de esos tiempos cualesquiera. En algunas realizaciones, el tiempo de tránsito puede ser inferior a 4, 3 ó 2 segundos.

Las viscosidades y las velocidades de flujo del fluido de muestra y el PIOAL y el contorno de la célula de flujo están dispuestos de modo que el flujo de PIOAL aplan y estira el flujo de muestra para dar una cinta plana de manera constante a través de la zona de visualización en una ubicación fiable. La corriente de fluido de muestra puede comprimirse hasta de aproximadamente 2 a 3 μm en grosor de flujo de fluido. Varios tipos de células sanguíneas tienen diámetros mayores que el grosor de corriente. Fuerzas de corte en la dirección paralela a la dirección del flujo provocan un aumento de una proyección de imagen de las partículas en condiciones de obtención de imágenes en el plano focal del dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución óptica y/o provocan que las estructuras intraparticulares, por ejemplo, estructuras, orgánulos o lóbulos intracelulares se posicionen, se reposicionen y se posicionen mejor para ser sustancialmente paralelos a la dirección de flujo. La profundidad de campo del dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución óptica es de hasta 7 μm , por ejemplo, 1-4 μm .

La sección transversal del PIOAL, con la corriente de muestra en forma de cinta transportada, es constante a través de una zona de visualización frente a un puerto de visualización a través del cual se dirige la lente objetivo. La lente objetivo puede ser el componente de objetivo de un dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución óptica o el dispositivo de captura de imágenes digital. La corriente de muestra en forma de cinta sigue una trayectoria a lo largo de la zona de visualización en una posición conocida y repetible dentro de la célula de flujo, por ejemplo, a una distancia conocida y repetible de dos paredes de la célula de flujo, que se descarga a aguas abajo.

La información óptica de las partículas en la muestra se detecta mediante una sección de detección en el analizador, cuando la corriente de muestra en forma de cinta se transporta a través de la zona de visualización delante del puerto de visualización, generando de ese modo datos a partir de las partículas/células contenidas en la muestra. El uso de este analizador permite la captura, el procesamiento, la categorización y la subcategorización y el recuento de células y/o partículas contenidas en muestras. El líquido PIOAL puede prepararse mediante la adición de agente de modificación de la viscosidad, agente de tampón, agente de ajuste del pH, agente antimicrobiano, modificador de la fuerza iónica, tensioactivo y/o un agente quelante. Los componentes y/o características funcionales a modo de ejemplo del analizador en la presente divulgación pueden incluir, por ejemplo, la capacidad de adquirir y/o procesar datos a partir de análisis de imágenes, procesamiento de tinción de muestras, procesamiento de imágenes y/o identificación de imágenes de partículas, recuento, y/o categorización y subcategorización.

En una realización, esta divulgación se basa en el descubrimiento sorprendente e inesperado de que la adición de una cantidad adecuada de un agente de viscosidad en el PIOAL mejora significativamente la alineación de partículas/células en una célula de flujo, lo que conduce a un mayor porcentaje de células enfocadas, o componentes celulares, e imágenes de mayor calidad de células y/o partículas en flujo. La adición del agente de viscosidad aumenta las fuerzas de corte en células como RBC, lo que mejora la alineación de las células en un plano sustancialmente paralelo a la dirección de flujo, lo que da como resultado optimización de imágenes. Esto también da como resultado colocación, recolocación y/o colocación mejor de estructuras intraparticulares tales como estructuras, orgánulos o lóbulos intracelulares sustancialmente paralelos a la dirección de flujo, lo que da como resultado optimización de imágenes. El agente de viscosidad también reduce la desalineación de células, generalmente, pero sin limitarse a células que son más pequeñas en diámetro que la corriente de flujo.

La alineación de células que son más pequeñas en diámetro que la corriente de flujo, por ejemplo, pueden obtenerse glóbulos rojos, por ejemplo, aumentando la viscosidad del PIOAL, o aumentando la razón de velocidad de

flujo. Esto da como resultado la alineación de los RBC paralela a la dirección del flujo y al plano focal FP (por ejemplo, tal como se representa en la figura 4K). En algunas realizaciones, se logra una reducción en la desalineación de RBC y/o aumento en la alineación de RBC aumentando la viscosidad del PIOAL.

El grosor de la corriente de muestra en forma de cinta puede verse afectado por las viscosidades relativas y velocidades de flujo del fluido de muestra y el PIOAL. La fuente de la muestra y/o la fuente del PIOAL, por ejemplo que comprende bombas de desplazamiento de precisión, pueden configurarse para proporcionar la muestra y/o el PIOAL a velocidades de flujo controlables para optimizar las dimensiones de la corriente de muestra en forma de cinta, concretamente como una cinta delgada al menos tan ancha como el campo de visión del dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución óptica o el dispositivo de captura de imágenes digital.

La sección transversal del PIOAL, con la corriente de muestra en forma de cinta que se transporta, es constante a través de una zona de visualización delante de un puerto de visualización a través del cual el dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución óptica se dirige. La corriente de muestra en forma de cinta sigue una trayectoria a lo largo de la zona de visualización a una distancia conocida y repetible de cualquiera de las paredes delantera y trasera de la célula de flujo, que se descarga aguas abajo de esa.

El término dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución óptica puede incluir dispositivos que pueden obtener imágenes de partículas con suficientes distinciones visuales para diferenciar características y/o cambios morfológicos. Los dispositivos de obtención de imágenes de alta resolución óptica a modo de ejemplo pueden incluir dispositivos con una resolución óptica de 1 μm o menos, incluyendo, por ejemplo, de 0,4 a 0,5 μm , tal como por ejemplo, 0,46 μm .

En algunas realizaciones, las imágenes obtenidas en cualquiera de las composiciones y/o métodos de esta invención pueden ser imágenes digitalizadas. En algunas realizaciones, las imágenes obtenidas son imágenes de microscopía. En determinadas realizaciones, las imágenes pueden obtenerse manualmente. En otras realizaciones, al menos parte del procedimiento para obtener las imágenes está automatizado. En algunas realizaciones, las imágenes pueden obtenerse usando un analizador visual que comprende una célula de flujo, un dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución óptica o el dispositivo de captura de imágenes digital, opcionalmente con una característica de autoenfoque.

En una realización, las imágenes proporcionan información relacionada con los componentes citosólicos, de núcleo celular y/o nucleares de la célula. En una realización, las imágenes proporcionan información relacionada con el componente granular y/u otras características morfológicas de la célula. En una realización, las imágenes proporcionan información relacionada con componentes citosólicos, nucleares y/o granulares de la célula. Las imágenes y/o características granulares y/o nucleares son determinantes para la categorización y subcategorización celular tanto independientemente o en combinación entre sí.

En un aspecto de los métodos de esta invención, las células puestas en contacto con una composición de agente de contraste de partículas y/o de las que se han obtenido imágenes son glóbulos rojos nucleados. En aún otro aspecto, los métodos de esta invención se refieren a un método para realizar categorización y subcategorización de glóbulos rojos basados en imágenes que comprende: a) obtener imágenes de una porción de los glóbulos rojos; y b) determinar la morfología de los glóbulos rojos de los que se han obtenido imágenes. Tal como se usa en el presente documento, los glóbulos rojos (RBC) pueden incluir, por ejemplo, células infectadas por malaria, glóbulos rojos nucleados, reticulocitos, y/o glóbulos rojos normales u anómalos. En algunas realizaciones, la obtención de imágenes se realiza usando el aparato de esta divulgación tal como un aparato que comprende un contador de partículas, un analizador visual y un procesador.

Tal como se usa en el presente documento, un recuento de células sanguíneas completo (CBC) a modo de ejemplo puede incluir un panel de prueba solicitado normalmente por un médico u otro profesional médico que proporciona información sobre las partículas y/o células en una muestra de sangre del paciente. Las células a modo de ejemplo que circulan en el torrente sanguíneo pueden dividirse generalmente en tres tipos: incluyendo pero sin limitarse, por ejemplo, glóbulos blancos (por ejemplo, leucocitos), glóbulos rojos (por ejemplo, eritrocitos) y plaquetas (por ejemplo, trombocitos).

Tal como se usa en el presente documento, recuentos anómalamente altos o bajos pueden indicar la presencia de enfermedad, trastorno y/o estado. Por tanto, un CBC es uno de los análisis de sangre comúnmente realizados en medicina, ya que puede proporcionar una visión general del estado de salud general de un paciente. Por consiguiente, un CBC se realiza rutinariamente durante exámenes físicos anuales.

Tal como se usa en el presente documento, normalmente un flebotomista recoge la muestra de sangre del sujeto, la sangre se extrae generalmente a un tubo de ensayo que contiene normalmente un anticoagulante (por ejemplo, EDTA, a veces citrato) para evitar que se coagule. La muestra se transporta entonces a un laboratorio. A veces la muestra se extrae de un pinchazo en el dedo usando una pipeta Pasteur para procesamiento inmediato mediante un contador automático. En una realización, la imagen de partículas se adquiere mientras que la partícula se envuelve en un fluido envolvente o PIOAL. En determinadas realizaciones, la muestra de sangre puede visualizarse sobre un

portaobjetos preparado con una muestra de la sangre del paciente bajo un microscopio (una película de sangre, o frotis periférico). En determinadas realizaciones, el recuento de células sanguíneas completo se realiza mediante un analizador automatizado.

5 Tal como se usa en el presente documento, en general, los analizadores de sangre pueden aspirar una cantidad muy pequeña de la muestra a través de un tubo estrecho. Los sensores pueden detectar el recuento y/o el número de células que pasan a través del tubo, y pueden identificar el tipo de célula. Los sensores a modo de ejemplo pueden incluir detectores de luz (por ejemplo, visible, UV o IR) y/o impedancia eléctrica. Los parámetros de detección a modo de ejemplo pueden incluir tamaño, volumen y/o características celulares. En determinadas realizaciones, los sensores pueden detectar luz visible y no visible en un espectro de longitud de onda que oscila entre aproximadamente 200 nm y aproximadamente 10000 nm. En determinadas realizaciones, los sensores pueden detectar una longitud de onda de entre 380 nm y aproximadamente 760 nm,

15 Tal como se usa en el presente documento, los datos/parámetros de un recuento sanguíneo puede incluir, por ejemplo, glóbulos rojos totales; hemoglobina, la cantidad de hemoglobina en la sangre; hematocrito o volumen de eritrocitos (PCV); volumen corpuscular medio (MCV), el volumen promedio de los glóbulos rojos (la anemia se clasifica como microcítica o macrocítica basándose en si este valor está por encima o por debajo del intervalo normal esperado. Otros estados que afectan al MCV incluyen talasemia, reticulocitosis y alcoholismo); hemoglobina corpuscular media (MCH), la cantidad promedio de hemoglobina por glóbulo rojo, en picogramos; concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), la concentración promedio de hemoglobina en las células; amplitud de distribución de glóbulos rojos (RDW), la variación en el volumen celular de la población de RBC; glóbulos blancos totales; granulocitos neutrófilos (puede indicar infección bacteriana, normalmente aumentada en infecciones virales agudas). Debido al aspecto segmentado del núcleo, los neutrófilos a veces se denominan "segs". El núcleo de neutrófilos menos maduros no está segmentado, pero tiene una banda o forma alargada. Los neutrófilos menos maduros, aquellos que se han liberado recientemente de la médula ósea al torrente sanguíneo, se conocen como "bandas". Otros datos/parámetros para un recuento sanguíneo también pueden incluir, por ejemplo, linfocitos (por ejemplo, aumentados con algunas infecciones virales tales como fiebre glandular, y en leucemia linfocítica crónica (LLC), o disminuidos por infección por VIH); monocitos (pueden aumentarse en infección bacteriana, tuberculosis, malaria, fiebre maculosa de las Montañas Rocosas, leucemia monocítica, colitis ulcerosa crónica y enteritis regional; 20 granulocitos eosinófilos (por ejemplo, aumentados en infecciones parasitarias, asma o reacción alérgica); granulocitos basófilos (por ejemplo, aumentados en estados relacionados con la médula ósea tales como leucemia o linfoma).

25 Tal como se usa en el presente documento, los datos/parámetros de un recuento sanguíneo también pueden incluir, por ejemplo, datos asociados con plaquetas, incluyendo números de plaquetas, información sobre su tamaño y el intervalo de tamaños en la sangre; volumen plaquetario medio (MPV), una medición del tamaño promedio de plaquetas.

30 En otro aspecto de los métodos de esta invención, las células puestas en contacto con una composición de agente de contraste de partículas y/o de las que se han obtenido imágenes son células anómalas, tales como células infectadas por malaria, linfocitos atípicos. En algunos aspectos de esta invención, las células son células anómalas que pueden usarse para identificar, predecir, diagnosticar, pronosticar o respaldar un diagnóstico de un estado, enfermedad, infección y/o síndrome.

35 En otro aspecto de los métodos de esta invención, las células son plaquetas.

40 A menos que se indique expresamente lo contrario, las referencias a "partícula" o "partículas" realizadas en esta divulgación, se entenderá que abarcan cualquier objeto diferenciado o formado disperso en un fluido. Tal como se usa en el presente documento, "partícula" puede incluir cualquier componente medible y detectable (por ejemplo, mediante imagen y/u otros parámetros medibles) en fluidos biológicos. Las partículas son de cualquier material, cualquier forma y cualquier tamaño. En determinadas realizaciones, las partículas pueden comprender células. Los ejemplos de partículas incluyen pero no se limitan a células, incluyendo células sanguíneas, células fetales, epiteliales, células madre, células tumorales, o bacterias, parásitos, o fragmentos de cualquiera de lo anterior u otros fragmentos en un fluido biológico. Las células sanguíneas puede ser cualquier célula sanguínea, incluyendo cualquier célula normal o anómala, madura o inmadura que existe potencialmente en un fluido biológico, por ejemplo, glóbulos rojos (RBC), glóbulos blancos (WBC), plaquetas (PLT) y otras células. Los miembros también incluyen células inmaduras o anómalas. Los WBC inmaduros pueden incluir metamielocitos, mielocitos, promielocitos y blastos. Además de RBC maduros, los miembros de RBC pueden incluir RBC nucleados (NRBC) y reticulocitos. Las PLT pueden incluir PLT "gigantes" y grupos de PLT. Células sanguíneas y elementos formados se describen adicionalmente en otra parte en esta divulgación.

45 Las partículas a modo de ejemplo pueden incluir elementos formados en muestras de fluidos biológicos, incluyendo por ejemplo, partículas esféricas y no esféricas. En determinadas realizaciones, las partículas pueden comprender componentes no esféricos. La proyección de imágenes de componentes no esféricos puede maximizarse en el plano focal del dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución óptica. En determinadas realizaciones, las partículas no esféricas se alinean en el plano focal del dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución

óptica (alineado en un plano sustancialmente paralelo a la dirección del flujo). En algunas realizaciones, se cuentan y se analizan plaquetas, reticulocitos, RBC nucleados y WBC, incluyendo neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, e WBC inmaduros incluyendo blastos, promielocitos, mielocitos, o metamielocitos como partículas.

5 Tal como se usa en el presente documento, los parámetros de partículas detectables y medibles pueden incluir, por ejemplo, índices visuales y/o no basados en imágenes de tamaño, forma, simetría, contorno y/u otras características.

10 La muestra puede ser una muestra biológica aislada y/o preparada, incluyendo por ejemplo, una muestra de fluido corporal, sangre, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido peritoneal, saliva, semen, lágrimas, sudor, sangre, líquido amniótico, líquido de lavado, aspirado de médula ósea, derrames, exudados, u otra muestra obtenida de un sujeto (por ejemplo, muestra de biopsia que se ha tratado para producir una suspensión celular, o una muestra de laboratorio o de línea de producción que comprende partículas). En algunas realizaciones, la muestra
15 puede ser una muestra de tejido sólido, por ejemplo, una muestra de biopsia que se ha tratado para producir una suspensión celular. La muestra también puede ser una suspensión obtenida del tratamiento de una muestra fecal. Una muestra también puede ser una muestra de laboratorio, química, industrial o de línea de producción que comprende partículas, tales como una muestra de cultivo celular. El término muestra puede usarse para referirse a una muestra obtenida de un paciente o laboratorio o cualquier fracción, porción o alícuota de la misma. La muestra
20 puede diluirse, dividirse en porciones, o tratarse con un agente de contraste en algunos procesos.

Los métodos dados a conocer en el presente documento pueden aplicarse a muestras de una amplia variedad de organismos, incluyendo mamíferos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos), caballos, vacas u otro ganado, perros, gatos u otros mamíferos mantenidos como mascotas, ratas, ratones, u otros
25 animales de laboratorio; aves, por ejemplo, pollos; reptiles, por ejemplo, caimanes; peces, por ejemplo, salmón y otras especies de piscicultura; y anfibios.

Las muestras pueden obtenerse mediante cualquier método convencional, por ejemplo, excreción, extracción, recogida, aspirado, o una biopsia. La muestra puede ser de un sujeto que se considera que es sano, por ejemplo,
30 una muestra recogida como parte de un examen físico de rutina. La muestra también puede ser de un sujeto que padece, que corre el riesgo o que se sospecha que padece un trastorno. El trastorno puede ser el resultado de una enfermedad, una anomalía genética, una infección, una lesión u otras causas desconocidas. Alternativamente o además, los métodos pueden ser útiles para monitorizar un sujeto durante el transcurso de tratamiento para un trastorno. Cuando existen signos de no respuesta a tratamiento y/o terapia, un médico puede escoger un agente
35 alternativo o complementario. Según el estado del sujeto y el trastorno particular, si lo hay, pueden recogerse muestras una vez (o dos veces, tres veces, etc.) al día, a la semana, al mes o al año.

Las partículas pueden variar según la muestra. Las partículas pueden ser células biológicas, por ejemplo, células sanguíneas, células fetales, células madre, células tumorales o fragmentos de las mismas. En algunas realizaciones,
40 las partículas pueden ser un agente infeccioso, por ejemplo, un virus o bacteria.

La referencia a "células sanguíneas" realizada en esta divulgación se entenderá que abarca cualquier célula normal o anómala, madura o inmadura que existe potencialmente en un fluido biológico, por ejemplo, glóbulos rojos (RBC), glóbulos blancos (WBC), plaquetas (PLT) y otras células. En general, RBC, PLT y WBC normales tienen un diámetro
45 de partícula en el intervalo de 6-8 μm , 2-3 μm y 8-15 μm , respectivamente. Están presentes RBC, PLT y WBC normales en muestras de sangre completa de pacientes normales en un intervalo de concentración aproximado de 3,9-5,7 $\times 10^{12}$ células/l, 1,4-4,5 $\times 10^{11}$ células/l, 3,5-11 $\times 10^9$ células/l, respectivamente. Véase, Barbara J. Bain, Blood Cells, A Practical Guide, 4ª ed., Blackwell Publishing, 2007, 34-36.

La referencia a un "elemento formado" se entenderá que abarca elementos no fluidos presentes en muestras de fluidos biológicos. Los elementos formados incluyen, por ejemplo, clases de células sanguíneas basadas en clasificación científica o función fisiológica incluyendo eritrocitos (RBC), leucocitos (WBC) y plaquetas (PLT), grupos de WBC, subclases de leucocitos, que incluyen linfocitos maduros, y leucocitos inmaduros tales como monocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos. Los "elementos formados" para su uso en el presente documento también incluirán
55 partículas tales como microorganismos, bacterias, hongos, parásitos, o fragmentos de los mismos u otros fragmentos celulares. Los miembros principales de WBC incluyen pero no se limitan a neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos. Los miembros también incluyen células inmaduras o anómalas. Por ejemplo, los WBC inmaduros pueden incluir metamielocitos, mielocitos, promielocitos. Además de RBC maduros, los miembros de RBC pueden incluir RBC nucleados (NRBC) y reticulocitos. Las PLT pueden incluir PLT normales, y PLT "gigantes" cuyo tamaño es próximo al de WBC normales. La referencia a un "miembro" o "miembros" de una categoría y/o subcategoría de partículas realizada en esta divulgación se entenderá que abarca partículas
60 individuales dentro de una categoría o subcategoría de partículas.

A menos que se indique expresamente lo contrario, la referencia a una "categoría" de partículas realizada en esta divulgación, se entenderá que abarca un grupo de partículas detectado usando al menos un criterio de detección medido, detectado o derivado tal como tamaño, forma, textura, o color. En algunas realizaciones, los miembros de al

menos una categoría y/o subcategoría de partículas contadas por el aparato de esta divulgación serán el mismo tipo de elemento formado.

Tales partículas pueden detectarse en un "canal." La referencia a "canal" realizada en esta divulgación, se entenderá que abarca una porción del contador de partículas que comprende un detector acoplado a una fuente de señal, proporcionando una salida que varía con mayor o menor detección de partículas que cumplen al menos un criterio de detección de canal. Por ejemplo, un criterio de detección de canal puede basarse en el tamaño o volumen de las partículas. En algunas realizaciones, el número de canales en un contador de partículas es uno. En algunas otras realizaciones, el número de los canales en un contador de partículas es dos o más.

Una categoría y/o subcategoría de partículas detectadas en un canal de contador de partículas puede comprender diferentes clases y subclases de partículas, y miembros agrupados de partículas en dos o más subclases. La referencia a una "categoría" de partículas realizada en esta divulgación se entenderá que abarca un agrupamiento de partículas correspondiente a criterios medidos, detectados o derivados tales como tamaño, forma, textura o color. En algunas realizaciones, los miembros de al menos una categoría y/o subcategoría de partículas contadas por el aparato de esta divulgación serán el mismo tipo de elemento formado.

Tal como se usa en el presente documento, el término dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución óptica puede incluir dispositivos que pueden obtener imágenes de partículas con suficientes distinciones visuales para diferenciar características y/o cambios morfológicos. Los dispositivos de obtención de imágenes de alta resolución óptica a modo de ejemplo pueden incluir dispositivos con una resolución óptica de 1 um o menos, incluyendo, por ejemplo, de 0,4 a 0,5 um, tal como por ejemplo, 0,46 um.

Tal como se usa en el presente documento, las composiciones de agente de contraste de partículas pueden adaptarse para su uso en combinación con un líquido de alineación de partículas y/u orgánulos intracelulares (PIOAL) en un analizador visual para analizar partículas en una muestra de un sujeto. El PIOAL a modo de ejemplo es útil, como ejemplo, en métodos para reconocimiento automatizado de diferentes tipos de partículas en una muestra de un sujeto.

En otro aspecto, las células pueden envolverse en PIOAL cuando se obtienen imágenes. En el presente documento se describen líquidos de alineación de orgánulos intracelulares a modo de ejemplo adecuados.

Tal como se usa en el presente documento, "alineación" puede caracterizarse en parte por la alineación de partículas esféricas y/o no esféricas. Por ejemplo, partículas tales como partículas no esféricas pueden alinearse en un plano sustancialmente paralelo a la dirección del flujo. En determinadas realizaciones, la alineación de las partículas no esféricas se caracteriza porque la orientación de las partículas aumenta una proyección de imagen de las partículas no esféricas en condiciones de obtención de imágenes en el plano focal del dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución óptica. Partículas tales como partículas esféricas pueden tener un aumento en la cantidad del contenido intraarticular enfocado de las partículas y células que es eficaz para generar distinciones visuales para la categorización y subcategorización de partículas. Las estructuras intraparticulares de partículas tales como partículas esféricas pueden posicionarse, reposicionarse y/o posicionarse mejor para ser sustancialmente paralelas a la dirección de flujo. Por ejemplo, también pueden posicionarse, reposicionarse y/o posicionarse mejor estructuras, orgánulos o lóbulos intracelulares para ser sustancialmente paralelos a la dirección de flujo.

La referencia a una "clase" de partículas realizada en esta divulgación se entenderá que abarca un grupo de partículas basadas en clasificación científica. Por ejemplo, existen tres clases principales de células sanguíneas en una muestra de sangre completa, incluyendo RBC, WBC y PLT.

La referencia a un "miembro" o "miembros" de partículas realizada en esta divulgación se entenderá que abarca partículas en una categoría o subcategoría de partículas. Por ejemplo, cada categoría de células sanguíneas puede dividirse adicionalmente en subcategorías o miembros. Los miembros principales de WBC incluyen pero no se limitan a neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos. Los miembros también incluyen células inmaduras o anómalas. Por ejemplo, los WBC inmaduros pueden incluir metamielocitos, mielocitos y promielocitos. Además de RBC maduros, los miembros de RBC pueden incluir RBC nucleados (NRBC) y reticulocitos. Las PLT pueden incluir PLT normales, y PLT "gigantes" cuyo tamaño es próximo al de WBC normales.

La referencia a "células inmaduras" se entenderá que abarca células en una fase de desarrollo determinada, por ejemplo, dentro de la médula ósea o justo después de la liberación de la médula ósea pero antes del desarrollo completo en una célula madura.

La referencia a "células anómalas" se entenderá que abarca células con características morfológicas irregulares o células asociadas con una determinada enfermedad o estado, o irregularidades asociadas que pueden, en algunos casos, asociarse con determinadas enfermedades o estados. Los ejemplos de enfermedad determinada incluyen pero no se limitan a eritrocitosis, policitemia, anemia, eritroblastopenia, leucocitosis, leucopenia, linfocitosis, linfocitopenia, granulocitosis, granulocitopenia o agranulocitosis, neutrofilia, neutropenia, eosinofilia, eosinopenia,

basofilia, basopenia, trombocitosis, trombocitopenia y pancitopenia. Una clase de células puede aumentar o disminuir en el torrente sanguíneo. En algunos estados, existen células anómalas mucho mayores que glóbulos blancos normales a una pequeña concentración en una muestra de sangre. Variaciones en tamaño, forma, color y/o estructuras intracelulares pueden asociarse con determinadas enfermedades o estados.

La referencia a "recuento" de partículas o "recuento de partículas" realizada en esta divulgación se entenderá que abarca los números de partículas obtenidos de un canal de un contador de partículas. La referencia a "concentración" de una clase o un miembro de partículas realizada en esta divulgación se entenderá que significa los números de las partículas por unidad de volumen (por ejemplo, por litro) o por muestra de un volumen conocido. Por ejemplo, un contador de partículas puede proporcionar recuentos o concentraciones u otra función basada en recuento para categorías de partículas, mientras que un analizador visual puede proporcionar recuentos, concentraciones, razones u otros parámetros basados en concentración para cada categoría o subcategoría de partículas.

La referencia a una "razón" elaborada en esta divulgación se entenderá que abarca cualquier razón cuantitativa y/o proporcional de dos categorías/subcategorías, clases o miembros de partículas. Los ejemplos de una razón de este tipo incluyen pero no se limitan a una razón en concentración, peso, y/o en números de partículas. Normalmente, la razón se refiere a la fracción numérica del recuento de una categoría, clase o miembro a lo largo del recuento de otra categoría, clase o miembro de este tipo. En algunas realizaciones, también pueden realizarse determinaciones usando recuentos ponderados o razones ponderadas y/o proporcionales.

Hematología - sistema de análisis de partículas

Volviendo ahora a los dibujos, la figura 1 muestra esquemáticamente una célula 22 de flujo a modo de ejemplo para transportar un fluido de muestra a través de una zona 23 de visualización de un dispositivo 24 de obtención de imágenes de alta resolución óptica en una configuración para obtener imágenes de partículas microscópicas en una corriente 32 de flujo de muestra usando procesamiento de imágenes digital. La célula 22 de flujo se acopla a una fuente 25 de fluido de muestra que puede haberse sometido a procesamiento, tal como contacto con una composición de agente de contraste de partículas y calentamiento. La célula 22 de flujo también se acopla a una o más fuentes 27 de un líquido de alineación de partículas y/u orgánulos intracelulares (PIOAL), tales como una disolución de glicerol transparente que tiene una viscosidad que es mayor que la viscosidad del fluido de muestra.

El fluido de muestra se inyecta a través de una abertura aplanada en un extremo 28 distal de un tubo 29 de alimentación de muestra, y en el interior de la célula 22 de flujo en un punto donde el flujo de PIOAL se ha establecido sustancialmente dando como resultado un flujo estable y laminar simétrico del PIOAL por encima y por debajo de (o en lados opuestos de) la corriente de muestra en forma de cinta. Las corrientes de muestra y PIOAL pueden suministrarse mediante bombas de medición de precisión que mueven el PIOAL con el fluido de muestra inyectado a lo largo de una trayectoria de flujo que se estrecha sustancialmente. El PIOAL envuelve y comprime el fluido de muestra en la zona 21 en donde la trayectoria de flujo se estrecha. Por tanto, la disminución del grosor de la trayectoria de flujo en la zona 21 puede contribuir a un enfoque geométrico de la corriente 32 de muestra. La cinta 32 de fluido de muestra se envuelve y se transporta con el PIOAL aguas abajo de la zona 21 de estrechamiento, por delante o por el contrario, a través de la zona 23 de visualización del dispositivo 24 de obtención de imágenes de alta resolución óptica donde se recogen las imágenes, por ejemplo, usando un CCD 48. El procesador 18 puede recibir, como entrada, datos de píxeles de CCD 48. La cinta de fluido de muestra fluye junto con el PIOAL a una descarga 33.

Tal como se muestra en este caso, la zona 21 de estrechamiento puede tener una porción de trayectoria de flujo proximal 21a que tiene un grosor proximal PT y una porción 21b de trayectoria de flujo distal que tiene un grosor distal DT, de modo que el grosor distal DT es menor que el grosor proximal PT. El fluido de muestra puede, por tanto, inyectarse a través del extremo 28 distal de tubo 29 de muestra en una ubicación que es distal a la porción proximal 21a y proximal a la porción distal 21b. Por tanto, el fluido de muestra puede entrar en la envoltura de PIOAL puesto que la corriente de PIOAL está comprimida por la zona 21, en el que el tubo de inyección de fluido de muestra tiene un puerto de salida distal a través del que se inyecta un fluido de muestra en un fluido envolvente que fluye, el puerto de salida distal limitado por la disminución del tamaño de la trayectoria de flujo de la célula de flujo.

El dispositivo 24 de obtención de imágenes de alta resolución óptica digital con una lente 46 objetivo se dirige a lo largo de un eje óptico que interseca la corriente 32 de muestra en forma de cinta. La distancia relativa entre el objetivo 46 y la célula 33 de flujo es variable por la operación de un accionamiento 54 de motor, para resolver y recoger una imagen digitalizada enfocada en una matriz de fotosensor.

Según algunas realizaciones, el sistema puede operar hidroenfocando la cinta 32 de fluido de muestra. El término hidroenfoco o hidroenfocar puede referirse a un efecto de enfoque que está influido por una diferencia de viscosidad entre los fluidos envolvente y de muestra, una zona de transición de estrechamiento geométrico de la célula de flujo, y una diferencia de velocidad entre los fluidos envolvente y de muestra. El flujo hidrodinámico resulta de la diferencia de velocidad entre las corrientes de fluido envolvente y de muestra, que al afecta al grosor y forma de la cinta de flujo.

Célula de flujo

Una realización práctica de la célula 22 de flujo se representa adicionalmente en las figuras 2 y 3. Tal como se muestra en este caso, la célula 22 de flujo puede acoplarse con una fuente 25 de muestra y también con una fuente 27 de material de PIOAL. El fluido de muestra se inyecta en la célula 22 de flujo por medio de la cánula 29, por ejemplo a través de un puerto 31 de salida distal de la cánula 29. Normalmente, el fluido envolvente de PIOAL no está en un estado de flujo laminar según se desplaza a través de una sección 41 de canal curvada en la célula de flujo desde la fuente 27 hacia la zona 23 de visualización. Sin embargo, la célula 22 de flujo puede configurarse de modo que el fluido envolvente de PIOAL es o se vuelve laminar, o presenta un perfil de velocidad plano, según fluye pasado el puerto 31 de salida distal donde el fluido de muestra se introduce en el fluido envolvente que fluye. El fluido de muestra y el PIOAL pueden fluir a lo largo de la célula 22 de flujo en una dirección generalmente indicada por la flecha A, y después fuera de la célula 22 de flujo por medio de la descarga 33. La célula 22 de flujo define una trayectoria 20 de flujo interna que se estrecha de manera simétrica (por ejemplo en la zona 21 de transición) en la dirección de flujo A. La simetría de la trayectoria de flujo contribuye a un flujo robusto y centrado de la corriente de muestra. La célula 22 de flujo está configurada para dirigir un flujo 32 de la muestra envuelta con el PIOAL a través de una zona 23 de visualización en la célula de flujo, concretamente detrás del puerto 57 de visualización. Un patrón 44 de autoenfoco está asociado con la ventana 57 de observación. La célula 22 de flujo también tiene un asiento 58 redondeado o rebajado que está configurado para aceptar o recibir un objetivo de microscopio (no mostrado).

Según algunas realizaciones, el patrón 44 de autoenfoco puede tener una posición que está fija en relación con la célula 22 de flujo, y que se ubica a una distancia de desplazamiento desde el plano de la corriente 32 de muestra en forma de cinta. En la realización mostrada en este caso, el patrón de autoenfoco (diana 44) se aplica directamente a la célula 22 de flujo en una ubicación que está visible en una imagen recogida a través de la ventana 57 de observación mediante un dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución óptica (no mostrado). La célula 22 de flujo puede construirse a partir de un único trozo de material. Alternativamente, la célula 22 de flujo puede construirse de una sección primera o superior o capa 22a y una sección segunda o inferior o capa 22b. Tal como se muestra en este caso, un panel 60 de vidrio o ventana transparente se une a o se integra con la primera sección 22a. El panel 60 puede definir al menos una porción de la trayectoria de muestra de flujo dentro de la célula de flujo. La luz de la fuente 42 de luz puede desplazarse a través de una apertura o paso del patrón 44 de autoenfoco para iluminar partículas de muestra que fluyen dentro de la corriente 32 de flujo.

En algunos casos, el grosor del panel 60 puede tener un valor dentro de un intervalo de desde aproximadamente 150 μm hasta aproximadamente 170 μm . Tal como se indicó anteriormente, el panel 60 puede definir o formar parte del envolvente o de la trayectoria de flujo (por ejemplo, PIOAL). Al usar un panel 60 delgado, es posible colocar el objetivo de microscopio muy próximo a la cinta de fluido de muestra, y por tanto obtener imágenes muy aumentadas de partículas que fluyen a lo largo de la trayectoria de fluido.

La figura 3A representa aspectos de una realización de célula de flujo, donde una distancia entre el eje 355 de obtención de imágenes y la porción 316 de zona de transición distal es de aproximadamente 8,24 mm. Una distancia entre la porción 316 de zona de transición distal y el puerto 331 de salida de cánula es de aproximadamente 12,54 mm. Una distancia entre el puerto 331 de salida de cánula y la entrada 301 de fluido envolvente es de aproximadamente 12,7 mm. Una distancia entre el puerto 331 de salida de cánula y una porción 318 de zona de transición proximal es de aproximadamente 0,73 mm. La figura 3B representa aspectos de una realización de célula de flujo donde el puerto de salida de cánula se ha movido hasta una ubicación más distal relativa a la zona de transición, en comparación con la realización de la figura 3A. Tal como se muestra en este caso, el extremo distal de cánula se hace avanzar dentro de la zona de transición de estrechamiento de la célula de flujo, y una distancia entre el eje 355 de obtención de imágenes y la porción 316 de zona de transición distal está dentro de un intervalo de desde aproximadamente 16 mm hasta aproximadamente 26 mm. En algún caso, la distancia entre el eje 355 de obtención de imágenes y la porción 316 de zona de transición distal es de aproximadamente 21 mm.

Volviendo a la referencia a la figura 1, el contorno interno de célula de flujo (por ejemplo, en la zona 21 de transición) y las velocidades de flujo de PIOAL y muestra pueden ajustarse de modo que la muestra se forma dando una corriente 32 en forma de cinta. Esta corriente puede ser aproximadamente tal delgada como o incluso más delgada que las partículas que están envueltas en la corriente de muestra en forma de cinta. Los glóbulos blancos pueden tener un diámetro de aproximadamente 10 μm , por ejemplo. Al proporcionar una corriente de muestra en forma de cinta con un grosor de menos de 10 μm , las células pueden orientarse cuando la corriente de muestra en forma de cinta se estira mediante el fluido envolvente, o PIOAL. Sorprendentemente, el estiramiento de la corriente de muestra en forma de cinta a lo largo de una trayectoria de flujo de estrechamiento dentro de capas de PIOAL de diferente viscosidad que la corriente de muestra en forma de cinta, tal como mayor viscosidad, tiende ventajosamente a alinear partículas no esféricas en un plano sustancialmente paralelo a la dirección de flujo, y aplicar fuerzas en las células, mejorando el contenido enfocado de estructuras intracelulares de células. El eje óptico del dispositivo 24 de obtención de imágenes de alta resolución óptica es sustancialmente normal (perpendicular) al plano de la corriente de muestra en forma de cinta. La velocidad lineal de la corriente de muestra en forma de cinta en el punto de obtención de imágenes puede ser, por ejemplo, de 20-200 mm/segundo. En algunas realizaciones, la velocidad lineal de la corriente de muestra en forma de cinta puede ser, por ejemplo, de 50-150 mm/segundo.

El grosor de la corriente de muestra en forma de cinta puede verse afectado por las viscosidades relativas y velocidades de flujo del fluido de muestra y el PIOAL. La fuente 25 de la muestra y/o la fuente 27 del PIOAL, por ejemplo que comprende bombas de desplazamiento de precisión, puede configurarse para proporcionar la muestra y/o el PIOAL a velocidades de flujo controlables para optimizar las dimensiones de la corriente 32 de muestra en forma de cinta, concretamente como una cinta delgada al menos tan ancha como el campo de visión del dispositivo 24 de obtención de imágenes de alta resolución óptica.

En una realización, la fuente 27 del PIOAL está configurada para proporcionar el PIOAL a una viscosidad predeterminada. Esa viscosidad puede ser diferente que la viscosidad de la muestra, y puede ser mayor que la viscosidad de la muestra. La viscosidad y densidad del PIOAL, la viscosidad del material de muestra, la velocidad de flujo del PIOAL y la velocidad de flujo de la muestra material se coordinan para mantener la corriente de muestra en forma de cinta a la distancia de desplazamiento del patrón de autoenfoco, y con características dimensionales predeterminadas, tales como un grosor de corriente de muestra en forma de cinta ventajoso.

En una realización práctica, el PIOAL tiene una velocidad lineal mayor que la muestra y una viscosidad mayor que la muestra, estirando de ese modo la muestra para dar la cinta plana. La viscosidad de PIOAL puede ser de hasta 10 centipoise.

En referencia también a las figuras 2 y 3, la trayectoria de flujo interna de la célula de flujo se estrecha aguas abajo del punto de inyección de la corriente de muestra en forma de cinta en el PIOAL, para producir un grosor de corriente de muestra en forma de cinta, por ejemplo, de hasta 7 μm , y/o la trayectoria de flujo interna produce un ancho de corriente de muestra en forma de cinta de 500 - 3.000 μm . En realizaciones a modo de ejemplo, tal como se representa en la figura 1, la trayectoria de flujo interna de la célula de flujo comienza una zona de transición de estrechamiento aguas arriba del punto de inyección de la corriente de muestra en el PIOAL.

En otra realización, la trayectoria de flujo interna se estrecha para producir un grosor de la corriente de muestra en forma de cinta de 2 - 4 μm de grosor, y/o la trayectoria de flujo interna de la corriente de muestra en forma de cinta de 2000 μm de ancho. Estas dimensiones son particularmente útiles para hematología. El grosor de la corriente en este caso es menor que el diámetro de algunas partículas, tales como glóbulos rojos en su estado relajado. Por consiguiente, esas partículas pueden volver a orientarse para enfrentarse a su dimensión más amplia con respecto al eje de obtención de imágenes, que es útil para revelar características distintivas.

La velocidad lineal de la corriente de muestra en forma de cinta puede limitarse suficientemente para evitar el desenfoque por movimiento de la imagen digitalizada en el tiempo de exposición de imagen de la matriz de fotosensor. La fuente de luz puede ser opcionalmente una luz electroboscópica que se enciende para aplicar amplitud de amplia incidencia durante un breve periodo de tiempo. Dado que el patrón 44 de autoenfoco y la imagen están en el mismo campo de visión, la fuente de luz está configurada para iluminar la corriente de muestra en forma de cinta y el patrón de autoenfoco simultáneamente. Sin embargo en otras realizaciones, el campo de visión para la obtención de imágenes y para autoenfoco pueden ser diferentes, por ejemplo, iluminarse y/u obtenerse imágenes por separado.

Los desarrollos del objeto tienen aspectos de método así como de aparato. Un método de enfocar un analizador visual no siendo parte de la presente invención, pero no obstante útil para entender la presente invención comprende enfocar un dispositivo 24 de obtención de imágenes de alta resolución óptica, que puede ser un dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución óptica digital o el dispositivo de captura de imágenes digital, en un patrón 44 de autoenfoco fijado en relación con una célula 22 de flujo, en el que el patrón 44 de autoenfoco se ubica a una distancia 52 de desplazamiento desde una corriente 32 de muestra en forma de cinta. El dispositivo 24 de obtención de imágenes de alta resolución óptica digital tiene un objetivo con un eje óptico que interseca la corriente 32 de muestra en forma de cinta. Se varía una distancia relativa entre el objetivo y la célula 22 de flujo mediante operación de un accionamiento 54 de motor, mientras que la distancia a lo largo del eje óptico entre el dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución óptica y el punto de enfoque óptimo se conoce. El dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución óptica digital está configurado para resolver y recoger una imagen digitalizada en una matriz de fotosensor. El accionamiento de motor se opera enfocándose en el patrón de autoenfoco en un proceso de autoenfoco. El accionamiento de motor se opera entonces a lo largo de la distancia de desplazamiento, enfocando de ese modo el dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución óptica sobre la corriente de muestra en forma de cinta.

El método puede incluir además formar la corriente de muestra en forma de cinta para dar una forma de cinta. La forma de cinta se presenta de manera tal que el eje óptico del dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución óptica es sustancialmente perpendicular a la corriente de muestra en forma de cinta, concretamente normal al plano de la corriente en forma de cinta.

La figura 4 representa aspectos de un sistema 400 para obtener imágenes de partículas en una muestra de fluido sanguíneo. Tal como se muestra en este caso, el sistema 400 incluye un sistema 410 de inyección de fluido de muestra, una célula 420 de flujo, y dispositivo 430 de captura de imágenes, y un procesador 440. La célula 420 de

flujo proporciona una trayectoria 422 de flujo que transmite un flujo del fluido envolvente, opcionalmente en combinación con el fluido de muestra. Según algunas realizaciones, el sistema 410 de inyección de fluido de muestra puede incluir o acoplarse con una cánula o tubo 412. El sistema 410 de inyección de fluido de muestra puede estar en comunicación de fluido con la trayectoria 422 de flujo (por ejemplo por medio de la entrada 402 de fluido de muestra), y puede operar inyectando el fluido 424 de muestra a través de un puerto 413 de salida distal de la cánula 412 y en un fluido 426 envolvente que fluye dentro de la célula 420 de flujo para proporcionar una corriente 428 de fluido de muestra. Por ejemplo, el procesador 440 puede incluir o estar en asociación operativa con un medio de almacenamiento que tiene una aplicación informática que, cuando se ejecuta por el procesador, está configurada para hacer que el sistema 410 de inyección de fluido de muestra inyecte el fluido 424 de muestra en el fluido 426 envolvente que fluye. Tal como se muestra en este caso, el fluido 426 envolvente puede introducirse en la célula 420 de flujo mediante un sistema 450 de inyección de fluido envolvente (por ejemplo por medio de la entrada 401 de fluido envolvente). Por ejemplo, el procesador 440 puede incluir o está en asociación operativa con un medio de almacenamiento que tiene una aplicación informática que, cuando se ejecuta por el procesador, está configurada para hacer que el sistema 450 de inyección de fluido envolvente inyecte el fluido 426 envolvente en la célula 420 de flujo.

La corriente 428 de fluido de muestra tiene un primer grosor T1 adyacente al tubo 412 de inyección. La trayectoria 422 de flujo de la célula de flujo que tiene una disminución de la trayectoria de tamaño de flujo de manera tal que el grosor de la corriente 428 de fluido de muestra disminuye desde el grosor inicial T1 hasta un segundo grosor T2 adyacente a un sitio 432 de captura de imágenes. El dispositivo 430 de captura de imágenes está alineado con el sitio 432 de captura de imágenes para obtener imágenes de una primera pluralidad de las partículas del primer fluido de muestra en el sitio 432 de captura de imágenes de la célula 420 de flujo.

El procesador 440 está acoplado con el sistema 410 inyector de fluido de muestra, el dispositivo 430 de captura de imágenes, y opcionalmente el sistema 450 de inyección de fluido envolvente. El procesador 440 está configurado para terminar la inyección del primer fluido de muestra en el fluido 426 envolvente que fluye y empezar la inyección del segundo fluido de muestra en el fluido 426 envolvente que fluye de modo que se inician transitorios de fluido de muestra. Por ejemplo, el procesador 440 puede incluir o estar en asociación operativa con un medio de almacenamiento que tiene una aplicación informática que, cuando se ejecuta por el procesador, está configurada para hacer que el sistema 410 de inyección de fluido de muestra inyecte el segundo fluido de muestra en el fluido 426 envolvente que fluye de modo que se inician transitorios de fluido de muestra.

Además, el procesador 440 está configurado para iniciar la captura de una imagen de una segunda pluralidad de las partículas del segundo fluido de muestra en el sitio 432 de captura de imágenes de la célula 420 de flujo después de los transitorios de fluido de muestra y en el plazo de 4 segundos de la obtención de imágenes de la primera pluralidad de las partículas. Por ejemplo, el procesador 440 también puede incluir o estar en asociación operativa con un medio de almacenamiento que tiene una aplicación informática que, cuando se ejecuta por el procesador, está configurada para hacer que el dispositivo 430 de captura de imágenes inicie la captura de una imagen de una segunda pluralidad de las partículas del segundo fluido de muestra en el sitio 432 de captura de imágenes de la célula 420 de flujo después de los transitorios de fluido de muestra y en el plazo de cuatro segundos de la obtención de imágenes de la primera pluralidad de las partículas.

Tal como se muestra en la realización de célula de flujo representada en la figura 4A, una disminución del tamaño de la trayectoria de flujo (por ejemplo en una zona 419a de transición) puede definirse por paredes 421a, 423a opuestas de la trayectoria 422a de flujo. Las paredes 421a, 423a opuestas pueden inclinarse radialmente hacia dentro a lo largo de la trayectoria 422a de flujo, generalmente simétrica sobre un plano 451a transversal que biseca la corriente 428a de fluido de muestra. El plano 451a puede bisecar la corriente 428a de muestra donde la corriente de muestra tiene un primer grosor T1, en una ubicación donde la corriente 428a de muestra sale de una porción 427a distal de la cánula o tubo 412a de inyección de muestra. De manera similar, el plano 451a puede bisecar la corriente 428a de muestra donde la corriente de muestra tiene un segundo grosor T2, en una ubicación en la que la corriente 428a de muestra pasa por el sitio 432a de captura de imágenes. Según algunas realizaciones, el primer grosor T1 tiene un valor de aproximadamente 150 μm y el segundo grosor T2 tiene un valor de aproximadamente 2 μm . En tales casos, la razón de compresión de la corriente de cinta de muestra es de 75:1. Según algunas realizaciones, el primer grosor T1 tiene un valor dentro de un intervalo de desde aproximadamente 50 μm hasta aproximadamente 250 μm y el segundo grosor T2 tiene un valor dentro de un intervalo de desde aproximadamente 2 μm hasta aproximadamente 10 μm . Dado que el fluido de corriente de muestra fluye a través de la célula de flujo, la cinta se afina a medida que se acelera y se estira. Dos características de la célula de flujo pueden contribuir al afinamiento de la cinta de fluido de muestra. En primer lugar, una diferencia de velocidad entre la envoltura de fluido envolvente y la cinta de fluido de muestra puede funcionar reduciendo el grosor de la cinta. En segundo lugar, la geometría de sección transversal decreciente de la zona de transición puede funcionar reduciendo el grosor de la cinta.

Tal como se representa en la figura 4A (así como en las figuras 4 y 4B-1), la zona 419a de transición puede definirse por transiciones angulares en las porciones proximal (415a) y distal (416a). También se entiende que la zona 419a de transición puede en su lugar presentar transiciones lisas o curvas en las porciones proximal (415a) y distal

(416a), similar a las transiciones lisas o curvas tal como se representa en las figuras 1, 3, 3A, 3B y 4B-2).

Normalmente, el primer grosor T1 es mucho mayor que el tamaño de las partículas de muestra, y por tanto las partículas están contenidas completamente dentro de la corriente de cinta de muestra. Sin embargo, el segundo grosor T2 puede ser más pequeño que el tamaño de determinadas partículas de muestra, y por tanto esas partículas pueden extenderse fuera del fluido de muestra y al interior del fluido envolvente circundante. Tal como se muestra en la figura 4A, la corriente de cinta de muestra puede fluir generalmente a lo largo del mismo plano a medida que sale de la cánula y se desplaza hacia el sitio de captura de imágenes.

La célula de flujo también puede proporcionar una distancia 430a de separación entre la porción 427a de la cánula distal y el sitio 432a de captura de imágenes. Según algunas realizaciones, la porción 427a distal del tubo 412a de inyección de fluido de muestra puede colocarse a una distancia 430a de separación axial desde el sitio 432a de captura de imágenes, donde la distancia 432a de separación axial tiene un valor de aproximadamente 21 mm. En algunos casos, la distancia 430a de separación axial tiene un valor dentro de un intervalo de desde aproximadamente 16 mm hasta aproximadamente 26 mm.

La distancia 430a de separación axial entre el puerto de salida de cánula y el sitio de captura de imágenes puede tener un impacto en el tiempo de transición para el fluido de muestra a medida que el fluido se desplaza desde el puerto de salida hasta el sitio de captura de imágenes. Por ejemplo, una distancia 430 de separación axial relativamente más corta puede contribuir a un tiempo de transición más corto, y una distancia 430 de separación axial relativamente más larga puede contribuir a un tiempo de transición más largo.

La posición del puerto de salida en la porción 427a de cánula distal en relación con la zona 419a de transición de trayectoria de flujo, o en relación con la porción 415a proximal de la zona 419a de transición de trayectoria de flujo, puede influir también en el tiempo de transición para el fluido de muestra a medida que el fluido se desplaza desde el puerto de salida hasta el sitio de captura de imágenes. Por ejemplo, el fluido envolvente puede tener una velocidad relativamente más lenta en la porción 415a proximal, y una velocidad relativamente más rápida en una ubicación entre la porción 415a proximal y la porción 416a distal. Por tanto, si el puerto de salida de cánula en la porción 427a distal se coloca en la porción 415a proximal, el fluido de muestra tardará más tiempo en alcanzar el sitio de captura de imágenes, no sólo porque la distancia de desplazamiento es mayor, sino también porque la velocidad inicial del fluido de muestra después de que salga del puerto de la cánula distal es menor (debido a la velocidad de fluido envolvente más lenta). Dicho de otra forma, cuanto más tiempo esté presente el fluido de muestra en la porción más gruesa (por ejemplo cerca de la porción 415a proximal) de la célula de flujo, más tiempo tardará la muestra en alcanzar el sitio de captura de imágenes. A la inversa, si el puerto de salida de cánula en la porción 427a distal se coloca de manera distal a la porción 415a proximal (por ejemplo en una ubicación central entre la porción 415a proximal y la porción 416a distal, tal como se representa en la figura 4A), el fluido de muestra tardará menos tiempo en alcanzar el sitio de captura de imágenes, no sólo porque la distancia de desplazamiento es menor, sino también porque la velocidad inicial del fluido de muestra después de que salga del puerto de la cánula distal es más rápida (debido a la velocidad de fluido envolvente más rápida). Tal como se comenta en otra parte en el presente documento, el fluido envolvente se acelera a medida que fluye a través de la zona 419a de transición, debido al estrechamiento del área de sección transversal de la zona 419a.

Según algunas realizaciones, con un tiempo de transición más corto, hay más tiempo disponible para la recogida de imágenes en el sitio de captura de imágenes. Por ejemplo, a medida que disminuye la duración del tiempo de transición desde la punta distal de la cánula hasta el área de obtención de imágenes, es posible procesar más muestras en una cantidad específica de tiempo, y de manera relacionada es posible obtener más imágenes en una cantidad específica de tiempo (por ejemplo, imágenes por minuto).

Aunque existen ventajas asociadas con la colocación del puerto de salida de la porción 427a de cánula distal más cerca del sitio 432a de captura de imágenes, también es deseable mantener una determinada distancia entre el puerto y el sitio de captura. Por ejemplo, tal como se representa en la figura 3, un objetivo óptico o lente frontal de un dispositivo de obtención de imágenes puede colocarse en el asiento 58 de la célula 22 de flujo. Si el puerto 31 de salida de la cánula está demasiado cerca del asiento 58, entonces el fluido de muestra puede no estabilizarse lo suficiente después de que se inyecte en el fluido envolvente para proporcionar las propiedades de obtención de imágenes deseadas en el sitio de captura de imágenes. De manera similar, puede ser deseable mantener la región 21 de transición de sección transversal decreciente a una distancia de la zona 23 de visualización, de modo que la región de sección transversal decreciente no interfiera con la colocación del asiento 58 que recibe el objetivo del dispositivo de captura de imágenes.

Continuando con la referencia a la figura 4A, el extremo 427a posterior del tubo 412a de inyección de fluido de muestra puede colocarse distal a una porción 415a proximal de la zona 419a de transición de trayectoria de flujo. De manera relacionada, el extremo 427a posterior del tubo 412a de inyección de fluido de muestra puede colocarse proximal a una porción 416a distal de la zona 419a de transición de trayectoria de flujo. Por tanto, según algunas realizaciones, el fluido de muestra puede inyectarse desde la cánula 412a de inyección y en la célula de flujo en una ubicación dentro de la zona 419a de transición.

Según algunas realizaciones, la simetría en la disminución del tamaño de la trayectoria de flujo (por ejemplo en la zona 419a de transición de trayectoria de flujo) funciona limitando la desalineación de partículas en la muestra de fluido sanguíneo. Por ejemplo, tal simetría puede ser eficaz para limitar la desalineación de la orientación de la obtención de imágenes de glóbulos rojos en la muestra de fluido sanguíneo hasta menos de aproximadamente el 20%.

Según algunas realizaciones, los métodos dados a conocer en el presente documento pueden funcionar a la tasa de señalización durante el análisis de recuento sanguíneo hasta por debajo del 30%, el 29%, el 28%, el 27%, el 26%, el 25%, el 24%, el 23%, el 22%, el 21%, el 20%, el 19%, el 18%, el 17%, el 16%, el 15%, el 14%, el 13%, el 12%, el 11%, el 10%, el 9%, el 8%, el 7%, el 6% o el 5% de las muestras.

Según algunas realizaciones, el sitio 432a de captura de imágenes tiene un campo 433a de visión de entre aproximadamente $150\text{ }\mu\text{m} \times 150\text{ }\mu\text{m}$ y $400\text{ }\mu\text{m} \times 400\text{ }\mu\text{m}$. En algunos casos, el sitio 432a de captura de imágenes tiene un campo 433a de visión de aproximadamente $275\text{ }\mu\text{m} \times 275\text{ }\mu\text{m}$. En algunos casos, el campo de visión puede definirse en cuanto a longitud por ancho. Si se expresa como área superficial, un campo de visión de $275\text{ }\mu\text{m} \times 275\text{ }\mu\text{m}$ tiene un área de $75,625\text{ }\mu\text{m}^2$. Según algunas realizaciones, el campo de visión puede determinarse mediante el objetivo del dispositivo de obtención de imágenes y su aumento. En algunos casos, el campo de visión puede corresponderse con la extensión del campo (área) de la que se obtienen imágenes mediante la óptica de recogida (por ejemplo objetivo, lente tubular y cámara). En algunos casos, el campo de visión es mucho más pequeño que el puerto de visualización de área transparente en el sitio de captura de imágenes.

Las figuras 4A-1 y 4A-2 ilustran los efectos del hidrofoco sobre la corriente de muestra a medida que se desplaza desde el puerto de salida de cánula hasta el sitio de captura de imágenes. Tal como se muestra en la figura 4A-1, la corriente de muestra puede tener una altura H(S) de aproximadamente $150\text{ }\mu\text{m}$ y un ancho W(S) de aproximadamente $1350\text{ }\mu\text{m}$. Además, la corriente envolvente de PIOAL puede tener una altura H(P) de aproximadamente $6000\text{ }\mu\text{m}$ y un ancho W(P) de aproximadamente $4000\text{ }\mu\text{m}$. Posteriormente al hidrofoco, tal como se muestra en la figura 4A-2, la corriente de muestra puede tener una altura H(S) de aproximadamente $2\text{ }\mu\text{m}$ y un ancho W(S) de aproximadamente $1350\text{ }\mu\text{m}$. Además, la corriente envolvente de PIOAL puede tener una altura H(P) de aproximadamente $150\text{ }\mu\text{m}$ y un ancho W(P) de aproximadamente $4000\text{ }\mu\text{m}$. En una realización, el área de sección transversal de la corriente envolvente de PIOAL en la salida de cánula es 40 veces mayor que el área de sección transversal próxima al sitio de captura de imágenes.

Según algunas realizaciones, puede ser útil determinar la sección transversal del canal de célula de flujo en el sitio de captura de imágenes. Esto puede corresponderse con la altura de corriente envolvente de PIOAL H(P) de aproximadamente $150\text{ }\mu\text{m}$ y un ancho W(P) de aproximadamente $4000\text{ }\mu\text{m}$ tal como se representa en la figura 4A-2. También puede ser útil determinar la velocidad de flujo volumétrico del fluido de muestra y envolvente combinados que fluyen a través de la célula de flujo en el sitio de captura de imágenes. Cuando el área de sección transversal y la velocidad de flujo se conocen, es posible determinar la velocidad del fluido de muestra y envolvente combinados en el sitio de captura de imágenes.

Según algunas realizaciones, el flujo de los fluidos de muestra y envolvente a través de la célula de flujo puede aproximarse con un modelo de perfil de placa paralela. De manera relacionada, la velocidad de flujo en el centro de la corriente de fluido de muestra (por ejemplo tal como se representa en la figura 4A-2), puede ser de aproximadamente 1,5 veces la velocidad de flujo promedio de la corriente de fluido de muestra y envolvente combinados.

Según algunas realizaciones, el área de sección transversal del flujo de muestra en la salida de cánula (por ejemplo W(S) x H(S) en la figura 4A-1) es 40 veces mayor que el área de sección transversal del flujo de muestra en el sitio de obtención de imágenes (por ejemplo W(S) x H(S) en la figura 4A-2). La velocidad de flujo volumétrico de fluido envolvente en el área de obtención de imágenes puede ser de aproximadamente $45\text{ }\mu\text{l/segundo}$. La velocidad de flujo volumétrico de fluido de muestra en el área de obtención de imágenes puede ser de aproximadamente $0,232\text{ }\mu\text{l/segundo}$. En algunos casos, el área de sección transversal de las corrientes de muestra y envolventes combinadas en el sitio de obtención de imágenes es de $600.000\text{ }\mu\text{m}^2$. En algunos casos, la velocidad de corriente de flujo promedio en el sitio de obtención de imágenes es de 75 mm/segundo .

La velocidad o tasa de flujo puede determinarse como la velocidad que da como resultado imágenes celulares nítidas y enfocadas. Las velocidades y tasas de flujo a modo de ejemplo se descubrieron basándose en velocidades de flujo de las dos muestras que se observó que lograban determinadas formas o características de cinta de corriente de flujo de muestra en el sitio de obtención de imágenes. Por ejemplo, a una velocidad de flujo de aproximadamente 75 mm/s (o dentro de un intervalo de $20\text{--}200\text{ mm/s}$), las células no fluyen demasiado lento de modo que hay superposiciones de células en imágenes consecutivas, y las células no fluyen demasiado rápido de modo que se crean efectos de imagen fantasma (imagen borrosa). De manera relacionada, evitando velocidades de flujo excesivamente altas, es posible conservar más reactivo y muestra. Según algunas realizaciones, puede lograrse una velocidad lineal deseada u óptima o bien cambiando el flujo volumétrico (velocidad de bombeo) o bien la forma de la cánula.

La velocidad de flujo de la corriente de muestra a través de la zona de captura de imágenes también puede estar relacionada con el rendimiento del dispositivo de captura de imágenes en relación con la función de la célula de flujo. Por ejemplo, si la corriente de muestra fluye demasiado rápido, puede ser difícil obtener imágenes nítidas de partículas contenidas en la muestra (por ejemplo la velocidad de obturación del dispositivo de captura de imágenes puede ser demasiado baja, produciendo de ese modo una imagen borrosa). De manera similar, si la corriente de muestra fluye demasiado lento, el dispositivo de captura de imágenes puede obtener imágenes consecutivas de la misma partícula (por ejemplo, la misma partícula permanece en el fotograma de captura durante dos capturas de imagen). En algunas realizaciones, la velocidad de la cinta de muestra puede modularse (por ejemplo, ajustando cualquiera de una variedad de los parámetros operativos de la célula de flujo) en relación con la velocidad de captura de imágenes, de modo que existe un flujo mínimo entre capturas de fotogramas, y por tanto, se obtienen imágenes de un alto porcentaje de la muestra.

Según algunas realizaciones, el sistema de análisis de partículas y los componentes asociados pueden estar configurados de modo que a medida que el fluido envolvente y la muestra de fluido fluyen a través de la célula de flujo, el fluido envolvente puede fluir a una velocidad volumétrica de fluido envolvente de 45 $\mu\text{l/s}$ y la muestra de fluido puede fluir a una velocidad de flujo volumétrico de muestra de flujo de 0,232 $\mu\text{l/s}$ (o dentro de un intervalo de desde 0,2 hasta 0,35 $\mu\text{l/s}$). En algunos casos, la razón de la velocidad de flujo de fluido envolvente con respecto a la velocidad de flujo de fluido de muestra es de aproximadamente 200. En algunos casos, la razón de la velocidad de flujo de fluido envolvente con respecto a la velocidad de flujo de fluido de muestra tiene un valor dentro de un intervalo de desde aproximadamente 70 hasta 200. En algunos casos, la razón de la velocidad de flujo de fluido envolvente con respecto a la velocidad de flujo de fluido de muestra es de aproximadamente 193. En algunos casos, la razón de la velocidad de flujo de fluido envolvente con respecto a la velocidad de flujo de fluido de muestra es de aproximadamente 70. En algunos casos, una razón de volumen de fluido envolvente con respecto a volumen de muestra de fluido que fluye dentro de la célula de flujo puede estar dentro de un intervalo de desde 25:1 hasta 250:1.

Según algunas realizaciones, el sistema y los componentes asociados pueden estar configurados de modo que a medida que el fluido envolvente y la muestra de fluido fluyen a través de la célula 420 de flujo, el fluido envolvente puede fluir a una velocidad de fluido envolvente de 75 mm/s antes del área de obtención de imágenes y la muestra de fluido puedan fluir a una velocidad de muestra de fluido de 130 mm/s antes del área de obtención de imágenes. En algunos casos, una razón de volumen de fluido envolvente con respecto a volumen de muestra de fluido que fluye dentro de la célula de flujo puede estar dentro de un intervalo de desde 100:1 hasta 200:1.

En algunos casos, una célula de flujo puede tener una razón de compresión mínima de aproximadamente 50:1 y una razón de compresión máxima de aproximadamente 125:1. En algunos casos, la razón de compresión mínima puede ser de aproximadamente 30:1 ó 20:1. Esta razón de compresión se refiere a la razón de los grosores de corriente de flujo $H(S):H(S)$ cuando se compara la figura 4A-1 con la figura 4A-2. Esta razón de compresión puede estar influida por una combinación de compresión geométrica (por ejemplo, la razón de los grosores de fluido envolvente $H(P):H(P)$ cuando se compara la figura 4A-1 con la figura 4A-2, que también puede corresponder generalmente con las dimensiones de la zona 419a de transición de sección transversal decreciente que se estrecha de la célula de flujo mostrada en la figura 4A) y una compresión hidrodinámica (por ejemplo, que también se corresponde con una diferencia en la velocidad). Según algunas realizaciones, la razón de compresión geométrica es de aproximadamente 40:1.

La disminución del tamaño de la trayectoria de flujo, correspondiente a la zona de transición, puede definirse por una porción de trayectoria de flujo proximal que tiene un grosor o altura proximal, y una porción de trayectoria de flujo distal que tiene un grosor o altura distal que es menor que el grosor o altura proximal. Por ejemplo, tal como se muestra en las vistas parciales de las figuras 4B-1 y 4B-2, la zona 419b de transición de la trayectoria de flujo puede tener una longitud L entre una porción 415b proximal y una porción 416b distal, donde la porción 415b proximal tiene una altura 417b proximal, y la porción 416b distal tiene una altura 418b distal. Tal como se representa en la figura 4B-2, y tal como se indica en otra parte en el presente documento, la forma o contorno de la zona de transición puede ser curva o lisa, y por ejemplo puede proporcionarse en forma de una curva en S, una curva sigmoidea o una curva de tangente. Según algunas realizaciones, la altura 417b proximal tiene un valor de aproximadamente 6000 μm . En algunos casos, la altura 417b proximal tiene un valor dentro de un intervalo de desde aproximadamente 3000 μm hasta aproximadamente 8000 μm . Según algunas realizaciones, la altura 418b distal tiene un valor de aproximadamente 150 μm . En algunos casos, la altura 418b distal tiene un valor dentro de un intervalo de desde aproximadamente 50 μm hasta aproximadamente 400 μm .

La geometría de la zona 419a de transición puede proporcionar un primer ángulo α_1 entre el primer límite 403b de trayectoria de flujo y el plano 451b transversal de bisección, y un segundo ángulo α_2 entre el segundo límite 404b de trayectoria de flujo y el plano 451b transversal de bisección. En algunos casos, el ángulo α_1 es de aproximadamente 45 grados y el ángulo α_2 es de aproximadamente 45 grados. En algunos casos, el ángulo α_1 tiene un valor dentro de un intervalo de desde aproximadamente 10 grados hasta aproximadamente 60 grados. En algunos casos, el ángulo α_2 tiene un valor dentro de un intervalo de desde aproximadamente 10 grados hasta aproximadamente 60 grados. Según algunas realizaciones, los ángulos α_1 y α_2 tienen el mismo valor. Los ángulos α_1 y α_2 pueden

seleccionarse de modo que mantienen un flujo laminar o minimizan la turbulencia del fluido de muestra a medida que se desplaza desde la porción 415b proximal hasta la porción 416b distal, lo que a su vez puede potenciar la alineación de partículas dentro de la muestra a lo largo del plano 451b transversal. Tal como se indicó anteriormente con la referencia a la figura 4A, los límites o porciones distales y proximales de la zona de transición pueden ser curvos o lisos, en lugar de en ángulo.

La figura 4C representa características de un tubo 400c de alimentación de muestra o cánula a modo de ejemplo según realizaciones de la presente invención, donde la cánula tiene una longitud L. La figura 4D representa una sección transversal longitudinal de la cánula 400d. Tal como se muestra en este caso, la cánula 400d incluye una sección 410d aplanada distal, una sección 420d de sección transversal decreciente central y una porción 430d tubular proximal. Tal como se representa en la figura 4C-1, un tubo 400c-1 de alimentación de muestra o cánula a modo de ejemplo puede tener una porción 410c-1 distal y una porción 430c-1 proximal. En algunos casos, la porción 410c-1 distal tiene una longitud de aproximadamente 1,359 mm y un ancho de aproximadamente 1,43 mm. En algunos casos, el puerto de salida del extremo distal tiene un ancho de salida W(E) de aproximadamente 1,359 mm. Según algunas realizaciones, una cánula puede tener una geometría de trayectoria de flujo interna que es diferente de lo que se representa en las figuras 4C y 4D. Por ejemplo, tal como se ilustra en la figura 4D-1, la cánula 400d-1 no incluye una sección central de sección transversal decreciente que tiene una sección transversal de área de flujo expandida. Tal como se representa en la figura 4D-1, la cánula 400d-1 tiene una sección 410d-1 distal, una sección 420d-1 de sección transversal decreciente central que tiene un diámetro interno de sección transversal decreciente y una sección 430d-1 proximal. Correspondiente al diámetro interno de sección transversal decreciente de la sección 420d-1 central, el área interna de sección transversal de 410d-1 es más pequeña que el área interna de sección transversal de 430d-1.

La figura 4E ilustra una sección transversal de una sección 410e aplanada distal. Tal como se muestra en este caso, la sección 410e distal tiene un ancho interno W(I) y una altura interna H(I), a través de la cual fluye una corriente de muestra. Además, la sección 410e distal tiene un ancho externo W(O) y una altura externa H(O). Tal como se representa en las figuras 4D y 4E tomadas en combinación, la porción 410e distal del tubo de inyección de fluido de muestra tiene un puerto de salida P que tiene una altura H(I) y un ancho W(I), donde la altura H(I) es menor que el ancho W(I). Según algunas realizaciones, la altura H(I) del puerto de salida P de la porción 410e distal (o la altura interna de la porción 410d distal) puede tener un valor de aproximadamente 150 μm . En algunos casos, la altura H(I) puede estar dentro de un intervalo de desde aproximadamente 50 μm hasta aproximadamente 250 μm . Según algunas realizaciones, el ancho W(I) del puerto de salida P de la porción 410e distal (o el ancho interno de la porción 410d distal) puede tener un valor de aproximadamente 1350 μm . En algunos casos, el ancho es de aproximadamente 1194 μm . En algunos casos, el ancho W(I) puede tener un valor dentro de un intervalo de desde aproximadamente 500 μm hasta aproximadamente 3000 μm . En algunos casos, la sección 410d aplanada distal puede fabricarse aplicando una fuerza de cierre a un tubo o conducto.

La figura 4F ilustra una sección transversal de una sección 420f de sección transversal decreciente central. Tal como se muestra en este caso, la sección 420f de sección transversal decreciente central tiene un diámetro interno D(I) a través del cual fluye una corriente de muestra. Además, la sección 420f de sección transversal decreciente central tiene un diámetro exterior D(O). La figura 4G ilustra una sección transversal de una sección 430g proximal. Tal como se muestra en este caso, la sección 430g proximal tiene un diámetro interno D(I) a través del cual fluye una corriente de muestra. Además, la sección 430g distal tiene un diámetro exterior D(O).

Tal como se representa en la figura 4D, el tubo o cánula 400d de inyección puede tener una porción 430d proximal que tiene una primera área de sección transversal de flujo (por ejemplo $\pi(D/2)^2$ mostrada en la figura 4G), una porción 410d distal que tiene una segunda área de sección transversal de flujo (por ejemplo $W(I)*H(I)$ mostrada en la figura 4E) que es menor que la primera área de sección transversal de flujo y una tercera porción 420d dispuesta entre la porción 430d proximal y la porción 410d distal. La tercera porción 420d puede tener una tercera sección transversal de flujo (por ejemplo $\pi(D/2)^2$ mostrada en la figura 4F) que es mayor que las secciones transversales de flujo primera y segunda. En algunos casos, el diámetro exterior D(O) de la porción 430g proximal es de aproximadamente 1067 μm y el diámetro interno D(I) de la porción 430g proximal es de aproximadamente 813 μm .

Según algunas realizaciones, una porción proximal de un tubo de inyección puede acoplarse con un puerto de muestra de un accesorio de entrada de muestra. Por ejemplo, tal como se muestra en la figura 4H, una porción 405h proximal de una cánula 400h puede acoplarse directamente a un puerto 410h de muestra en una salida de un accesorio 420h de entrada de muestra.

Una célula de flujo de un sistema para obtener imágenes de partículas en una muestra de fluido sanguíneo puede orientarse en cualquier ángulo o dirección deseado en relación con la dirección de la fuerza de gravedad. Por ejemplo, una célula de flujo puede orientarse en una dirección hacia arriba, de modo que el fluido que fluye dentro de la célula de flujo (por ejemplo fluido envolvente, opcionalmente en combinación con fluido de muestra) puede desplazarse en una dirección hacia arriba, contra la fuerza de gravedad. Asimismo, una célula de flujo puede orientarse en una dirección hacia abajo, de modo que el fluido que fluye dentro de la célula de flujo (por ejemplo fluido envolvente, opcionalmente en combinación con fluido de muestra) puede desplazarse en una dirección hacia

abajo, con la fuerza de gravedad. La figura 4I representa una célula 420i de flujo orientada en una dirección hacia arriba, de modo que el fluido 424i de muestra y el fluido 426i envolvente que fluyen dentro de la célula 420i de flujo fluyen contra la gravedad G. La figura 4J representa una célula 420j de flujo orientada en una dirección hacia abajo, de modo que el fluido 424j de muestra y el fluido 426j envolvente que fluyen dentro de la célula 420j de flujo no fluyen contra la gravedad G, sino que más bien fluyen con la gravedad G.

Tal como se muestra en la figura 4K, una cinta de corriente de muestra R que fluye a través de un sitio 432k de captura de imágenes de una célula 420k de flujo puede tener un grosor T de aproximadamente 2 μm . En algunos casos, el grosor T de la cinta de corriente de muestra puede ser de hasta aproximadamente 3 μm . Normalmente, las células o partículas que son más pequeñas que el grosor de corriente de muestra, estarán contenidas dentro de la cinta. Un glóbulo rojo (RBC) a modo de ejemplo puede estar presente como un disco bicóncavo y puede tener un diámetro D de entre aproximadamente 6,2 μm y aproximadamente 8,2 μm . Además, un glóbulo rojo a modo de ejemplo puede tener un grosor máximo T1 de entre aproximadamente 2 μm y aproximadamente 2,5 μm y un grosor mínimo T2 de entre aproximadamente 0,8 μm y aproximadamente 1 μm . En algunos casos, los glóbulos rojos pueden tener un grosor de hasta aproximadamente 3 μm . Las plaquetas humanas a modo de ejemplo pueden variar en tamaño, y también pueden tener un grosor o diámetro de aproximadamente 2 μm . Aunque no se muestra a escala en este caso, la célula de flujo puede definir un grosor de trayectoria de flujo F que tiene un valor de aproximadamente 150 μm , en el sitio de captura de imágenes. En algunos casos, el grosor de trayectoria de flujo F tiene un valor de entre 50 μm y 400 μm . Este grosor de trayectoria de flujo F también se corresponde con la altura 418b distal de la porción 461b distal representada en las figuras 4B-1 y 4B-2.

Tal como se muestra en la figura 4K, la razón del grosor T de la corriente de fluido de muestra con respecto al grosor de la partícula (glóbulo rojo) es de aproximadamente 1:1. Según algunas realizaciones, una razón del grosor T de la corriente de fluido de muestra en el sitio de captura de imágenes con respecto a un tamaño de una de las partículas está dentro de un intervalo de desde 0,25 hasta 25. En algunos casos, el grosor T puede tener un valor dentro de un intervalo de desde 0,5 μm hasta 5 μm .

Tal como se comentó en otra parte en el presente documento, las diferencias de viscosidad entre el fluido de la cinta de muestra R y el fluido envolvente pueden funcionar alineando u orientando partículas en la corriente de muestra, por ejemplo glóbulos rojos, a lo largo de la dirección del flujo. Cuando están así alineados, tal como se muestra en la figura 4K, el dispositivo de obtención de imágenes o cámara puede obtener imágenes de los glóbulos rojos de manera que aparecen redondos, debido a que la superficie principal de la célula sanguínea está orientada hacia la cámara. De este modo, el glóbulo rojo asume una alineación que presenta una baja resistencia en relación con el flujo. Por tanto, las características de viscosidad relativa del fluido envolvente y el fluido de muestra pueden contribuir a un alto porcentaje o número de glóbulos rojos que se orientan hacia la cámara, potenciando por tanto la capacidad de evaluación del sistema de análisis de partículas.

Según algunas realizaciones, las características de viscosidad del fluido envolvente funcionan limitando la desalineación de partículas en la muestra de fluido sanguíneo. Por ejemplo, los diferenciales de viscosidad pueden ser eficaces para limitar la desalineación de la orientación de imágenes de glóbulos rojos en la muestra de fluido sanguíneo hasta menos de aproximadamente el 10%. Es decir, 90 o más glóbulos rojos de 100 glóbulos rojos en una muestra pueden alinearse de modo que sus superficies principales se orientan hacia el dispositivo de obtención de imágenes. Una zona de transición en estrechamiento simétrica puede proporcionar un valor del 20%. Tal como se comenta en otra parte en el presente documento, por ejemplo con referencia a la figura 4R, es posible comparar los resultados de alineación obtenidos a partir de una configuración de analizador que implica una zona de transición de células de flujo en estrechamiento simétrica y un fluido envolvente viscoso con los resultados de alineación obtenidos a partir de una configuración de analizador que implica una zona de transición de células de flujo en estrechamiento simétrica sin el uso de un fluido envolvente viscoso. El uso de un fluido envolvente viscoso puede reducir el porcentaje de células desalineadas. Según algunas realizaciones, el fluido envolvente tiene un índice de refracción similar al del agua (es decir $n=1,3330$). En algunos casos, el fluido envolvente tiene un contenido en agua de aproximadamente el 89%. Además de los efectos de alineación observados como resultado del diferencial de viscosidad, también se observan efectos de alineación como resultado de una zona de transición de sección transversal decreciente bilateral. En algunos casos, se observa que una zona de transición de sección transversal decreciente bilateral (es decir, simétrica) es dos veces más eficaz alineando partículas que en comparación con un diseño de zona de transición de sección transversal decreciente asimétrica.

La alineación eficaz de los glóbulos rojos puede contribuir a un diagnóstico mejorado. En algunos casos, la forma de los glóbulos rojos de los que se han obtenido imágenes puede usarse para determinar si un paciente del que se obtiene la muestra tiene una enfermedad o estado fisiológico particular. Por ejemplo, pacientes con drepanocitosis presentan células sanguíneas que tienen una forma anómala (es decir, en la forma de un drepanocito). Por tanto, obteniendo imágenes de alta calidad de glóbulos rojos alineados, es posible garantizar un diagnóstico preciso. Pueden obtenerse imágenes eficazmente de otras variaciones de forma de los glóbulos rojos, por ejemplo glóbulos rojos que tienen un área periférica delgada y un área central plana grande, mediante lo cual el glóbulo rojo parece tener el perfil de un neumático de bicicleta, usando las presentes técnicas de alineación. De manera similar, pueden obtenerse imágenes de glóbulos rojos que tienen una porción central pequeña y un área periférica gruesa, mediante

lo cual el glóbulo rojo parece tener un perfil de un neumático de camión, para fines de diagnóstico. Las técnicas de obtención de imágenes mejoradas dadas a conocer en el presente documento son también útiles para evaluar otras características de glóbulos rojos, tales como contenido en hemoglobina, contenido en hierro, y similares.

5 Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, se cree que un alto diferencial de viscosidad entre la viscosidad del fluido envolvente y la viscosidad del fluido de muestra produce un perfil parabólico modificado, en el que el perfil es generalmente parabólico y tiene una protuberancia central correspondiente a un área central del flujo en donde la aceleración aumenta, y la protuberancia central contribuye a la alineación de partículas de muestra o orgánulos dentro de las partículas. Según algunas realizaciones, la diferencia de velocidad entre la cinta de muestra y
10 envolvente y la diferencia de viscosidad generan fuerzas de corte que aumentan la alineación de los orgánulos o partículas intracelulares.

Los glóbulos blancos son normalmente más grandes que los glóbulos rojos y las plaquetas. Por ejemplo, neutrófilos y eosinófilos a modo de ejemplo pueden tener un diámetro de entre aproximadamente 10 μm y aproximadamente
15 12 μm . Basófilos a modo de ejemplo pueden tener un diámetro de entre aproximadamente 12 μm y aproximadamente 15 μm . Linfocitos a modo de ejemplo (pequeños) pueden tener un diámetro de entre aproximadamente 7 μm y aproximadamente 8 μm , y linfocitos a modo de ejemplo (grandes) pueden tener un diámetro de entre aproximadamente 12 μm y aproximadamente 20 μm . La configuración del sistema de análisis de partículas, incluyendo la interacción entre el fluido envolvente y la cinta de muestra de fluido a medida que pasa a
20 través de la célula de flujo, puede funcionar comprimiendo los glóbulos blancos a medida que se desplazan a través del sitio 4321 de captura de imágenes, tal como se indica en la figura 4L. Por tanto, por ejemplo, una porción distal del glóbulo blanco (WBC) puede situarse dentro del cinta de fluido de muestra R, y porciones periféricas del glóbulo blanco pueden situarse dentro del fluido envolvente. Por tanto, a medida que el glóbulo blanco se transporta a través de la célula de flujo mediante la cinta, los lados del glóbulo blanco pueden extenderse dentro del fluido envolvente. Los valores numéricos o intervalos para el grosor T de la cinta de corriente de muestra R, y el grosor F de la trayectoria de flujo tal como se comentó anteriormente con respecto a la figura 4K son de manera similar aplicables a la figura 4L.

Según algunas realizaciones, las diferencias de viscosidad entre el fluido envolvente y el fluido de muestra pueden funcionar alineando los orgánulos u otras características intracelulares que están presentes dentro de células tales como glóbulos blancos. Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, se cree que fuerzas de corte asociadas con el diferencial de viscosidad entre el fluido envolvente y el fluido de muestra pueden actuar sobre los glóbulos blancos para alinear las características intracelulares. En algunos casos, fuerzas de corte asociadas con
35 diferenciales de velocidad entre el fluido envolvente y fluido de muestra pueden contribuir a tal alineación. Estos efectos de alineación pueden verse afectados por un diferencial de tamaño entre las partículas y la cinta de fluido de muestra también. Por ejemplo, cuando porciones de las partículas se extienden fuera de la cinta de fluido de muestra y dentro del fluido envolvente circundante, las fuerzas de corte asociadas con la diferencia de viscosidad pueden tener un efecto pronunciado sobre la alineación de características intracelulares.

Con referencia a las figuras 4K y 4L, en algunos, casos porciones de la célula o partícula pueden extenderse fuera de la cinta de fluido de muestra delgada R y dentro del fluido envolvente circundante. El fluido envolvente puede contener protectores celulares que inhiben o impiden que el fluido envolvente rompa o lise las células o partículas. Por ejemplo, el fluido envolvente puede contener protectores celulares que conservan la integridad estructural de las
45 paredes celulares a medida que las células se exponen al entorno químico del fluido envolvente. De manera similar, los protectores celulares pueden funcionar también conservando la integridad estructural de las paredes celulares a medida que las células experimentan cualquier fuerza de corte inducida por la geometría de la célula de flujo, y una diferencia de velocidad y/o viscosidad entre el fluido de muestra y el fluido envolvente. De manera relacionada, los protectores pueden proteger a las células o partículas de fuerzas resultantes de la diferencia de velocidad entre el fluido de muestra y fluido envolvente. De este modo, las células conservan su viabilidad cuando alcanzan el sitio de
50 captura de imágenes.

Las fuerzas de corte pueden ser significativas en la superficie de contacto entre la cinta de fluido de muestra y la envoltura de fluido envolvente. Según algunas realizaciones, el flujo dentro de la trayectoria de flujo de la célula de
55 flujo puede caracterizarse por un perfil de flujo parabólico. La figura 4L-1 representa aspectos a modo de ejemplo de perfiles 4001-1a y 4001-1b de flujo parabólicos. El perfil 4001-1a parabólico en el panel superior es un perfil de velocidad típico encontrado en flujos dentro de determinadas realizaciones de célula de flujo de la presente invención (por ejemplo, cuando hay poco o ningún diferencial de viscosidad entre una corriente de flujo de fluido de muestra que está envuelta dentro de una corriente de flujo de fluido envolvente). Tal como puede observarse, se observa la velocidad lineal más alta en el medio de la corriente de fluido y se observan velocidades lineales más lentas cerca de la pared de célula de flujo. El perfil 4001-1a también puede observarse en una corriente de fluido con una ligera diferencia de viscosidad entre los fluidos envolvente y de muestra. En un caso en el que hay un alto diferencial de viscosidad entre las corrientes de fluido y envolvente, se observa una protuberancia central tal como se muestra en el perfil 4001-1b, en donde hay un área central localizada con velocidades lineales amplificadas.
65 Según algunas realizaciones, las partículas que tienen un tamaño suficientemente grande se someterán a la misma

cantidad de fuerza de corte, incluso cuando tales partículas están completamente contenidas dentro de una única fase de fluido (es decir, o bien dentro de la envoltura de fluido envolvente, o bien alternativamente dentro de la cinta de fluido de muestra).

- 5 En algunos casos, la velocidad del fluido envolvente puede ser diferente de la velocidad del fluido de muestra. Por ejemplo, el fluido envolvente puede desplazarse a 80 mm/segundo y el fluido de muestra puede desplazarse a 60 mm/segundo. Por tanto, en algunos casos, el fluido de muestra sale del puerto de cánula distal a una velocidad de fluido de muestra que es más lenta que la velocidad de fluido envolvente de la envoltura circundante. Por tanto, el fluido envolvente puede funcionar arrastrando el fluido de muestra a lo largo de la trayectoria de flujo de la cánula, acelerando así el fluido de muestra y reduciendo el grosor de la cinta de fluido de muestra. La cinta de fluido de muestra mantiene la masa y volumen globales, de modo que a medida que se desplaza más rápido se vuelve más delgada. Según algunas realizaciones, tanto el fluido envolvente como el fluido de muestra tienen una velocidad de entre aproximadamente 20 y 200 mm/segundo en el sitio de captura de imágenes.
- 10
- 15 Normalmente, la velocidad del fluido de muestra aumenta a medida que el fluido de muestra se desplaza desde el puerto de salida de la cánula hasta el sitio de captura de imágenes. En algunos casos, la velocidad del fluido de muestra en el sitio de captura de imágenes es 40 veces la velocidad del fluido de muestra cuando sale del puerto de la cánula en la porción distal de la cánula. Según algunas realizaciones, la disminución en el área de sección transversal de la cinta de muestra es lineal para el aumento de velocidad. Según algunas realizaciones, si la velocidad de la cinta envolvente a la salida de la cánula es mayor que la velocidad de cinta de muestra, esto aumentará también la velocidad final de la cinta de muestra en el área de obtención de imágenes.
- 20

- El fluido envolvente puede funcionar aplicando fuerzas de corte significativas sobre la cinta de fluido de muestra y sobre partículas dentro de la cinta de fluido de muestra. Algunas fuerzas son paralelas a la dirección de flujo, y las partículas pueden encontrar también fuerzas que son perpendiculares a la dirección de flujo. A menudo, a medida que el fluido envolvente y el fluido de muestra se aproximan al sitio o zona de captura de imágenes, los fluidos de muestra y envolvente están desplazándose a o casi la misma velocidad. Por tanto, el límite o superficie de contacto entre los fluidos de muestra y envolvente cuando pasan por el sitio de captura de imágenes pueden presentar fuerzas de corte inferiores, en comparación con el límite o superficie de contacto en el puerto de salida de la cánula distal o en la zona de transición de sección transversal decreciente. Por ejemplo, en la zona de transición de sección transversal decreciente, el límite o superficie de contacto entre la envoltura de fluido envolvente y la cinta de fluido de muestra puede estar en transición, de manera que la cinta de muestra que es inicialmente más lenta y más gruesa se convierte en más rápida y más delgada, y las partículas en el fluido de muestra quedan más alineadas. Dicho de otro modo, las fuerzas de corte pueden ser relevantes en la zona de transición de sección transversal decreciente, y pueden disiparse hacia el sitio de captura de imágenes. Las fuerzas de corte en el sitio de captura de imágenes pueden estar representadas por un perfil parabólico, y pueden ser mucho menores que las fuerzas de corte en la zona de transición de sección transversal decreciente. Por tanto, las células o partículas pueden experimentar mayores fuerzas de corte cuando pasan a través de la zona de transición, y menores fuerzas de corte cuando pasan a través del sitio de captura de imágenes. Según algunas realizaciones, la diferencia de viscosidad entre los fluidos de muestra y envolvente puede hacer que los glóbulos rojos se alineen y se enfoquen. Según algunas realizaciones, la diferencia de viscosidad entre los fluidos de muestra y envolvente puede hacer que los orgánulos de glóbulos blancos se alineen y de ese modo se enfoquen. De manera relacionada, pueden obtenerse resultados de obtención de imágenes potenciados para componentes celulares y de orgánulos que se alinean y se enfocan, que resultan del estrechamiento geométrico de la corriente y la diferencia de velocidad entre los fluidos de muestra y envolvente.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45

- La figura 4M representa un neutrófilo 400m a modo de ejemplo (un tipo de glóbulo blanco) que tiene orgánulos internos tales como lóbulos 410m. Como resultado del diferencial de viscosidad entre el fluido de muestra y el fluido envolvente, los orgánulos internos pueden alinearse dentro de la célula, tal como se indica mediante la figura 4N. Por tanto, pueden obtenerse imágenes eficazmente de los orgánulos intracelulares con un dispositivo 430m de captura de imágenes, sin que los orgánulos se solapen entre sí. Es decir, en lugar de que los lóbulos se apilen uno encima de otro tal como se representa en la figura 4M, cuando se observan desde el eje de obtención de imágenes u óptico del dispositivo de captura de imágenes, los lóbulos se alinean y se asientan lado a lado tal como se representa en la figura 4N. Por tanto, los lóbulos pueden visualizarse en la imagen capturada más eficazmente. La alineación de orgánulos internos es un resultado sorprendente e inesperado del diferencial de viscosidad entre los fluidos de muestra y envolvente.
- 50
- 55

- Puede realizarse cualquiera de una variedad de técnicas de análisis de partículas de sangre o hematología usando imágenes del fluido de muestra que fluye a través de la célula de flujo. A menudo, el análisis de imágenes puede implicar la determinación de determinados parámetros de células o partículas, o medir, detectar o evaluar determinadas características de células o partículas. Por ejemplo, el análisis de imágenes puede implicar evaluar el tamaño de partículas o células, características de núcleo celular, características del citoplasma celular, características de orgánulos intracelulares, y similares. De manera relacionada, las técnicas de análisis pueden abarcar determinados métodos de recuento o clasificación o pruebas de diagnóstico, incluyendo diferenciales de glóbulos blancos (WBC). En algunos casos, las imágenes obtenidas usando la célula de flujo pueden soportar una prueba de diferenciales de WBC de 5 partes. En algunos casos, las imágenes obtenidas usando la célula de flujo
- 60
- 65

pueden soportar una prueba de diferenciales de WBC de 9 partes. De manera relacionada, con la referencia a la figura 4, el procesador 440 puede incluir o estar en asociación operativa con un medio de almacenamiento que tiene una aplicación informática que, cuando la ejecuta el procesador, está configurada para hacer que el sistema 400 diferencie diferentes tipos de células basándose en imágenes obtenidas del dispositivo de captura de imágenes. Por ejemplo, pueden usarse técnicas de diagnóstico o de prueba para diferenciar diversas células (por ejemplo neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, metamielocitos, mielocitos, promielocitos y blastocitos).

La figura 4O muestra una comparación de imágenes obtenidas usando PIOAL frente a imágenes obtenidas usando un fluido envolvente distinto de PIOAL. El uso del PIOAL dio como resultado un contenido celular más enfocado tal como lóbulos, citoplasma y/o gránulo. En este ejemplo, se usó un PIOAL que comprende un agente de viscosidad (glicerol a aproximadamente el 30%) para procesar la muestra. Se ajustó el pH a un pH de aproximadamente 6,8 a 7,2 y se hizo la mezcla de muestra isotónica mediante (cloruro de sodio al 0,9%). Los resultados mostrados en el presente documento demuestran la eficacia de un PIOAL a modo de ejemplo usado en un analizador de imágenes para alinear células y orgánulos intracelulares.

Las figuras 4P y 4Q muestran una comparación de las imágenes obtenidas usando un fluido envolvente convencional (figura P, paneles superior e inferior) frente a las imágenes obtenidas usando un fluido de PIOAL a modo de ejemplo (figura 4Q, paneles superior e inferior). Tal como se muestra en el presente documento, el uso de PIOAL dio como resultado una alineación de RBC mejorada. Se analizó la muestra usando un protocolo de enfoque del instrumento (en una diana 44 a modo de ejemplo tal como se representa en la figura 1) y se enfocó la diana mediante un analizador visual. Entonces se desvió el sistema de enfoque por la distancia 52 de desplazamiento, dando como resultado que las partículas en la corriente de muestra en forma de cinta estuvieran enfocadas. La muestra de sangre se diluyó previamente usando un diluyente de muestra. La muestra fluyó a través de una cánula y a lo largo de una trayectoria de flujo de una célula de flujo, generando de ese modo una corriente de muestra con forma de cinta (por ejemplo, 2 micrómetros de grosor) que estaba entre dos capas de PIOAL o fluido envolvente convencional (en controles). El analizador visual genera entonces imágenes enfocadas de las partículas en la corriente de muestra en forma de cinta (por ejemplo, a aproximadamente 60 fotogramas por segundo) que van a usarse para el análisis. La muestra de sangre se obtiene de un sujeto y se procesa para su análisis por el analizador de sangre. Se capturan imágenes de RBC en una célula de flujo mientras que la muestra se procesa usando un fluido envolvente convencional o un PIOAL. Los porcentajes relativos demuestran una mejora significativa en el número de RBC alineados basándose en los datos de obtención de imágenes (por ejemplo 4P y 4Q). El resultado demostró que el PIOAL era eficaz en el aumento del porcentaje de alineación de RBC mientras estaba en flujo en la corriente de muestra en forma de cinta usando el instrumento/protocolos de enfoque tal como se describe en el presente documento.

También se observó que la implementación de PIOAL da como resultado una alineación mejorada basándose en el uso de niveles crecientes de glicerol (gly) en células de flujo simétricas y asimétricas.

El gráfico de la figura 4R muestra el porcentaje de células no alineadas obtenidas usando glicerol al 0% - 30% en el PIOAL con células de flujo simétricas frente a asimétricas. El uso de glicerol al 30% en el PIOAL y una célula de flujo simétrica da como resultado una reducción del porcentaje de células desalineadas hasta sólo el 8%. Obsérvese que sin glicerol en el PIOAL, y con una célula asimétrica, el porcentaje de células desalineadas aumentó hasta el 87%. Por tanto, este gráfico demuestra el efecto del porcentaje de glicerol y la geometría de la célula de flujo sobre la alineación de partículas (por ejemplo, RBC). La adición de glicerol disminuye el porcentaje de células RBC desalineadas usando una geometría de célula de flujo o bien simétrica o bien asimétrica. El % de RBC desalineados se redujo desde el 87% hasta el 15% en las células asimétricas y del 46% al 8% en las simétricas. Por tanto, el gráfico proporciona una comparación entre los resultados de desalineación (8%) obtenidos a partir de una configuración de analizador que implica una zona de transición de células de flujo en estrechamiento simétrica y un fluido envolvente viscoso y los resultados de desalineación (46%) obtenidos a partir de una configuración de analizador que implica una zona de transición de células de flujo en estrechamiento simétrica sin el uso de un fluido envolvente viscoso.

Estos resultados proporcionan pruebas para el descubrimiento sorprendente e inesperado de que determinadas composiciones de PIOAL tienen propiedades inesperadas que alinean células y reposicionan estructuras intracelulares cuando se usan para realizar análisis de células/partículas basado en imágenes.

A modo de ejemplo, se desarrollaron varias formulaciones de PIOAL a modo de ejemplo y métodos de uso de las mismas. Lo siguiente son algunos ejemplos de formulaciones de PIOAL con las propiedades deseadas. El PIOAL comprende un diluyente y al menos un agente de modificación de la viscosidad.

La formulación de PIOAL A a modo de ejemplo incluye una disolución de glicerol al 30% (v/v) que tiene 300 ml de glicerol y CS (cantidad suficiente o para llevar el volumen final hasta) para 1 l con diluyente que contiene 9,84 g de sulfato de sodio, 4,07 g de cloruro de sodio, 0,11 g de procaína HCl, 0,68 g de fosfato de potasio monobásico, 0,71 g de fosfato de sodio dibásico y 1,86 g EDTA de disodio. La mezcla inicial se siguió mediante CS hasta 1 l con agua desionizada mientras se ajustaba el pH a 7,2 con hidróxido de sodio.

La formulación de PIOAL B a modo de ejemplo incluye una disolución de glicerol al 6,5% (v/v) que tiene 65 ml de glicerol y CS hasta 1 l con diluyente a modo de ejemplo adecuado que contiene 9,84 g de sulfato de sodio, 4,07 g de cloruro de sodio, 0,11 g de procaína HCl, 0,68 g de fosfato de potasio monobásico, 0,71 g de fosfato de sodio dibásico y 1,86 g de EDTA de disodio. La mezcla inicial se siguió mediante CS hasta 1 l con agua desionizada mientras se ajustaba el pH a 7,2 con hidróxido de sodio.

La formulación de PIOAL C a modo de ejemplo incluye una disolución de glicerol al 5% (v/v) con el 1% de PVP (p/v) en tampón que tenía 50 ml de glicerol, 10 g de PVP (PM: 360.000), 1 paquete de polvo de PBS de Sigma, a pH 7,4 (solución salina tamponada con fosfato 0,01 M; cloruro de sodio 0,138 M; cloruro de potasio 0,0027 M) y CS hasta 1 l con agua desionizada.

La formulación de PIOAL D a modo de ejemplo incluye una disolución de PVP al 1,6% (p/v) que tenía 16 g de PVP (PM: 360.000) y 1 paquete de polvo de PBS de Sigma, a pH 7,4 (solución salina tamponada con fosfato 0,01 M; cloruro de sodio 0,138 M; cloruro de potasio 0,0027 M) y CS hasta 1 l con agua desionizada.

Rendimiento

La figura 5 representa un cronograma 500 correspondiente a la inyección de uno o más fluidos de muestra en una célula de flujo. Tal como se muestra en el presente documento, la inyección de un primer fluido de muestra puede iniciarse en una célula de flujo, tal como se indica mediante la etapa 510. Después de eso, pueden obtenerse imágenes de las partículas del primer fluido de muestra en la célula de flujo, tal como se indica mediante la etapa 515. Según algunas realizaciones, el primer fluido de muestra puede tener un volumen en un intervalo de desde aproximadamente 5 μ l hasta aproximadamente 150 μ l. En algunos casos, el flujo es de 0,232 μ l/s (o dentro de un intervalo de desde 0,2 μ l/s hasta 0,35 μ l/s) en el área de obtención de imágenes. La inyección del primer fluido de muestra puede terminarse, tal como se indica mediante la etapa 520, y puede iniciarse la inyección de un segundo fluido de muestra dentro de la célula de flujo, tal como se indica mediante la etapa 530. Pueden iniciarse transitorios de fluido de muestra, tal como se indica mediante la etapa 535, como resultado de la terminación de la inyección del primer fluido de muestra y el inicio de la inyección del segundo fluido de muestra. Posteriormente, pueden disiparse los transitorios de fluido de muestra en la célula de flujo, tal como se indica mediante la etapa 445. Pueden obtenerse imágenes de partículas del segundo fluido de muestra en la célula de flujo, tal como se indica mediante la etapa 550. La inyección del segundo fluido de muestra puede terminarse, tal como se indica mediante la etapa 560. En algunos casos, los procedimientos de inyección y flujo se realizan a temperaturas dentro de un intervalo de desde aproximadamente 18°C hasta aproximadamente 40°C.

Normalmente, la corriente del fluido envolvente permanece fluyendo dentro de la célula de flujo cuando la muestra se inyecta, y cuando la inyección se termina. Por tanto, según algunas realizaciones, se mantiene un flujo continuo de fluido envolvente mientras se pulsan inyecciones de fluido de muestra en el fluido envolvente que fluye. El flujo continuo del fluido envolvente puede contribuir a la conservación de una forma de cinta en el fluido de muestra cuando el fluido de muestra fluye a lo largo de la célula de flujo.

Según algunas realizaciones, la captura de imágenes asociada con la etapa 550 puede realizarse en el plazo de cuatro segundos de la captura de imágenes asociada con la etapa 515. Según algunas realizaciones, el tiempo entre las inyecciones de fluido de muestra primera y segunda (por ejemplo entre las etapas 510 y 530) es de aproximadamente 30 segundos. De manera relacionada, según algunas realizaciones, el tiempo entre el inicio de la obtención de imágenes de los fluidos de muestra primero y segundo (por ejemplo entre el inicio de la etapa 515 y el inicio de la etapa 550) es de aproximadamente 30 segundos. De este modo, es posible procesar 120 fluidos de muestra por hora. En algunos casos, un dispositivo de captura de imágenes funciona a una velocidad de fotogramas de 180 fotogramas por segundo (FPS), produciendo por tanto múltiples fotogramas o imágenes consecutivas únicas a una alta frecuencia o velocidad. Tal como se muestra en el presente documento, la duración de una etapa de obtención de imágenes (por ejemplo 515 ó 550) puede ser de 15 segundos, produciendo por tanto 2.700 imágenes por fluido de muestra.

En algunos casos, el primer fluido de muestra alcanza un estado estabilizado en el plazo de aproximadamente 1 a 3 segundos tras la inyección (por ejemplo etapa 510) del primer fluido de muestra del tubo de inyección de fluido de muestra en el fluido envolvente que fluye. En algunos casos, el primer fluido de muestra alcanza un estado estabilizado en el plazo de menos de 1 segundo tras la inyección (por ejemplo etapa 510) del primer fluido de muestra del tubo de inyección de fluido de muestra en el fluido envolvente que fluye. La inyección de la muestra en la célula de flujo puede ser un proceso de dos etapas. Según esta realización, la primera etapa es un empuje de alta velocidad que extrae todo el diluyente de la cánula, y tras el empuje inicial la velocidad de flujo de la muestra se reduce significativamente. El tiempo de transición puede definirse como el tiempo que tarda la muestra (por ejemplo una célula) en desplazarse desde la salida de la cánula hasta el área de obtención de imágenes en las condiciones de flujo de obtención de imágenes (velocidad de flujo de la muestra más lenta). En algunos casos, el fluido de muestra puede tardar aproximadamente 4 segundos en desplazarse desde la salida de la cánula hasta el área de obtención de imágenes. En algunos casos, el primer fluido de muestra alcanza un estado estabilizado en el plazo de aproximadamente 1,8 segundos desde la inyección (por ejemplo etapa 510) del primer fluido de muestra del tubo de inyección de fluido de muestra en el fluido envolvente que fluye. En algunos casos, el fluido de muestra tiene un

tiempo de tránsito a través de la célula de flujo (por ejemplo desde un puerto de salida de la cánula hasta un sitio de captura de imágenes) dentro de un intervalo de desde aproximadamente 2 hasta 4 segundos. En algunos casos, el fluido de muestra tiene un tiempo de tránsito a través de la célula de flujo dentro de un intervalo de desde aproximadamente 1 hasta 4 segundos.

Según algunas realizaciones, el flujo tarda entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5 segundos en estabilizarse, o en desplazarse desde el puerto de salida distal de la cánula hasta el área de obtención de imágenes. En algunos casos, el periodo de duración de la captura de imágenes puede ser de aproximadamente 20 segundos.

Un sistema de hematología según realizaciones de la presente invención puede procesar una muestra de sangre que tiene un volumen de aproximadamente 150 μl . El volumen de sangre aspirada puede ser de aproximadamente 120-150 μl . En algunos casos, el volumen de sangre disponible mínimo en el tubo de muestra es de aproximadamente 500 μl para un modo de muestreo automático y de aproximadamente 250 μl para modo de muestreo manual. La cánula o tubo 400d de de inyección mostrado en la figura 4D tiene un volumen interno de aproximadamente 13 μl . Según algunas realizaciones, la cánula o tubo de inyección tiene un volumen interno de menos de aproximadamente 30 μl . El volumen de la muestra de sangre es eficaz para lavar la cánula antes de comenzar la recogida de imágenes, y por tanto puede evitar periodos prolongados de tiempo en donde el flujo de muestra no es estable. Por ejemplo, el uso de una cánula que tiene un volumen interno de aproximadamente 13 μl puede corresponder a un periodo de inestabilidad del flujo de muestra de aproximadamente 2 a 3 segundos. Según algunas realizaciones, el volumen interno de la cánula puede no tener un impacto sobre la estabilidad del flujo de muestra. Según algunas realizaciones, el volumen interno de la cánula puede tener un impacto sobre la estabilidad de la concentración de células en la propia cinta de muestra si el empuje de muestra de alta velocidad inicial es insuficiente para reemplazar a todo el diluyente dentro de la cánula. De manera relacionada, la cánula puede limpiarse entre las muestras en una corta duración de tiempo usando una pequeña cantidad de diluyente. De este modo, es posible lograr un flujo de muestra estable que facilita la captura de una imagen de alta calidad, y al mismo tiempo lograr un alto rendimiento, con un bajo arrastre. Según algunas realizaciones, una cánula con un alto volumen interno puede requerir un empuje de alta velocidad inicial de alto volumen de la muestra para extraer todo el diluyente en las líneas y la cánula. Realizaciones de la presente invención abarcan la implementación de volúmenes de cánula internos inferiores, que son adecuados para aplicaciones hematológicas en donde los volúmenes de muestra disponibles son bajos, y donde puede lograrse un empuje de volumen inferior en una duración de tiempo más corta.

Según algunas realizaciones, pueden configurarse sistemas de hematología para limitar los transitorios y la contaminación cruzada de muestras secuenciales para acelerar la adquisición de imágenes de muestras de fluido sanguíneo.

Métodos

La figura 6 representa aspectos de un método 600 a modo de ejemplo para obtener imágenes de partículas en una muestra de fluido sanguíneo, según realizaciones de la presente invención. Tal como se muestra en el presente documento, la muestra 610 de sangre incluye partículas, y puede repartirse en uno o más fluidos de muestra, tales como un primer fluido 612 de muestra que contiene partículas y un segundo fluido 614 de muestra que contiene partículas. El método puede incluir hacer fluir un fluido envolvente a lo largo de una trayectoria de flujo de una célula de flujo, tal como se indica mediante la etapa 620. Además, el método puede incluir inyectar el primer fluido 612 de muestra de un tubo de inyección de fluido de muestra en el fluido envolvente que fluye dentro de la célula de flujo, tal como se indica mediante la etapa 630, para proporcionar una corriente de fluido de muestra que tiene un primer grosor adyacente al tubo de inyección. La trayectoria de flujo de la célula de flujo puede tener una disminución del tamaño de la trayectoria de flujo, de manera que el grosor de la corriente de fluido de muestra disminuye desde el grosor inicial hasta un segundo grosor adyacente a un sitio de captura de imágenes. El método 600 puede incluir además obtener imágenes de una primera pluralidad de las partículas del primer fluido de muestra en el sitio de captura de imágenes de la célula de flujo, tal como se indica mediante la etapa 640.

El método 600 también puede incluir iniciar transitorios de fluido de muestra. Por ejemplo, pueden iniciarse transitorios de fluido de muestra terminando la inyección del primer fluido de muestra en el fluido envolvente que fluye, e inyectando el segundo fluido de muestra en el fluido envolvente que fluye tal como se indica mediante la etapa 650. Además, el método 600 puede incluir obtener imágenes de una segunda pluralidad de las partículas del segundo fluido de muestra en el sitio de captura de imágenes de la célula de flujo, tal como se indica mediante la etapa 660. Según algunas realizaciones, la obtención de imágenes de la segunda pluralidad de partículas puede realizarse sustancialmente después de los transitorios de fluido de muestra y en el plazo de 4 segundos de la obtención de imágenes de la primera pluralidad de las partículas.

Velocidad de deformación por corte

Las figuras 7 y 8 representan aspectos de los valores de velocidad de deformación por corte para determinadas condiciones de flujo en una célula de flujo según realizaciones de la presente invención. En cada uno de estos dibujos, se usa un fluido envolvente de glicerol al 30%. En algunos casos, la viscosidad puede tener un valor 2,45 x

10^{-3} . Un valor de deformación por corte puede ser igual al producto obtenido multiplicando un valor de viscosidad por un valor de velocidad de deformación. Con respecto a la figura 7, la muestra puede tener una velocidad de flujo de 0,3 $\mu\text{l/s}$ y el fluido envolvente puede tener una velocidad de flujo de 21 $\mu\text{l/s}$. Con respecto a la figura 8, la muestra puede tener una velocidad de flujo de 1 $\mu\text{l/s}$ y el fluido envolvente puede tener una velocidad de flujo de 70 $\mu\text{l/s}$. En cada una de estas figuras, puede observarse que el flujo presenta un valor de deformación inferior hacia el centro (C) y un valor de deformación superior hacia la periferia (P). Tales valores de deformación pueden corresponderse con una configuración de célula de flujo asimétrica, en algunas realizaciones.

Tal como se representa en la figura 7, según algunas realizaciones, la velocidad de deformación inferior hacia la porción central (C) de la corriente de flujo puede tener un valor de aproximadamente 500 (1/s) o inferior y la velocidad de deformación superior hacia la periferia (P) de la corriente de flujo puede tener un valor de aproximadamente 3000 (1/s) o superior. Tal como se representa en la figura 8, según algunas realizaciones, la velocidad de deformación inferior hacia la porción central (C) de la corriente de flujo puede tener un valor de aproximadamente 1000 (1/s) o inferior y la velocidad de deformación superior hacia la periferia (P) de la corriente de flujo puede tener un valor de aproximadamente 9000 (1/s) o superior.

Por tanto, puede observarse que velocidades de fluido envolvente y de muestra inferiores (por ejemplo, la figura 7) se corresponden con velocidades de deformación inferiores, y velocidades de fluido envolvente y de muestra superiores (por ejemplo, la figura 8) se corresponden con velocidades de deformación superiores. Se entiende que las realizaciones de la presente invención abarcan el uso de fluidos envolventes y/o de muestra correspondientes a diversos valores de viscosidad, diversos valores de velocidad de deformación y/o diversos valores de deformación por corte.

Objetivo de autoenfoque

Volviendo la referencia a la figura 1, los sistemas de obtención de imágenes de partículas pueden incluir una diana 44 o patrón de autoenfoque que está fija en relación con la células 22 de flujo. La diana 44 de autoenfoque puede usarse para lograr imágenes enfocadas de partículas de fluido sanguíneo que fluyen a través de la célula de flujo.

La figura 9A representa una diana 900 de autoenfoque a modo de ejemplo que no es parte de la presente invención, pero no obstante es útil para entender la presente invención. Tal como se muestra en el presente documento, la diana 900 incluye una banda 910 anular opaca y una abertura 920 o centro transparente. En funcionamiento, el dispositivo de obtención de imágenes se enfoca sobre la banda 910, y captura la imagen a través de la abertura. Tal como se comenta en otra parte en el presente documento, un proceso de captura de imágenes puede implicar en primer lugar enfocar (o autoenfocar) sobre la banda 910, y luego ajustar una distancia entre el dispositivo de captura de imágenes y la corriente de fluido de muestra antes de obtener la imagen a través de la abertura 920. Por consiguiente, la banda 910 puede presentar una diana que un sistema de autoenfoque del dispositivo de captura de imágenes puede detectar y enfocar, y determinadas porciones de la diana (por ejemplo bordes o segmentos) pueden incluirse en la imagen. En algunos casos, la diana puede proporcionarse como un disco cromático que tiene una abertura central. Una diana a modo de ejemplo puede estar dotada de una perforación central, que tiene un diámetro de aproximadamente 0,5 mm, que está pegada o fijada a la célula de flujo. El tamaño de la abertura 920 o perforación central puede seleccionarse de modo que sólo cuatro porciones 930 de borde de la banda 910 anular opaca son visibles en la imagen 940 capturada, tal como se ilustra en la figura 9B. Por tanto, la banda 910 anular no interfiere con la captura de imágenes celulares (por ejemplo, la luz puede pasar a través de la abertura 920 para iluminar las partículas de muestra, y el campo de visión no está sustancialmente impedido por la banda anular). De este modo, la banda 910 aparece sólo en las esquinas de la imagen.

La figura 10 representa una diana 1000 de autoenfoque a modo de ejemplo que no es parte de la presente invención, pero no obstante es útil para entender la presente invención. La diana 1000 incluye una banda o borde 1010 y una abertura 1020 central. La figura 11 muestra otra diana 1100 de autoenfoque a modo de ejemplo que no es parte de la presente invención, pero no obstante es útil para entender la presente invención. La diana 1100 incluye una banda o borde 1110 y una abertura 1120 central. Según algunas realizaciones, la diana 1100 de autoenfoque proporciona una imagen que tiene 50 píxeles de negro sobre la parte superior y la inferior. En algunos casos, la diana 1100 de autoenfoque proporciona una desviación de enfoque de célula de flujo (FCFO) de aproximadamente 65,3 μm .

La figura 12A representa una diana 1200 de autoenfoque a modo de ejemplo que no es parte de la presente invención, pero no obstante es útil para entender la presente invención. La diana 1200 se presenta como un diseño de buzón, e incluye un primer borde 1210 o superior y un segundo borde 1220 o inferior. La diana 1200 también incluye una abertura o paso 1230 transparente entre los bordes primero y segundo. Según algunos ejemplos, que no son parte de la presente invención, pero no obstante son útiles para entender la presente invención, la diana tiene un diámetro de aproximadamente 4 mm, y la altura del buzón es de 265 μm . En algunos casos, los bordes superior e inferior pueden estar presentes como medios círculos, y pueden producirse como un metal depositado tal como óxido de cromo o algún otro material opaco.

La figura 12B muestra una vista ampliada de la porción distal de la diana 1200 de autoenfoque. Tal como se muestra

en el presente documento, el primer borde 1210 incluye una escala numérica negativa/positiva, con un valor cero centrado. El segundo borde 1220 incluye una escala similar. En algunos casos, los incrementos de escala son de 100 μm . Según algunos ejemplos, que no son parte de la presente invención, pero no obstante son útiles para entender la presente invención, las escalas pueden usarse para facilitar la colocación de la célula de flujo de modo que el campo de visión del dispositivo de obtención de imágenes o cámara pueda centrarse sobre la corriente de muestra. Tal como se muestra en el presente documento, la corriente 1240 de muestra fluye en una dirección perpendicular a las escalas de los bordes primero y segundo. Como parte de un protocolo de enfoque, el dispositivo de captura de imágenes puede funcionar enfocando los números u otros caracteres u objetos de los que pueden obtenerse imágenes presentes en los bordes 1210, 1220.

Ejemplos que no son parte de la presente invención, pero no obstante son útiles para entender la presente invención abarcan técnicas para abordar la deriva térmica asociada con el uso del sistema de análisis de partículas, mediante lo cual tales efectos térmicos pueden comprometer por lo demás la calidad de las imágenes obtenidas con el dispositivo de obtención de imágenes. La figura 13A representa una vista lateral parcial de una célula 1320 de flujo que tiene un sensor 1370 térmico, un reflector 1380 y una diana 1344 de autoenfoco. Durante el funcionamiento de un sistema de análisis de partículas, efectos térmicos pueden provocar que la corriente de muestra se desvíe lentamente del foco del dispositivo de obtención de imágenes. Por ejemplo, los efectos térmicos pueden provocarse por la expansión térmica de la célula de flujo a través del calor irradiado procedente de la lámpara. Además, los efectos térmicos pueden provocarse por la expansión térmica de la célula de flujo y el conjunto de banco óptico (OBA) a través de calentamiento por conducción y radiación. En algunas realizaciones, determinados componentes del OBA pueden expandirse, lo que puede contribuir a errores de enfoque. Por ejemplo, tales componentes pueden incluir placas de metal que mantienen la cámara 24 junta, una placa de metal que mantiene o está conectada a la célula de flujo o una placa de metal que mantiene tanto la célula de flujo como la cámara 24 juntas. La figura 13B representa una vista en perspectiva parcial de la célula 1320 de flujo que tienen un sensor 1370 térmico y diana 1344 de autoenfoco. Además, la figura 13C representa otra vista en perspectiva de la célula 1320 de flujo que tiene un sensor 1370 térmico, reflector 1380 y diana 1344 de autoenfoco.

El reflector 1380 puede funcionar reduciendo o limitando la cantidad de calor absorbido por la célula 1320 de flujo. Por ejemplo, el reflector 1380 puede bloquear el calor irradiado por una lámpara 1342 de centelleo tal como se indica en la figura 13A. Por tanto, el reflector 1380 puede minimizar el impacto térmico de la lámpara. El reflector 1342 puede reducir también el resplandor y la dispersión de luz generados por la lámpara, dando como resultado por tanto una calidad de imagen mejorada. El sensor 1370 térmico se coloca cerca del canal de flujo de fluido y adyacente al sitio de captura de imágenes, de modo que pueden obtenerse lecturas de temperatura precisas. Puede usarse la información del sensor de temperatura para enfocar el dispositivo de captura de imágenes sobre la corriente de cinta de fluido de muestra.

Tal como se representa en la figura 13D, una célula 1300d de flujo puede incluir una trayectoria 1322d de flujo que tiene un puerto u orificio 1301d de ventilación a través del cual pueden liberarse o eliminarse las burbujas 1302d. Tal como se representa en el presente documento, un tubo 1303d, a través del cual puede aplicarse vacío, puede estar en contacto con el puerto 1301d para retirar las burbujas 1302d de la corriente de flujo. Un mecanismo de eliminación de burbujas de este tipo es adecuado para eliminar burbujas del fluido que fluye dentro de la célula de flujo, y puede funcionar impidiendo que se depositen o atasquen burbujas o microburbujas dentro de la célula de flujo.

Cada uno de los cálculos u operaciones descritos en el presente documento puede realizarse usando un ordenador u otro procesador que tiene hardware, software y/o firmware. Las diversas etapas del método pueden realizarse por módulos, y los módulos pueden comprender cualquiera de una amplia variedad de hardware y/o software de procesamiento de datos digitales y/o analógicos para realizar las etapas del método descritas en el presente documento. Los módulos comprenden opcionalmente hardware de procesamiento de datos adaptado para realizar una o más de estas etapas al tener un código de programación de máquinas apropiado asociado con el mismo, estando integrados los módulos para dos o más etapas (o porciones de dos o más etapas) en una única placa de procesador o separados en diferentes placas de procesador en una cualquiera de una amplia variedad de arquitecturas de procesamiento integradas y/o distribuidas. Estos métodos y sistemas emplearán a menudo un medio tangible que incorpora un código legible por máquina con instrucciones para realizar las etapas del método descritas anteriormente. El medio legible adecuado puede comprender una memoria (incluyendo una memoria volátil y/o una memoria no volátil), un medio de almacenamiento (tal como una grabación magnética en un disco flexible, un disco duro, una cinta, o similar; en una memoria óptica tal como un CD, un CD-R/W, un CD-ROM, un DVD, o similar; o cualquier otro medio de almacenamiento digital o analógico), o similar.

Son posibles diferentes disposiciones de los componentes representados en los dibujos o descritos anteriormente, así como componentes y etapas no mostrados ni descritos. De manera similar, algunas características y subcombinaciones son útiles y pueden emplearse sin la referencia a otras características y subcombinaciones. Se han descrito realizaciones de la invención para fines ilustrativos y no restrictivos, y les resultarán evidentes realizaciones alternativas a los lectores de esta patente. En determinados casos, las etapas u operaciones del método pueden realizarse o ejecutarse en orden diferente, o pueden añadirse, eliminarse o modificarse operaciones. Puede apreciarse que, en determinados aspectos de la invención, un único componente puede reemplazarse por

5 múltiples componentes, y múltiples componentes pueden reemplazarse por un único componente, para proporcionar un elemento o estructura o para realizar una función o funciones dadas. Excepto cuando tal sustitución no fuera operativa para poner en práctica determinadas realizaciones de la invención, tal sustitución se considera dentro del alcance de la invención. Por consiguiente, la presente invención no se limita a las realizaciones descritas anteriormente o representadas en los dibujos, y pueden hacerse diversas realizaciones y modificaciones sin apartarse del alcance de las reivindicaciones a continuación.

REIVINDICACIONES

1. Método para obtener imágenes de partículas usando un sistema de análisis de partículas configurado para hidroenfoco combinado de la viscosidad y geometría de las partículas incluidas dentro de una muestra (25) de fluido sanguíneo, comprendiendo el método:

inyectar un fluido (426) envolvente a lo largo de una trayectoria (422) de flujo de una célula (22, 33, 420) de flujo del analizador de partículas, teniendo el fluido (426) envolvente una viscosidad que es mayor que una viscosidad de la muestra (25) de fluido sanguíneo;

inyectar la muestra (25) de fluido sanguíneo a partir de un tubo (29, 412, 400d) de inyección de fluido de muestra a una velocidad de flujo en el fluido (426) envolvente que fluye dentro de la célula (22, 33, 420) de flujo para proporcionar una corriente (32, 428) de fluido de muestra que tiene un primer grosor adyacente al tubo (21, 412, 400d) de inyección, teniendo la trayectoria (422) de flujo de la célula (22, 33, 420) de flujo una disminución del tamaño (21, 419) de la trayectoria de flujo de modo que el grosor de la corriente (32, 428) de fluido de muestra disminuye desde el grosor inicial hasta un segundo grosor adyacente a un sitio (432) de captura de imágenes;

obtener imágenes de una primera pluralidad de las partículas de la muestra (25) en el sitio (432) de captura de imágenes de la célula (22, 33, 420) de flujo;

en el que la disminución del tamaño (422) de la trayectoria de flujo se define por una porción (21a) de trayectoria de flujo proximal que tiene un grosor proximal, y porción (21b) de trayectoria de flujo distal que tiene un grosor distal menor que el grosor proximal, estando la razón del grosor proximal con respecto al grosor distal en el intervalo de 10 a 200,

en el que un extremo (427a) posterior del tubo (29, 412, 400d) de inyección de fluido de muestra se coloca de manera distal a la porción (21a) de trayectoria de flujo proximal,

en el que una diferencia de viscosidad entre el fluido (426) envolvente y la muestra (25) de fluido sanguíneo, en combinación con la disminución del tamaño de la trayectoria de flujo y la velocidad de flujo de la muestra, es eficaz para suministrar células en la muestra (25) de fluido sanguíneo desde el tubo (29, 412, 400d) de inyección de fluido de muestra hasta el sitio (432) de captura de imágenes en un tiempo de tránsito distinto de cero que es de cuatro segundos o menos, mientras que un agente de viscosidad en el fluido (426) envolvente mantiene la viabilidad de las células que salen de la estructura y el contenido de las células intacto cuando las células se extienden desde la corriente de fluido de muestra al interior del fluido envolvente que fluye a medida que las células se desplazan desde el tubo (29, 412, 400d) de inyección de fluido de muestra hasta el sitio (432) de captura de imágenes.

2. Método según la reivindicación 1, en el que el fluido (426) envolvente se inyecta a lo largo de la trayectoria (422) de flujo a una velocidad de flujo de fluido envolvente, en el que la velocidad de flujo del fluido (426) envolvente y la sección transversal del área de flujo de la célula de flujo se corresponden con una velocidad de fluido envolvente, en el que la velocidad de flujo de la muestra (25) de fluido sanguíneo y la sección transversal del área de flujo de un puerto de salida del tubo (P, 331, 431) de inyección se corresponden con una velocidad de muestra, y en el que hay una diferencia de velocidad entre la velocidad de fluido envolvente y la velocidad de muestra.

3. Método según la reivindicación 2, en el que las diferencias de viscosidad y velocidad y la disminución del tamaño de la trayectoria de flujo son eficaces para el hidroenfoco de células en la muestra (25) de fluido sanguíneo en el sitio (432) de captura de imágenes.

4. Método según la reivindicación 1, en el que o bien:
la disminución del tamaño de la trayectoria de flujo se define por paredes (421a, 423a) opuestas de la trayectoria (422) de flujo que se inclinan radialmente hacia dentro a lo largo de la trayectoria (422) de flujo generalmente simétrica sobre un plano (451a) transversal que biseca los grosores primero y segundo de la corriente de fluido de muestra; o bien:

la simetría en la disminución del tamaño de la trayectoria de flujo es eficaz para limitar la desalineación de la orientación de la obtención de imágenes de glóbulos rojos en la muestra (25) de fluido sanguíneo hasta menos de aproximadamente el 20%.

5. Método según la reivindicación 1, en el que o bien:
la muestra (25) de fluido sanguíneo comprende partículas esféricas, y la diferencia de viscosidad entre el fluido (25) de muestra y el fluido (426) envolvente es eficaz para alinear orgánulos intracelulares de las partículas esféricas dentro de un plano focal en el sitio (432) de captura de imágenes de la célula (22, 33, 420) de flujo; o bien:

el tubo (29, 412, 400d) de inyección comprende una porción (21a) proximal que tiene una primera área de sección transversal de flujo y una porción (21b) distal que tiene una segunda área de sección transversal de flujo, y en el que el área de sección transversal de flujo de la porción (21a) proximal es mayor de 1,5 veces el área de sección transversal de flujo de la porción (21b) distal.

6. Método según la reivindicación 1, en el que o bien:
una razón de velocidad de flujo de fluido envolvente con respecto a velocidad de flujo de fluido de muestra es de aproximadamente 200; o bien:
el segundo grosor de la corriente (32, 428) de fluido de muestra está dentro de un intervalo de desde aproximadamente 2 μm hasta aproximadamente 10 μm ; o bien:
una razón del primer grosor de la corriente (32, 428) de fluido de muestra con respecto al segundo grosor de la corriente (32, 428) de fluido de muestra tiene un valor dentro de un intervalo de desde aproximadamente 20:1 hasta aproximadamente 70:1.
7. Sistema de análisis de partículas que realiza hidroenfoco combinado de la viscosidad y geometría para obtener imágenes de partículas en una muestra (25) de fluido sanguíneo, comprendiendo el sistema:
una célula (22, 33, 420) de flujo que tiene una trayectoria (422) de flujo configurada para transmitir un flujo de fluido (426) envolvente, teniendo el fluido (426) envolvente una viscosidad que es mayor que una viscosidad de la muestra (25) de fluido sanguíneo;
un sistema de inyección de fluido de muestra en comunicación de fluido con la trayectoria (420) de flujo y configurado para inyectar la muestra (25) al interior del fluido (426) envolvente que fluye dentro de la célula (22, 33, 420) de flujo para proporcionar una corriente (32, 428) de fluido de muestra que tiene un primer grosor adyacente al tubo (29, 412, 400d) de inyección, teniendo la trayectoria de flujo de la célula de flujo una disminución del tamaño (21, 419) de la trayectoria de flujo de modo que el grosor de la corriente de fluido de muestra disminuye desde el grosor inicial hasta un segundo grosor adyacente a un sitio (432) de captura de imágenes; en el que la disminución del tamaño (422) de la trayectoria de flujo se define por una porción (21a) de trayectoria de flujo proximal que tiene un grosor proximal, y una porción (21b) de trayectoria de flujo distal que tiene un grosor distal menor que el grosor proximal, estando la razón del grosor proximal con respecto al grosor distal en el intervalo de 10 a 200, y un extremo (427a) posterior del tubo (29, 412, 400d) de inyección de fluido de muestra se coloca de manera distal a la porción (21a) de trayectoria de flujo proximal;
un dispositivo (430) de captura de imágenes alineado con el sitio de captura de imágenes para obtener imágenes de una pluralidad de las partículas del fluido (25) de muestra en el sitio (432) de captura de imágenes de la célula (22, 33, 420) de flujo; y
un procesador (440) y un medio tangible no transitorio legible por ordenador, el procesador acoplado con el sistema de inyector de fluido de muestra y el dispositivo (430) de captura de imágenes, el medio legible por ordenador programado con una aplicación informática que, cuando la ejecuta el procesador (440), hace que el procesador (440) inicie la inyección del fluido (25) de muestra al interior del fluido (426) envolvente que fluye a una velocidad de flujo de muestra, de modo que la diferencia de viscosidad entre las muestras de fluido sanguíneo y envolvente, en combinación con la disminución del tamaño de la trayectoria de flujo y la velocidad de flujo de la corriente (32, 428) de fluido de muestra, es eficaz para suministrar células en la muestra (25) de fluido sanguíneo desde el tubo (29, 412, 400d) de inyección de fluido de muestra hasta el sitio (432) de captura de imágenes en un tiempo de tránsito distinto de cero que es de cuatro segundos o menos, mientras que un agente de viscosidad en el fluido (426) envolvente mantiene la viabilidad de las células que salen de la estructura y el contenido de las células intacto cuando las células se extienden desde la corriente (32, 428) de fluido de muestra al interior del fluido (426) envolvente que fluye a medida que las células se desplazan desde el tubo (29, 412, 400d) de inyección de fluido de muestra hasta el sitio (432) de captura de imágenes.
8. Sistema según la reivindicación 7,
la disminución del tamaño de la trayectoria de flujo se define por paredes (421a, 423a) opuestas de la trayectoria de flujo que se inclinan radialmente hacia dentro a lo largo de la trayectoria de flujo generalmente simétrica sobre un plano (451a) transversal que biseca los grosores primero y segundo de la corriente de fluido de muestra.
9. Sistema según la reivindicación 7, en el que o bien:
la simetría en la disminución del tamaño de la trayectoria de flujo es eficaz para limitar la desalineación de la orientación de la obtención de imágenes de glóbulos rojos en la muestra (25) de fluido sanguíneo hasta menos de aproximadamente el 20%; o bien:
el tubo (29, 412, 400d) de inyección comprende una porción (21a) proximal que tiene una primera área de sección transversal de flujo y una porción (21b) distal que tiene una segunda área de sección transversal de flujo, y en el que el área de sección transversal de flujo de la porción (21a) proximal es mayor de 1,5 veces el área de sección transversal de flujo de la porción (21b) distal.
10. Sistema según la reivindicación 7, en el que o bien:
el fluido (32, 428) de muestra tiene un tiempo de tránsito a través de la célula (22, 33, 420) de flujo dentro de un intervalo de desde aproximadamente 1 hasta 4 segundos; o bien:

la célula (22, 33, 420) de flujo está configurada para recibir el fluido (426) envolvente desde una fuente de fluido envolvente en la trayectoria (422) de flujo en una primera dirección de flujo que es perpendicular a la segunda dirección de flujo del fluido (426) envolvente a lo largo de la trayectoria (422) de flujo en el sitio (432) de obtención de imágenes.

- 5 11. Sistema según la reivindicación 7, en el que la célula (22,33, 420) de flujo comprende una diana de autoenfoco para el dispositivo de captura de imágenes.
- 10 12. Sistema según la reivindicación 7, que comprende además una diana (44, 900, 1000, 1200, 1344) de autoenfoco que tiene una posición fija en relación con la célula (22, 33, 420) de flujo.
- 15 13. Sistema según la reivindicación 7, en el que la diferencia de viscosidad entre el fluido (426) envolvente y la muestra (428) de fluido sanguíneo, en combinación con la disminución del tamaño (21, 419) de la trayectoria de flujo y la velocidad de flujo de la corriente (32, 428) de fluido de muestra, es eficaz para suministrar células en la muestra (25) de fluido sanguíneo desde el tubo (29, 412, 400d) de inyección de fluido de muestra hasta el sitio (432) de captura de imágenes en de 1 segundo a 4 segundos.
- 20 14. Sistema según la reivindicación 7, en el que el dispositivo (432) de captura de imágenes comprende un dispositivo de obtención de imágenes de alta resolución óptica o un dispositivo de captura de imágenes digital.
15. Sistema según la reivindicación 7, en el que el dispositivo (432) de captura de imágenes tiene una resolución óptica de 1 μm o menos.

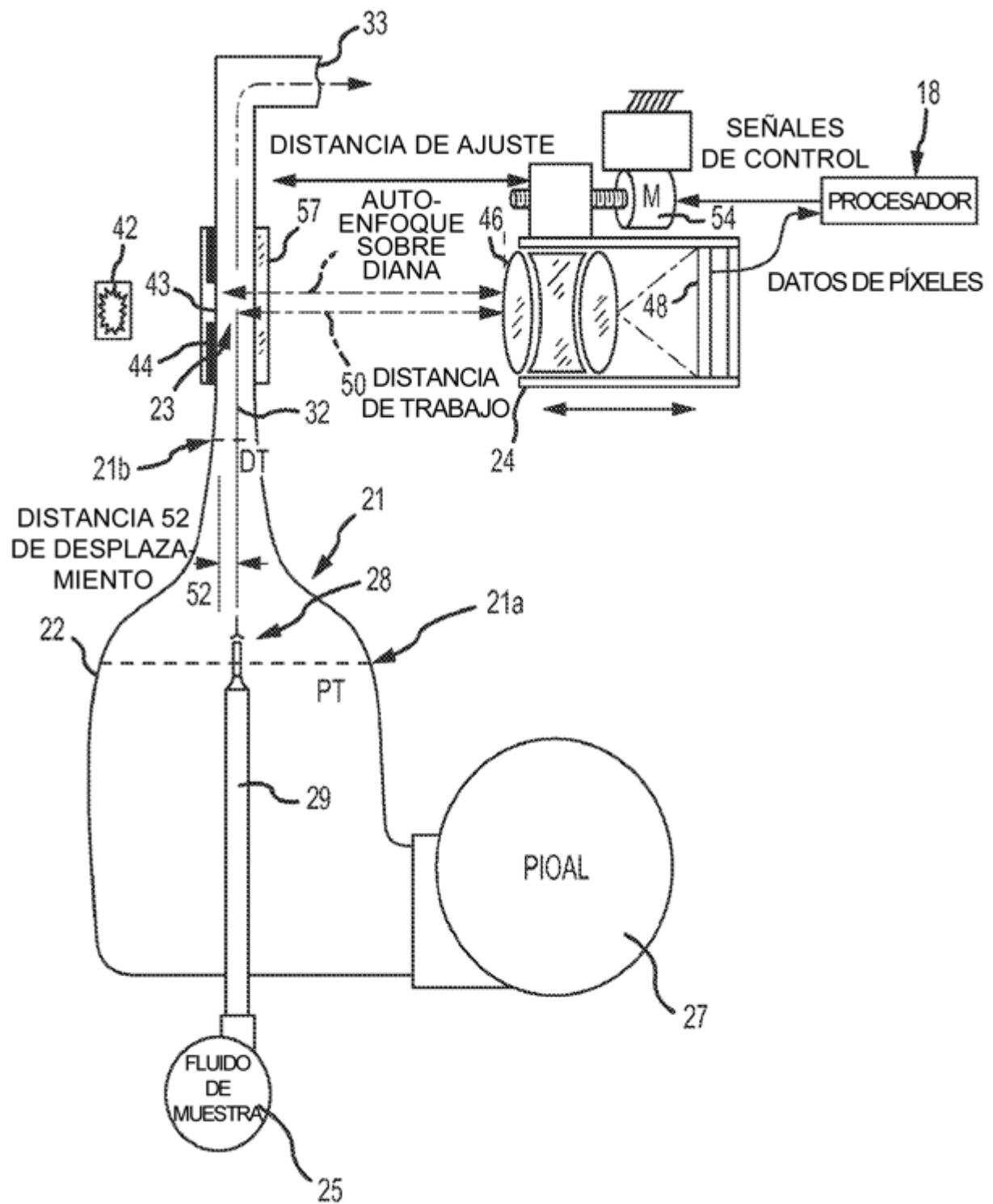


FIG.1

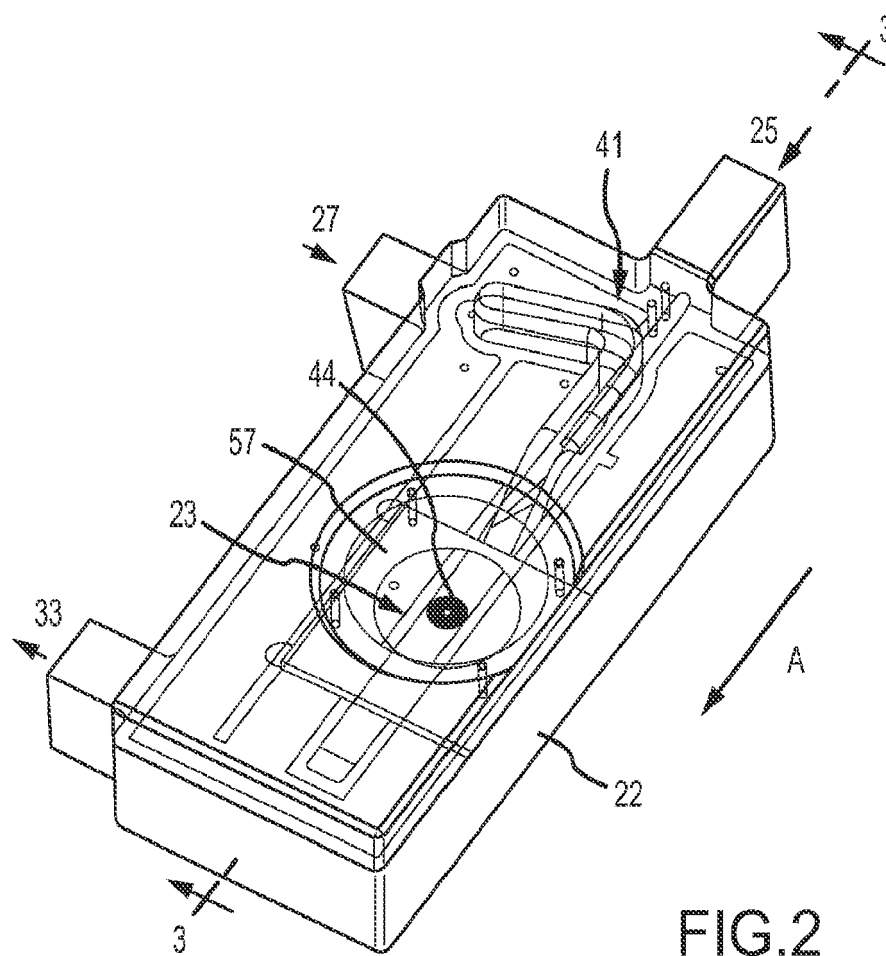


FIG. 2

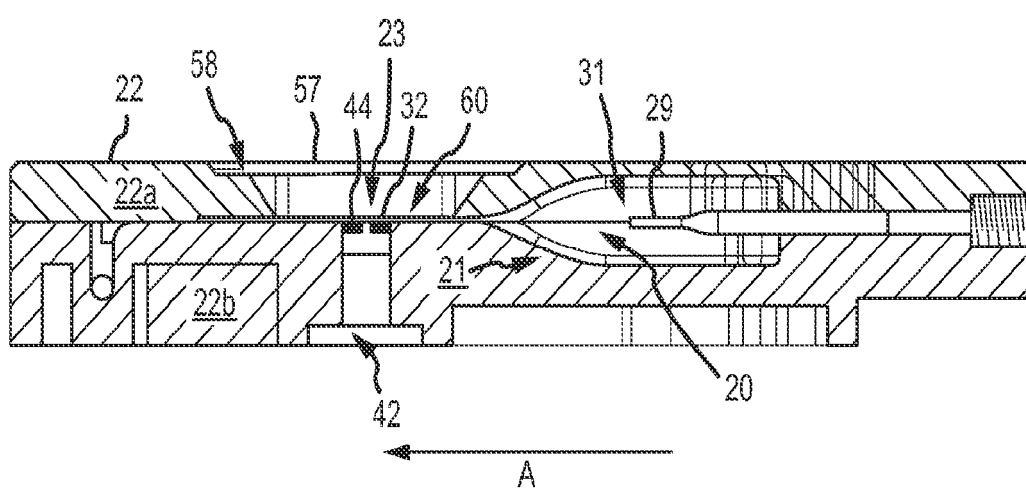


FIG. 3

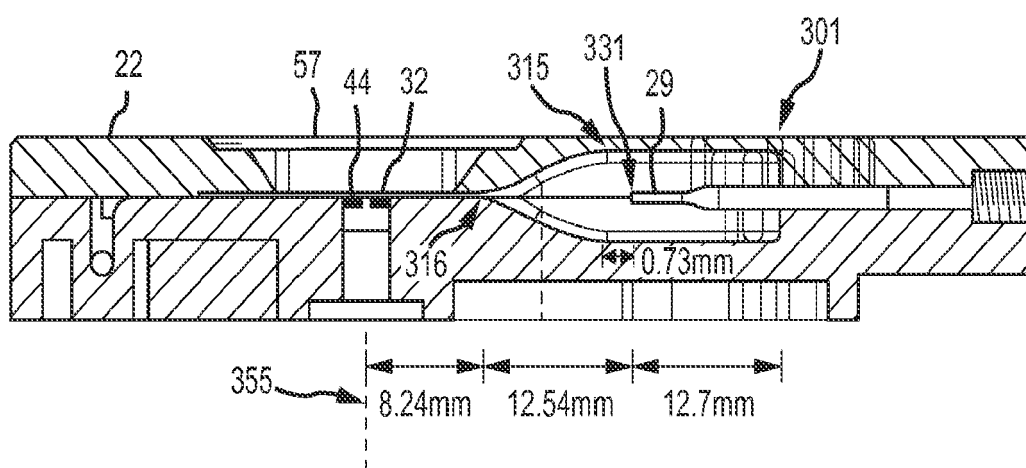


FIG.3A

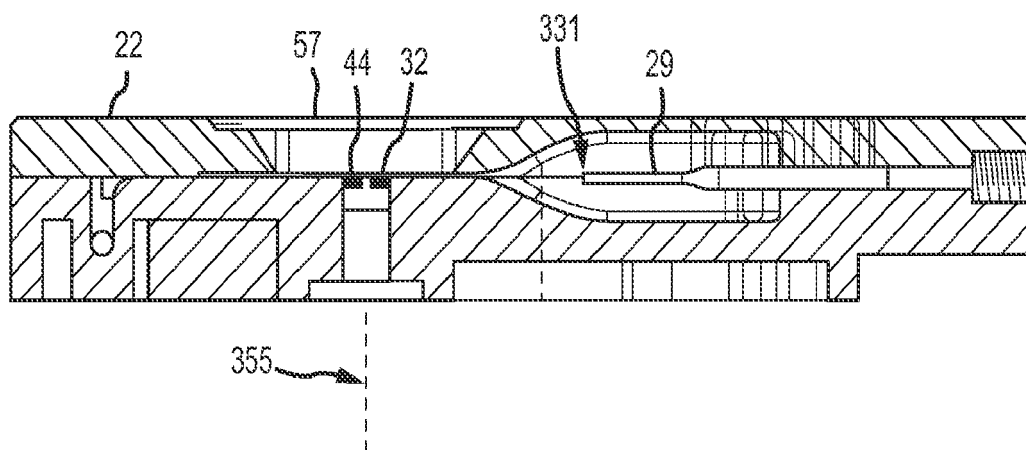


FIG.3B

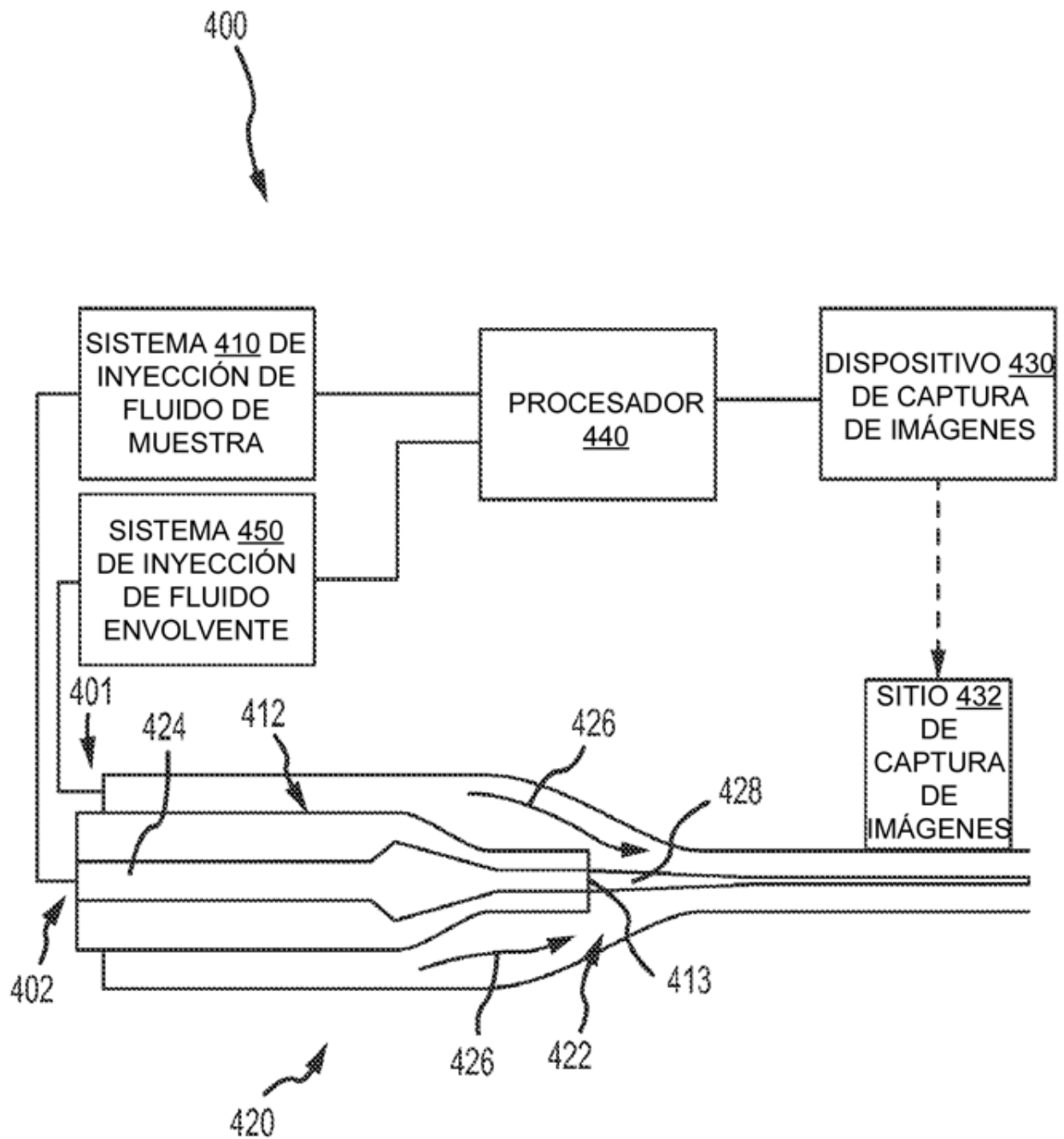


FIG.4

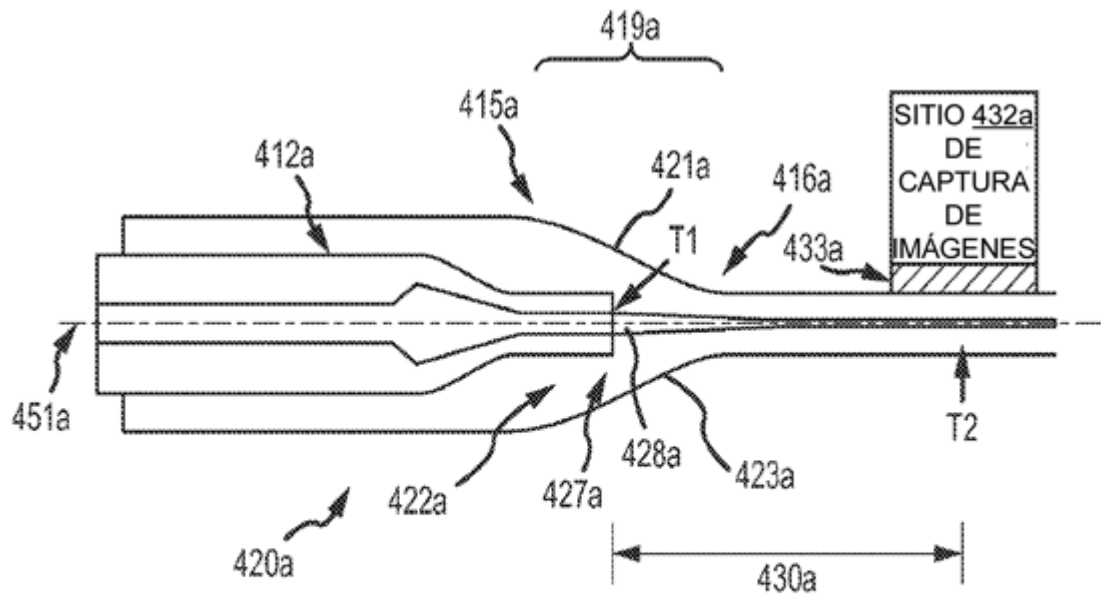


FIG. 4A

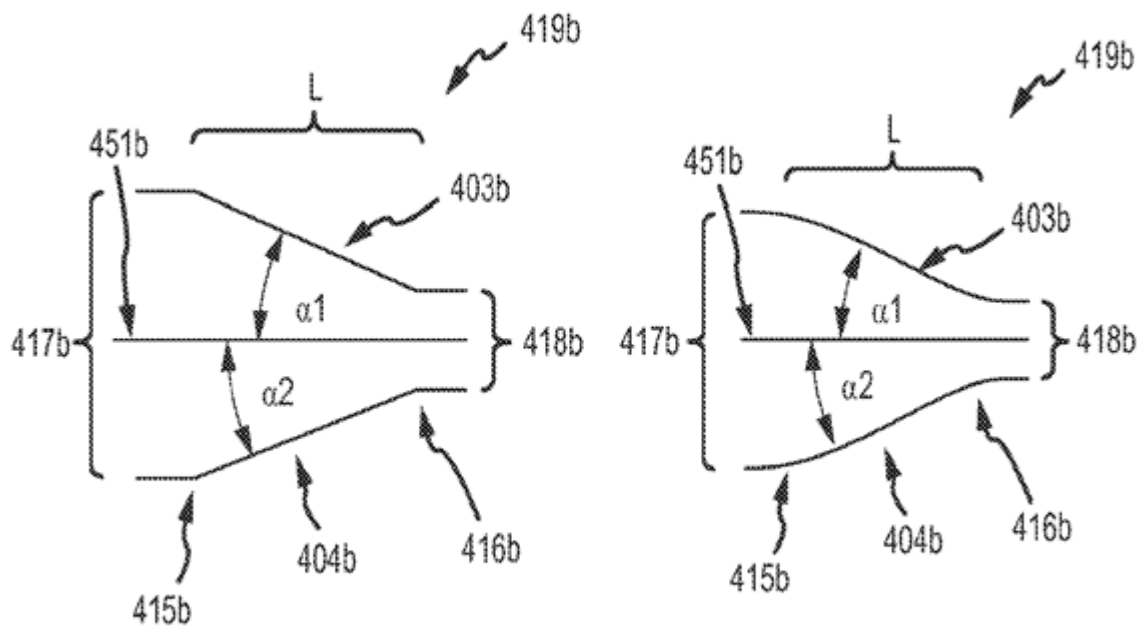


FIG. 4B-1

FIG. 4B-2

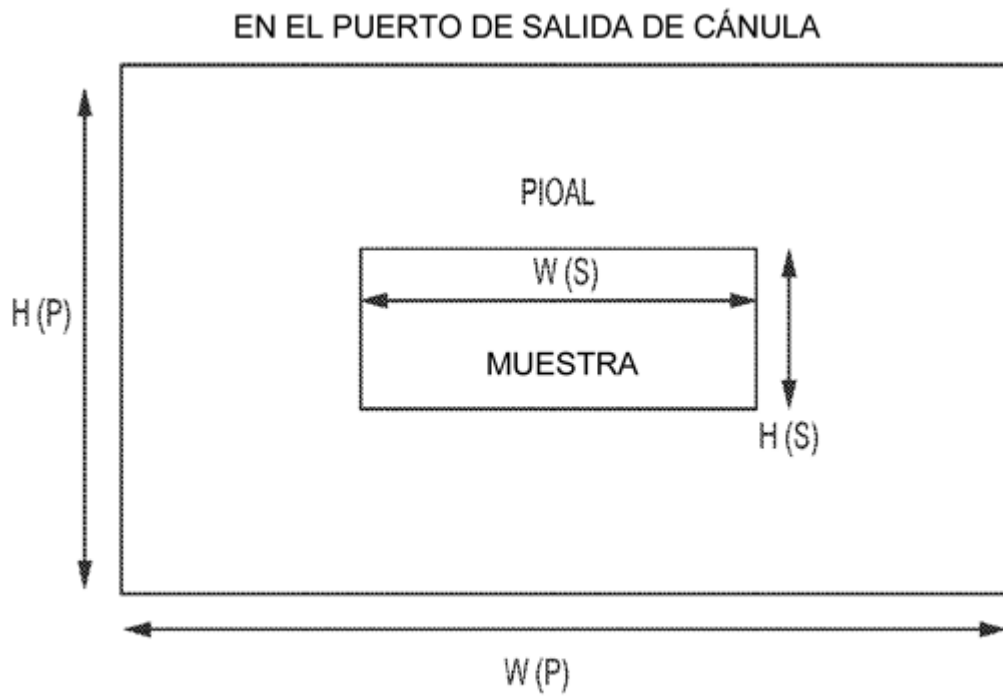


FIG.4A-1

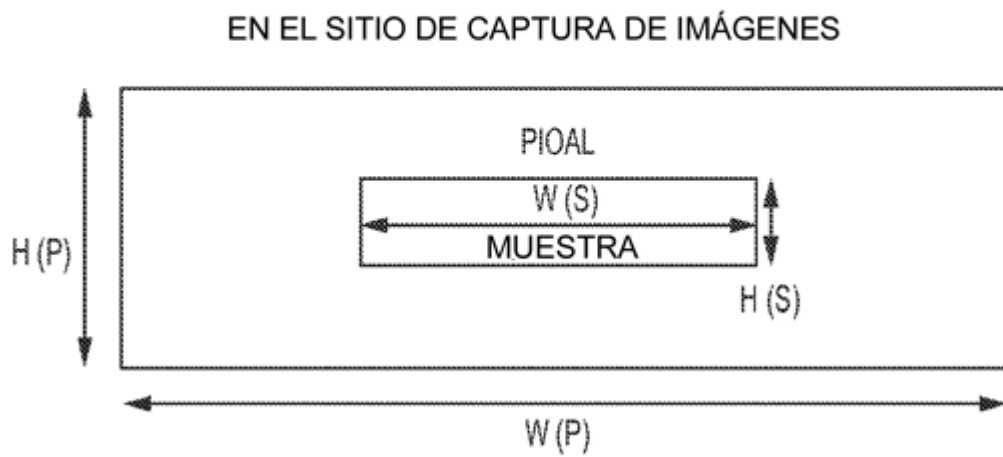


FIG.4A-2

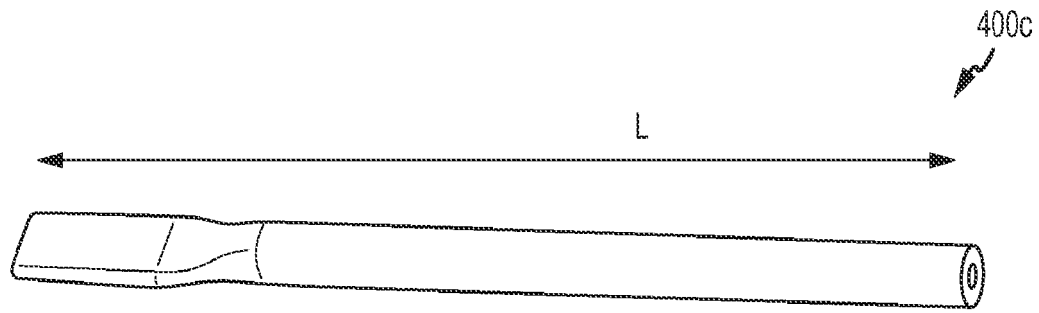
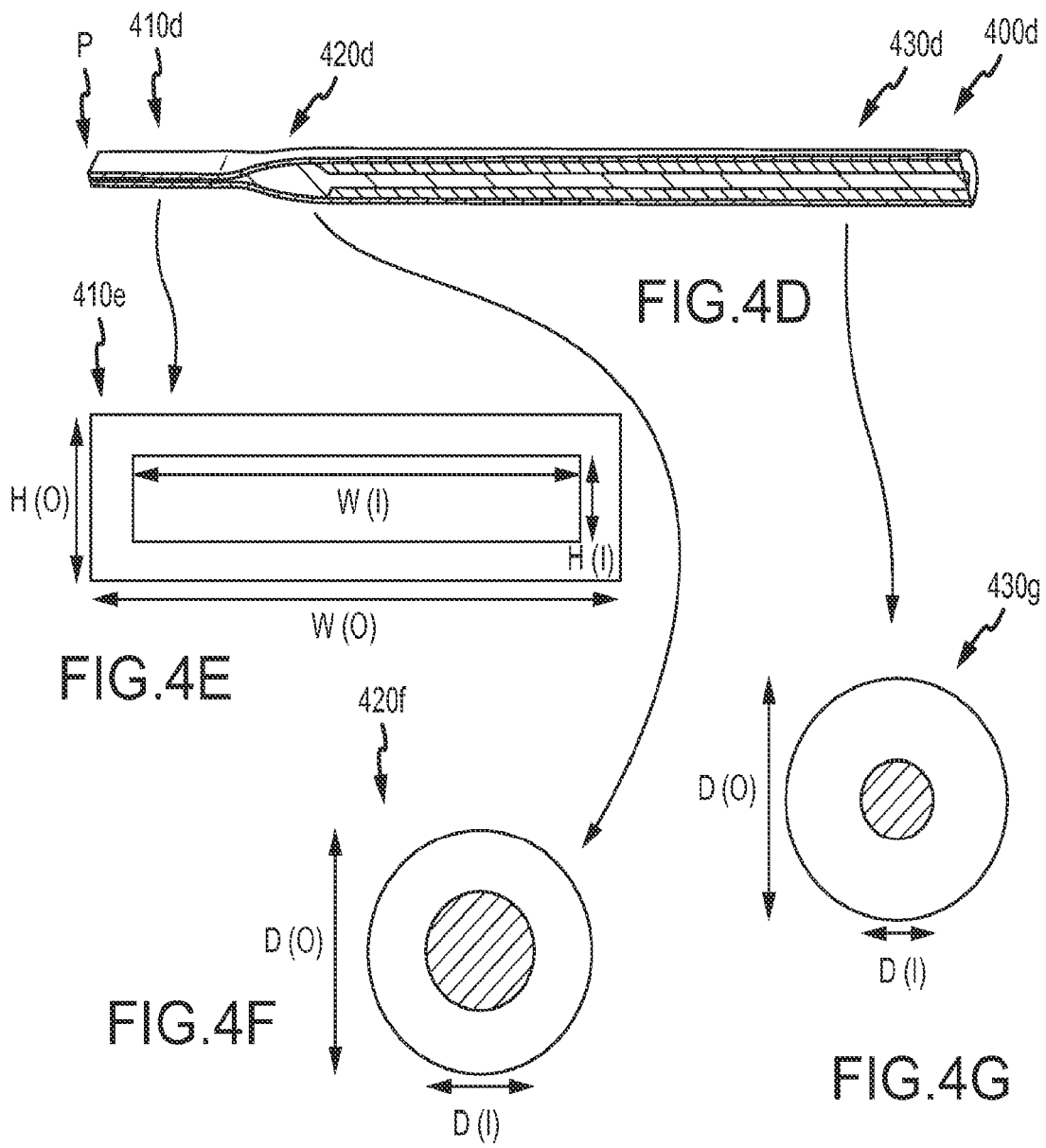


FIG. 4C



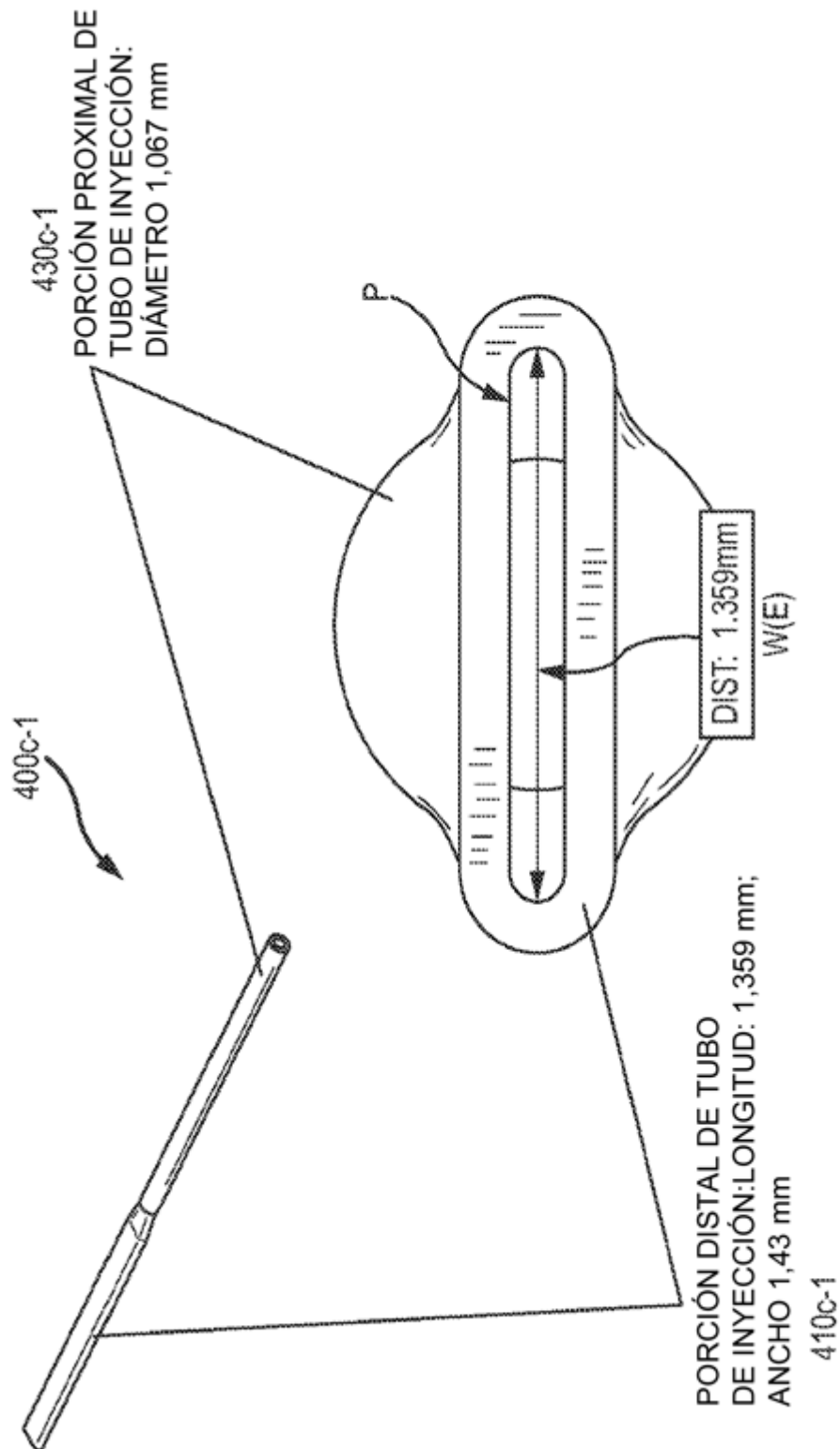


FIG.4C-1

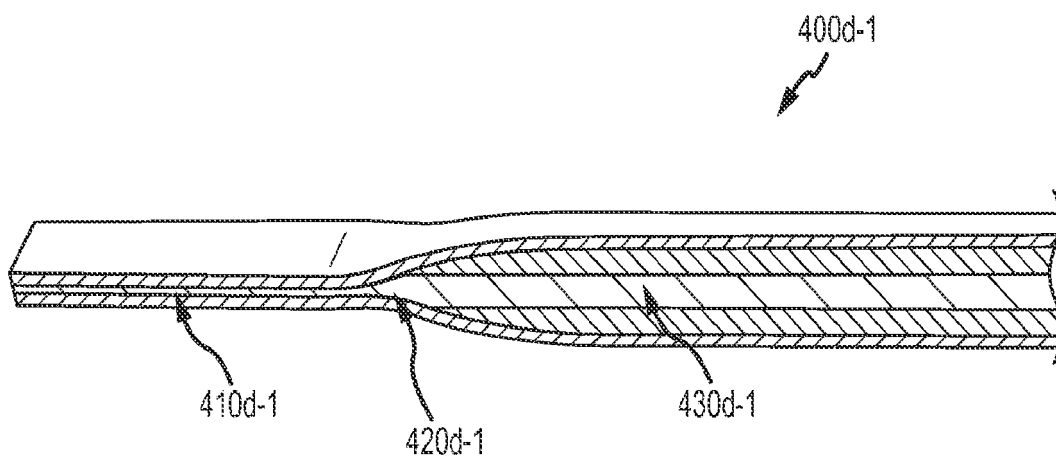


FIG.4D-1

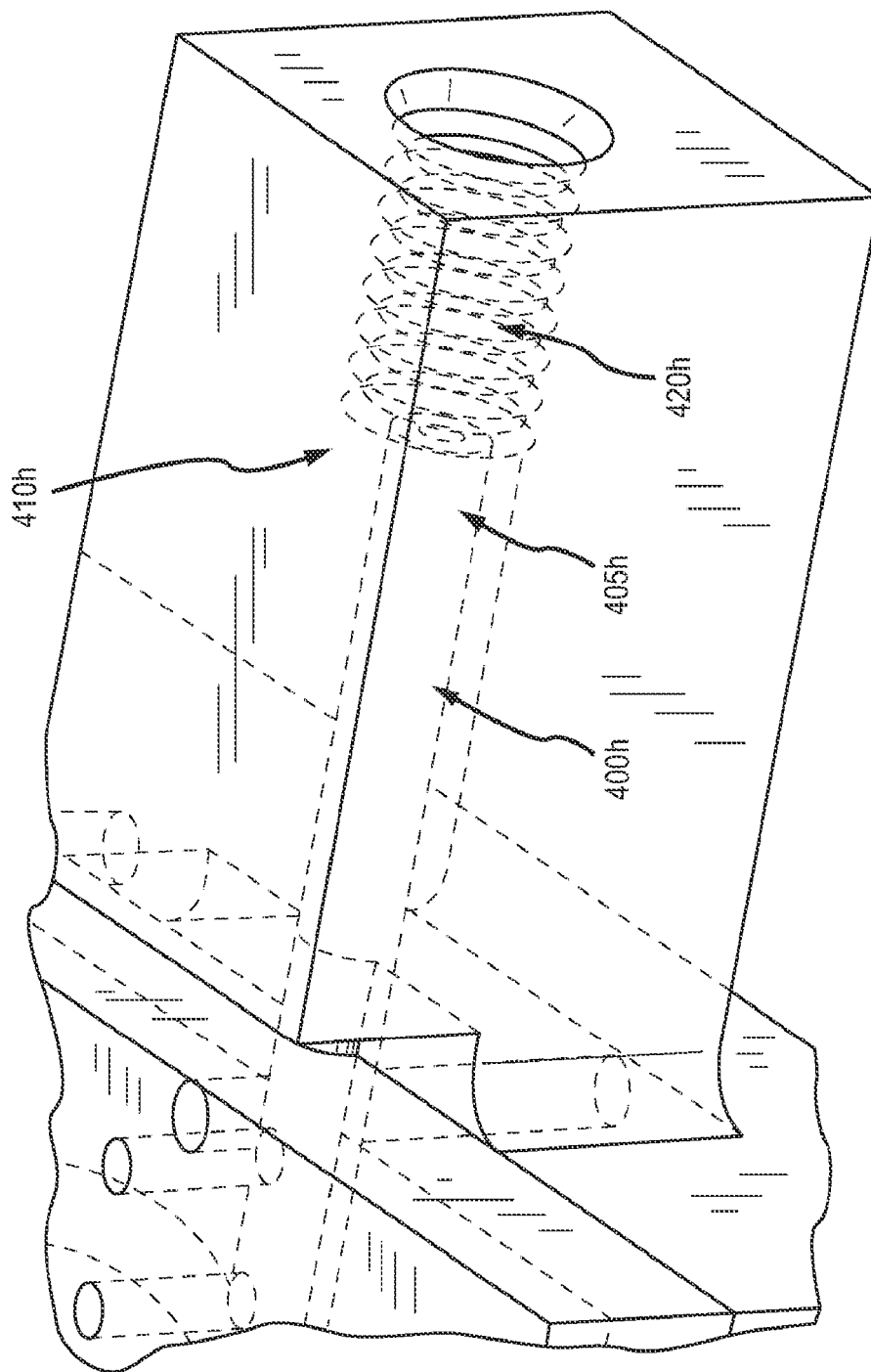


FIG. 4H

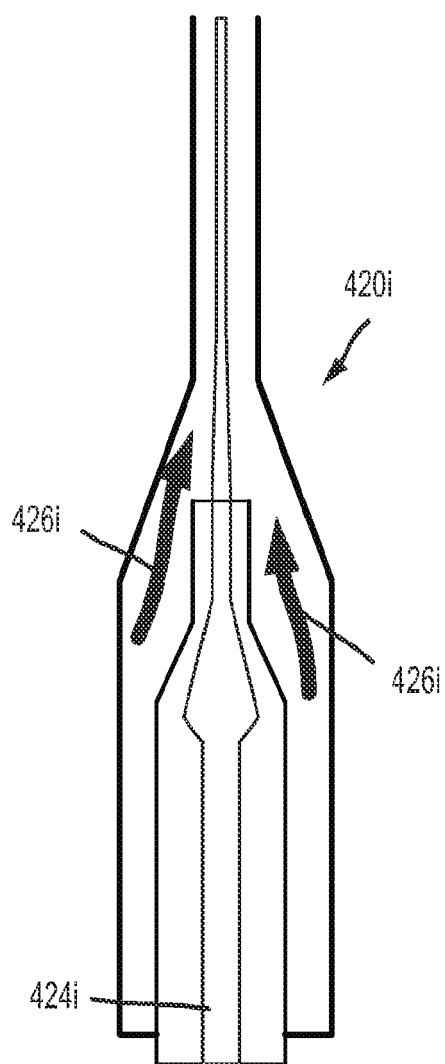


FIG. 4I

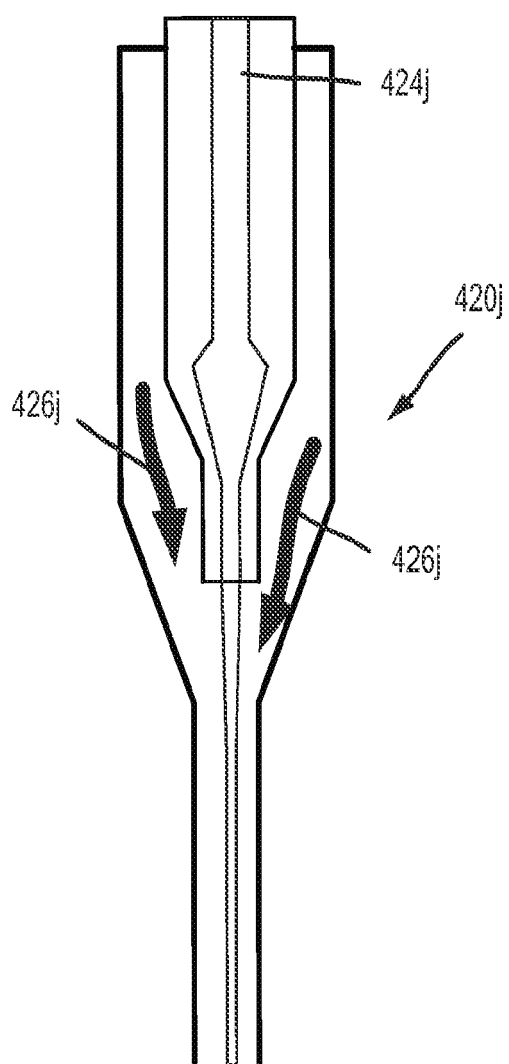


FIG. 4J

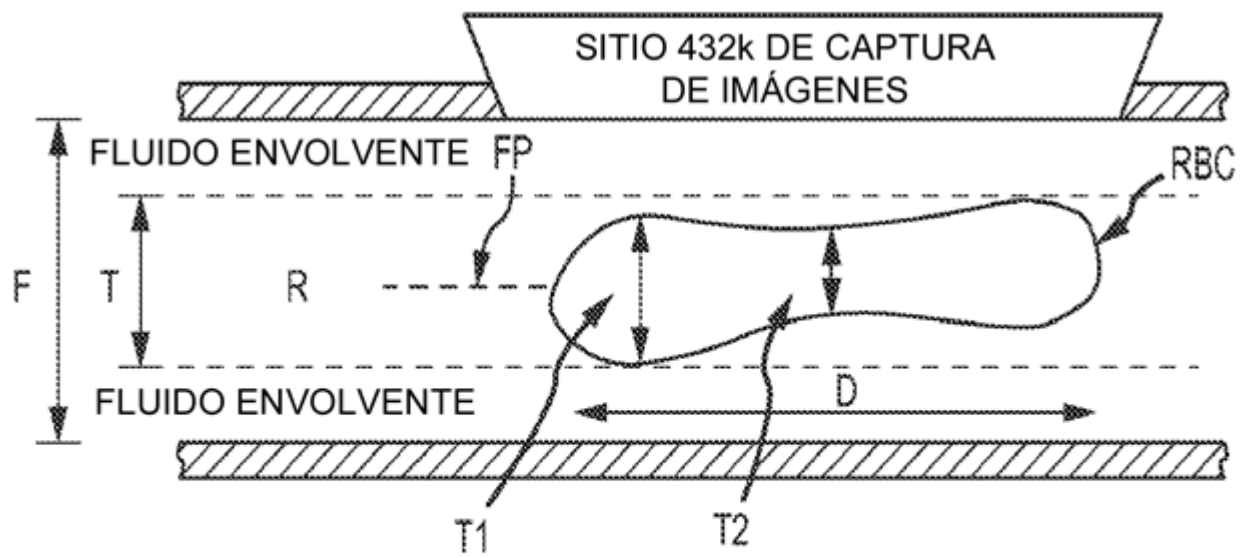


FIG.4K

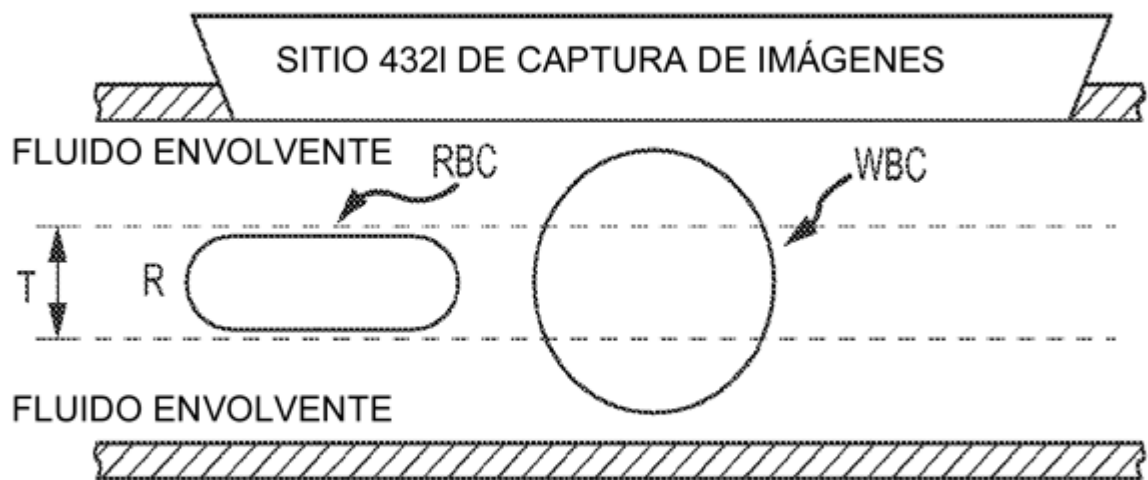


FIG.4L

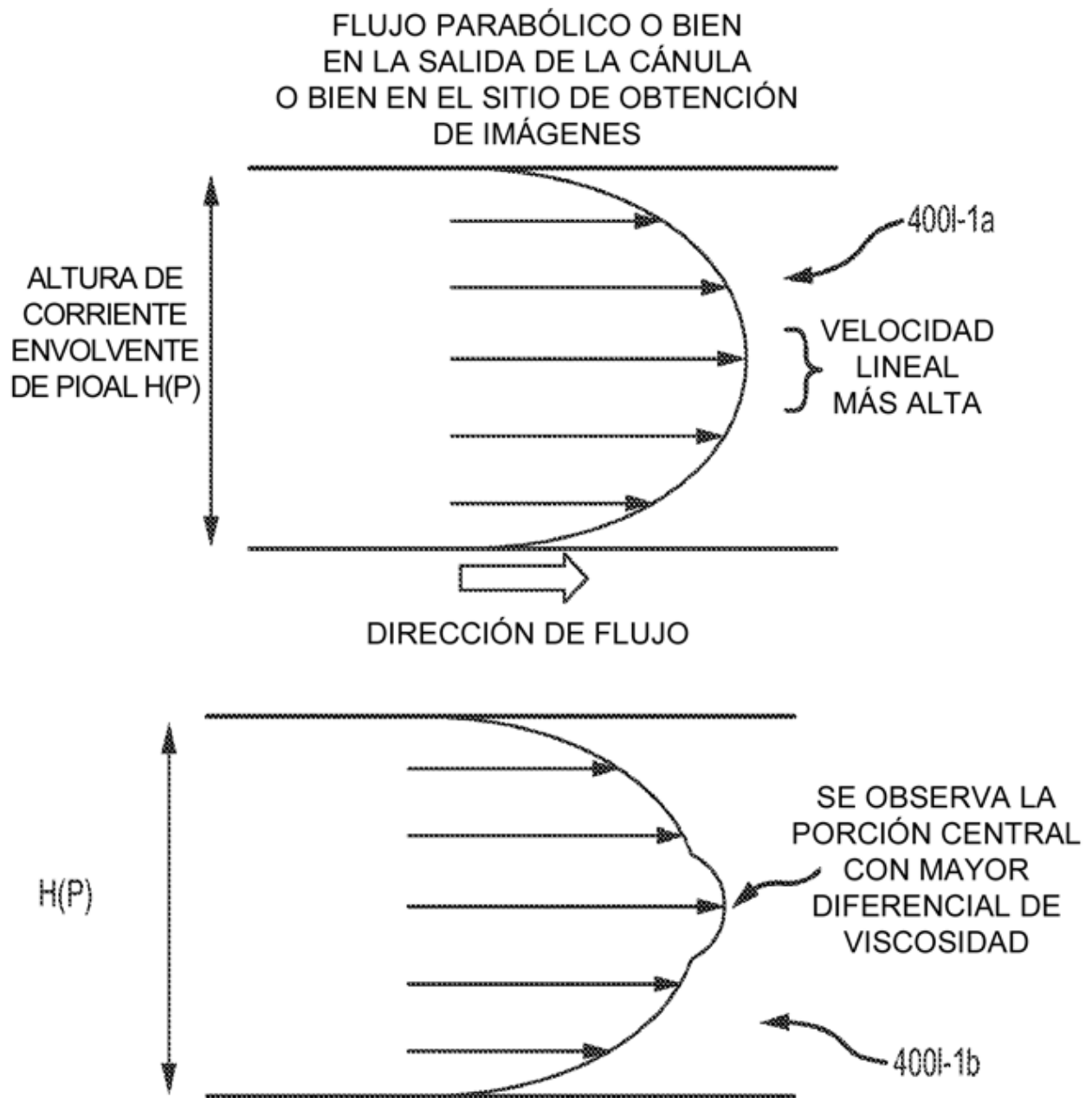


FIG.4L-1

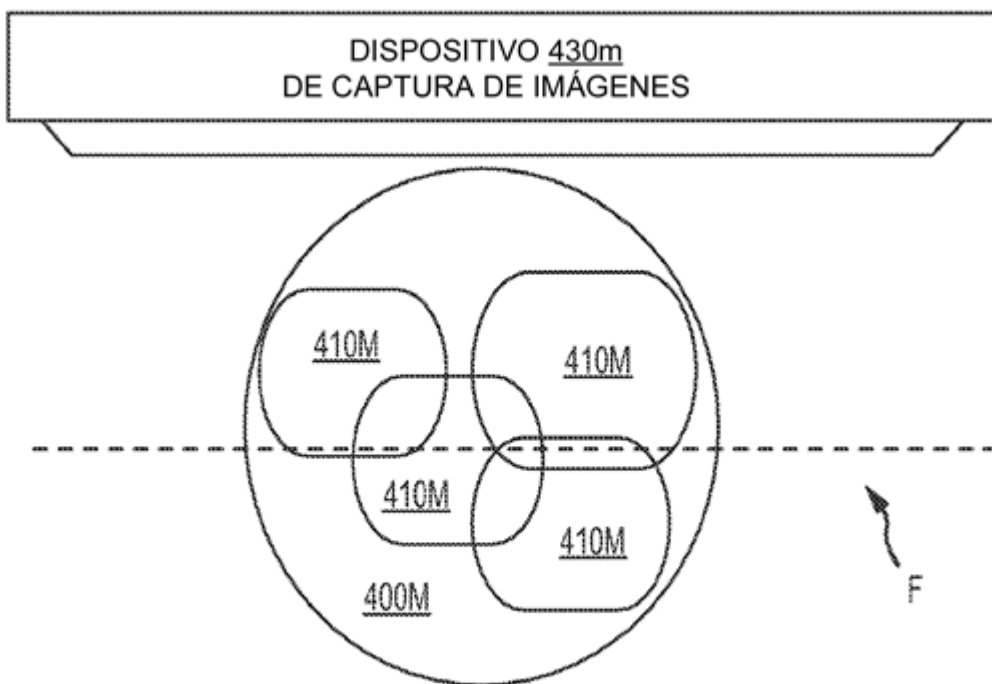


FIG. 4M

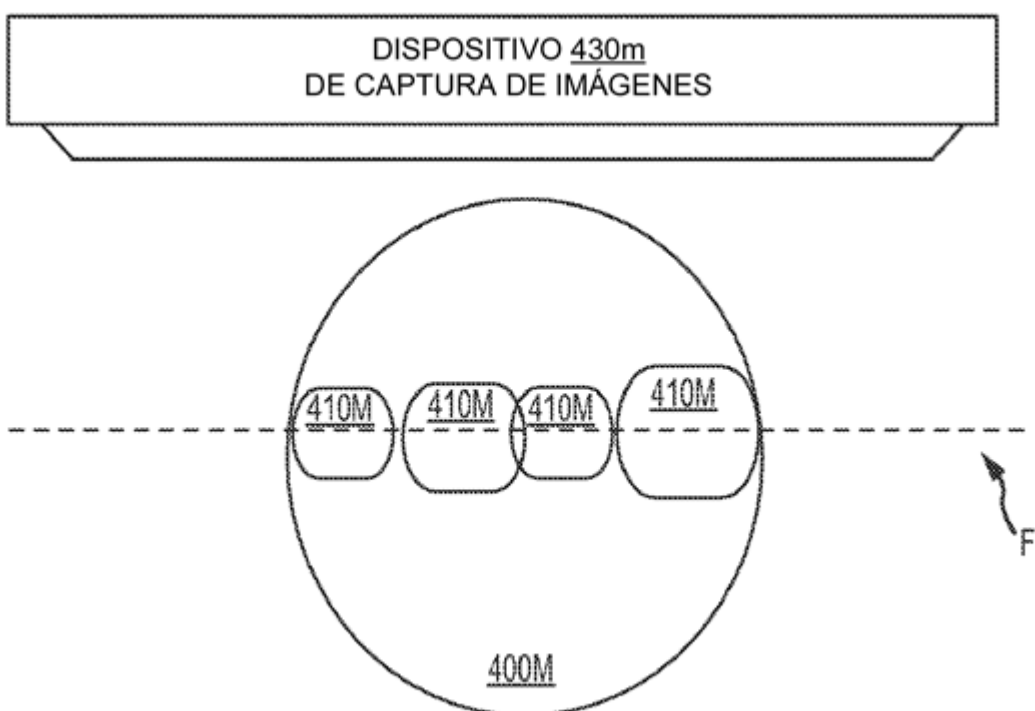
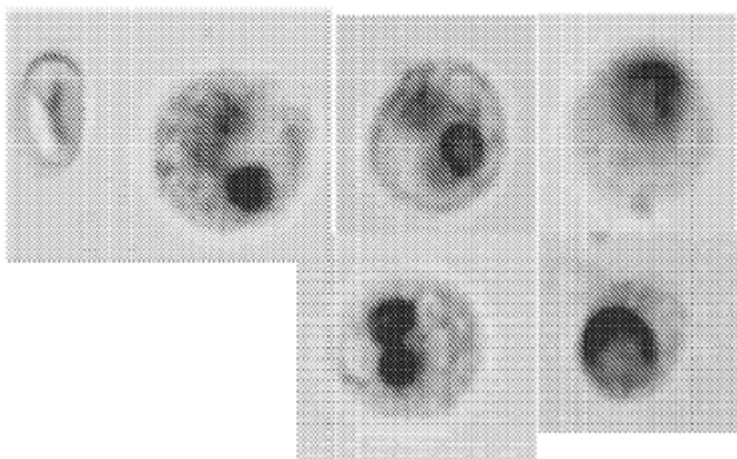


FIG. 4N

PIOAL DA COMO RESULTADO CONTENIDO CELULAR MÁS ENFOCADO

(PIOAL, LÍQUIDO DE ALINEACIÓN DE PARTÍCULAS
Y/U ORGÁNULOS INTRACELULARES)

FLUIDO ENVOLVENTE CONVENCIONAL



PIOAL

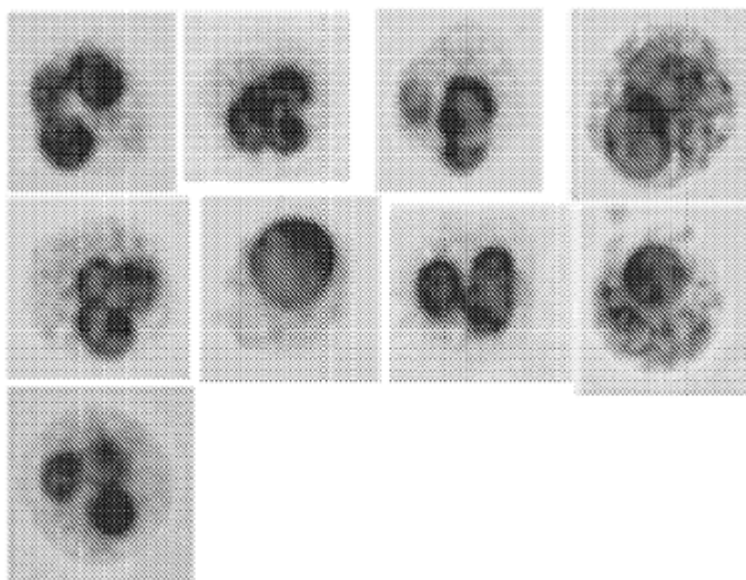
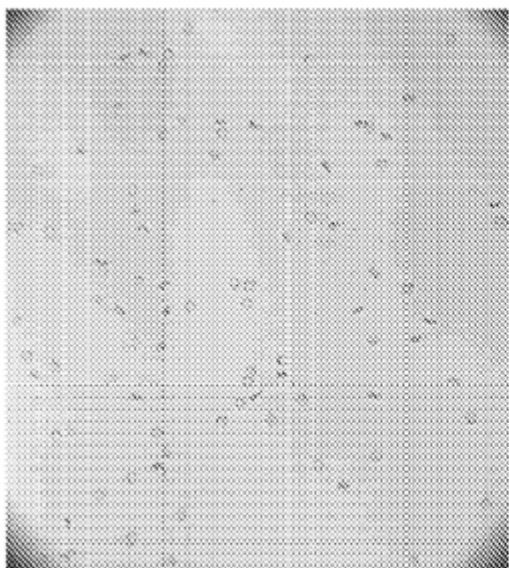
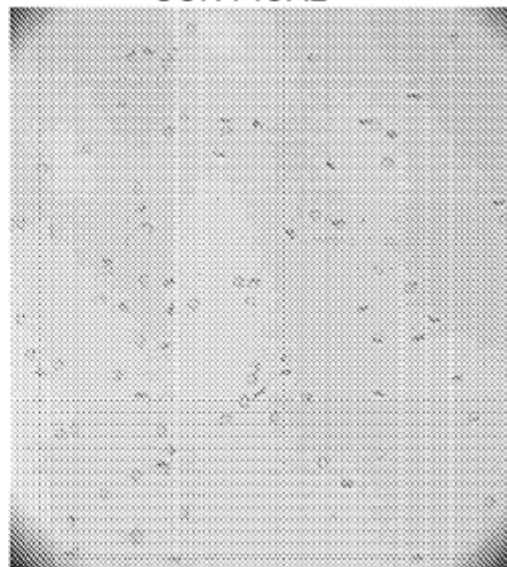


FIG.40

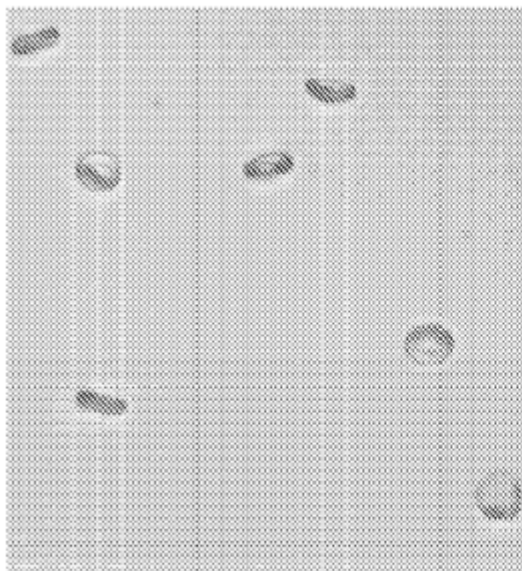
RBC EN CORRIENTE DE MUESTRA CON
FLUIDO ENVOLVENTE CONVENCIONAL



RBC EN CORRIENTE DE MUESTRA
CON PIOAL



RBC EN CORRIENTE DE MUESTRA
A 20 AUMENTOS CON FLUIDO
ENVOLVENTE CONVENCIONAL



RBC EN CORRIENTE DE MUESTRA
A 20 AUMENTOS CON PIOAL

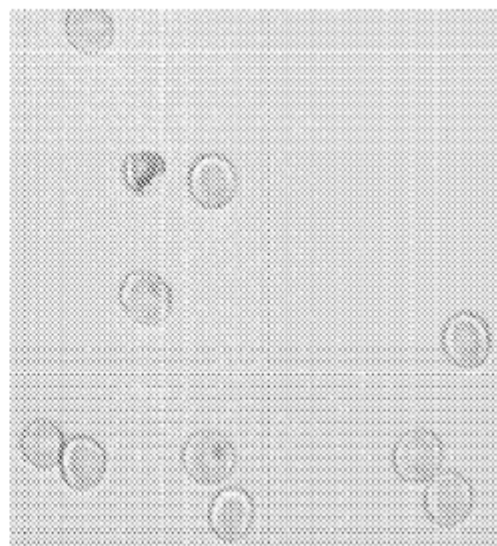


FIG.4P

FIG.4Q

CÉLULA DE FLUJO SIMÉTRICA FRENTE A CÉLULA DE FLUJO ASIMÉTRICA

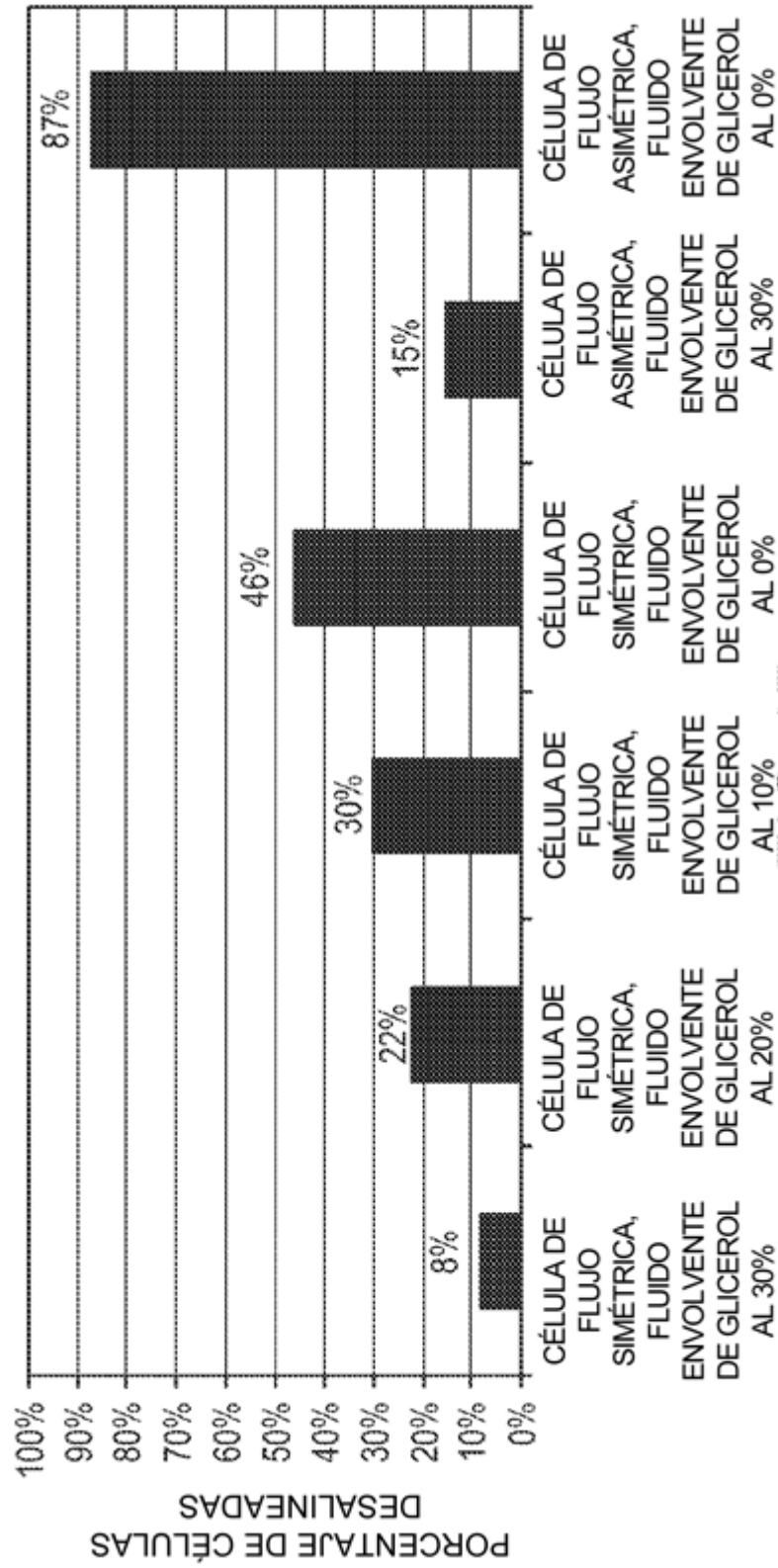
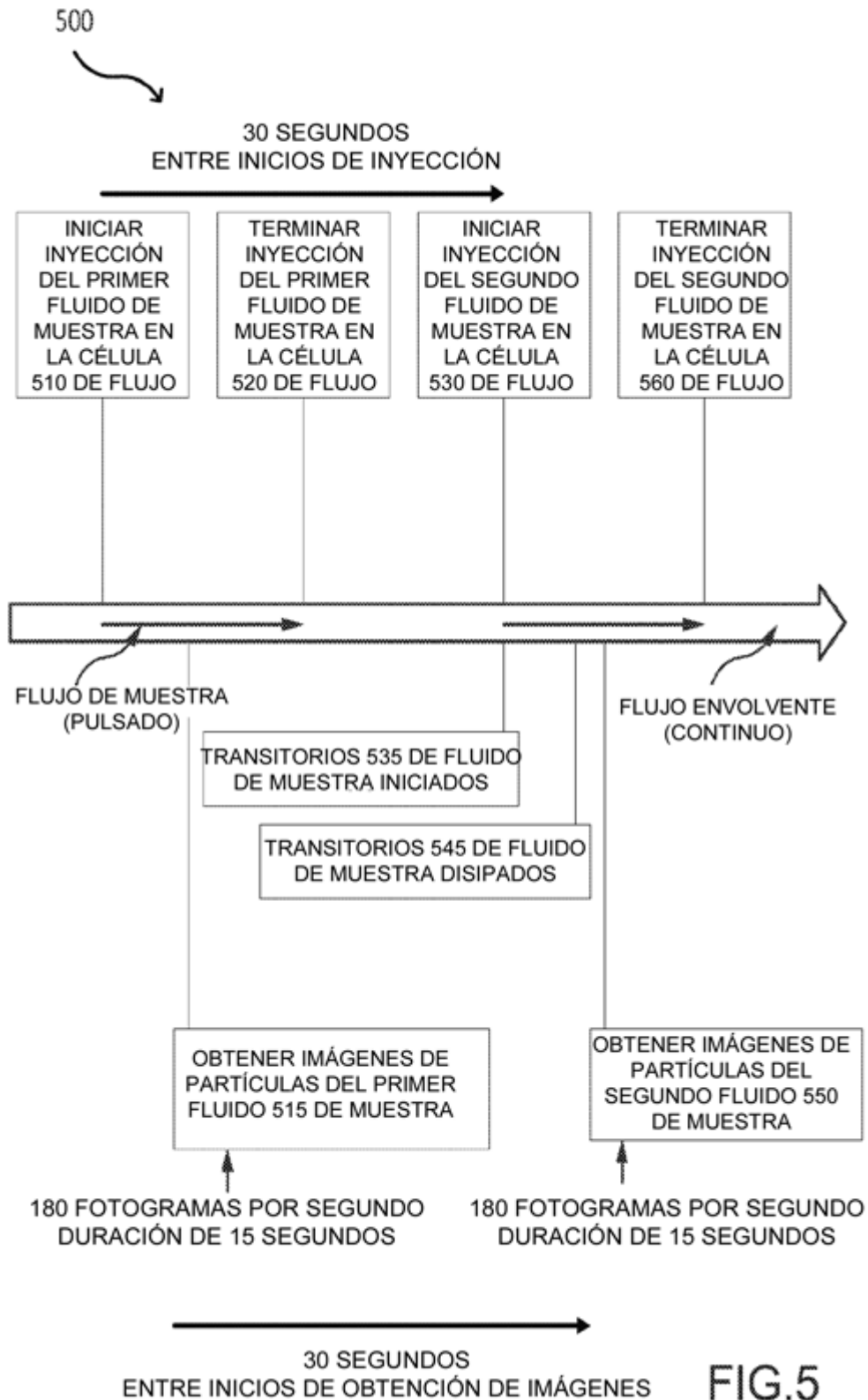


FIG.4R



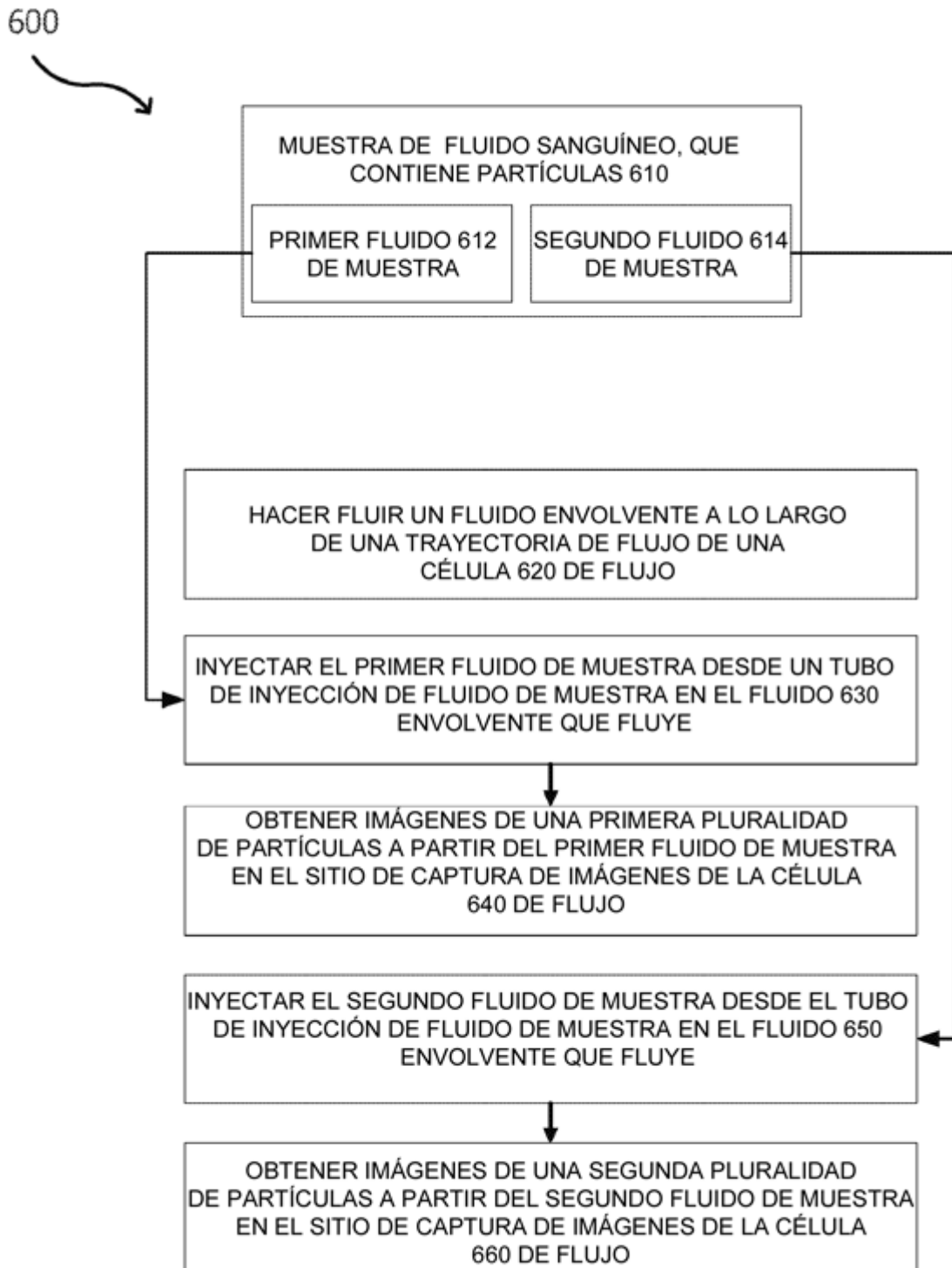


FIG.6

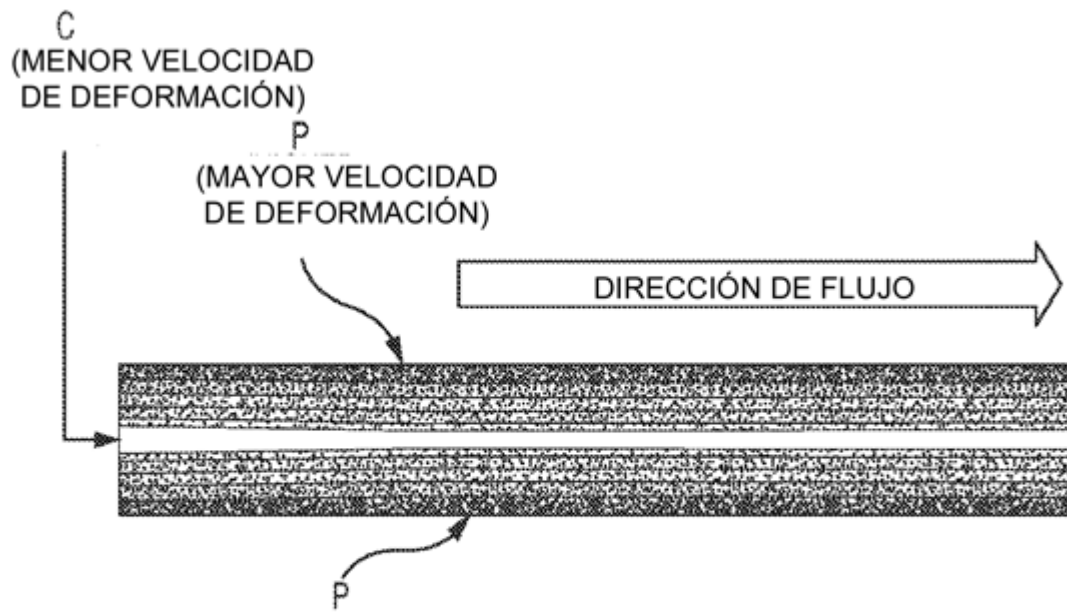


FIG.7

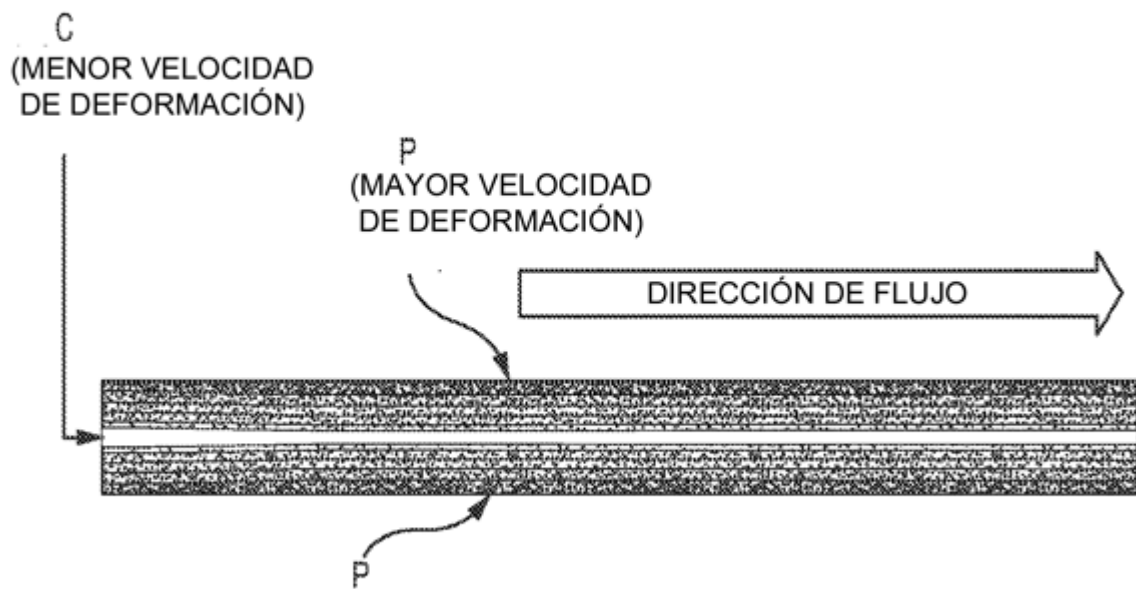


FIG.8

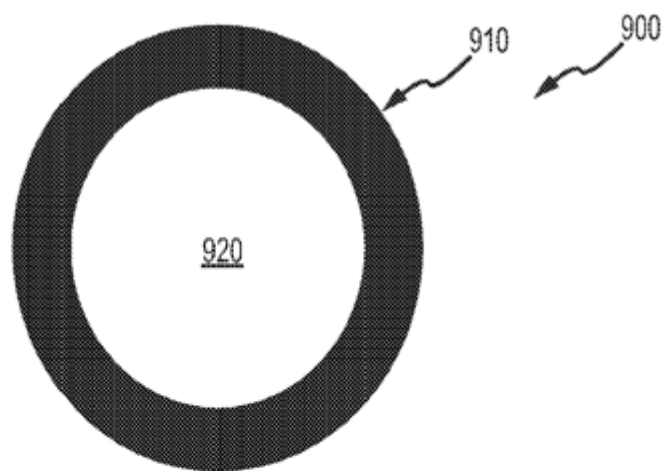


FIG. 9A

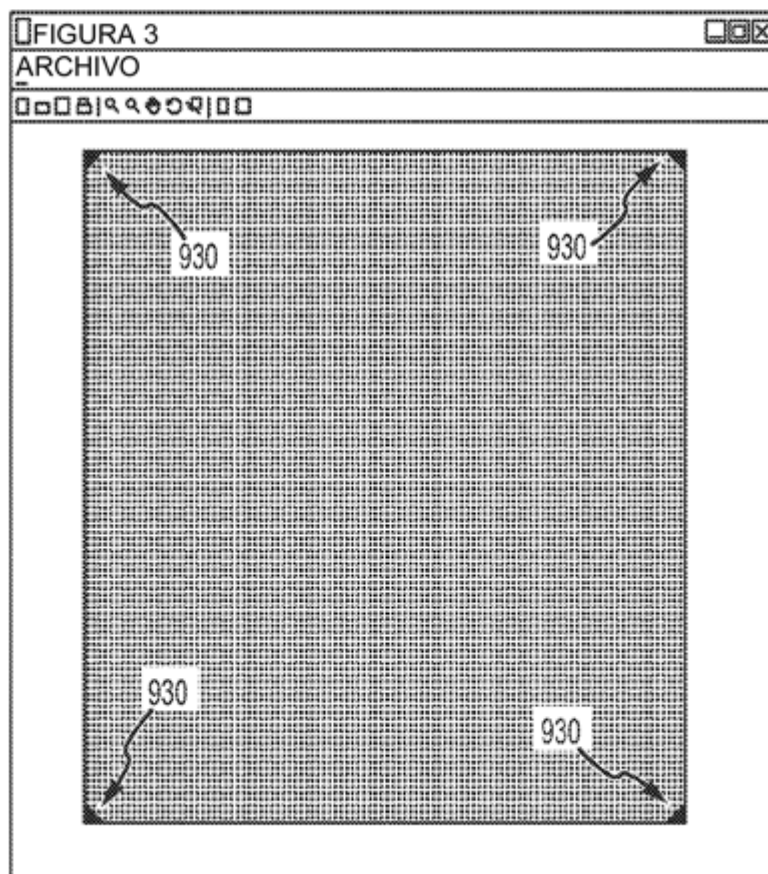
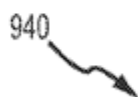


FIG. 9B

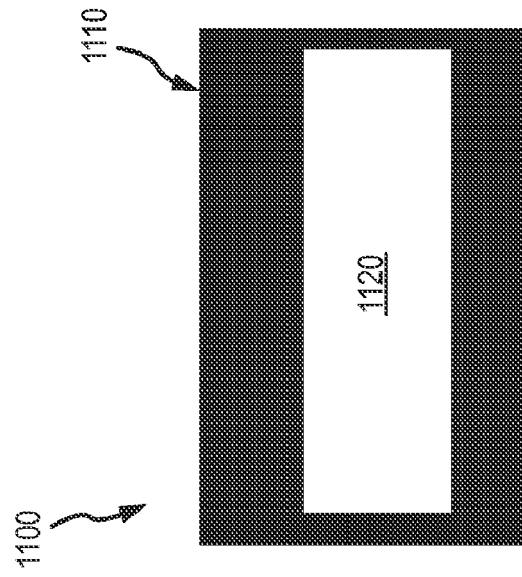


FIG.11

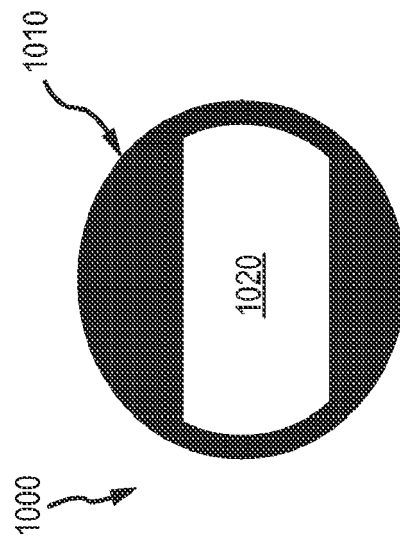


FIG.10

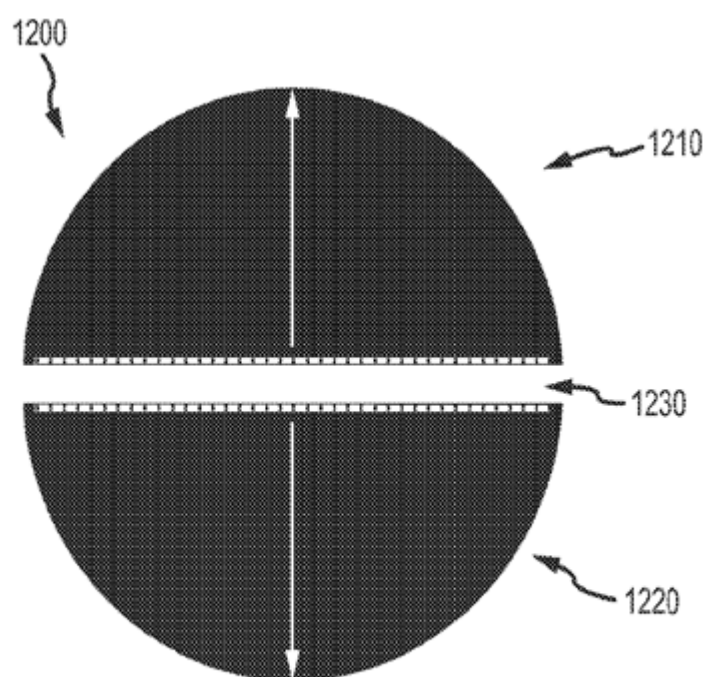


FIG. 12A

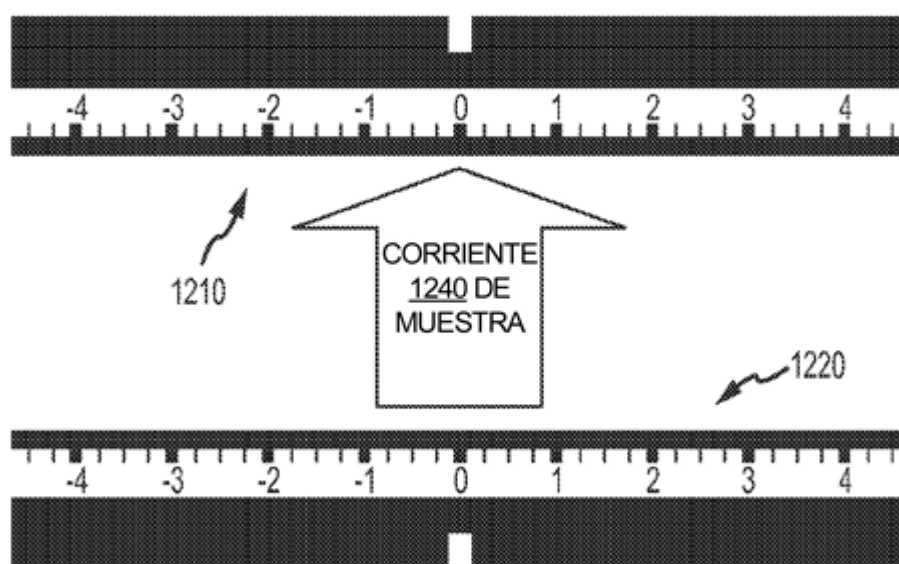


FIG. 12B

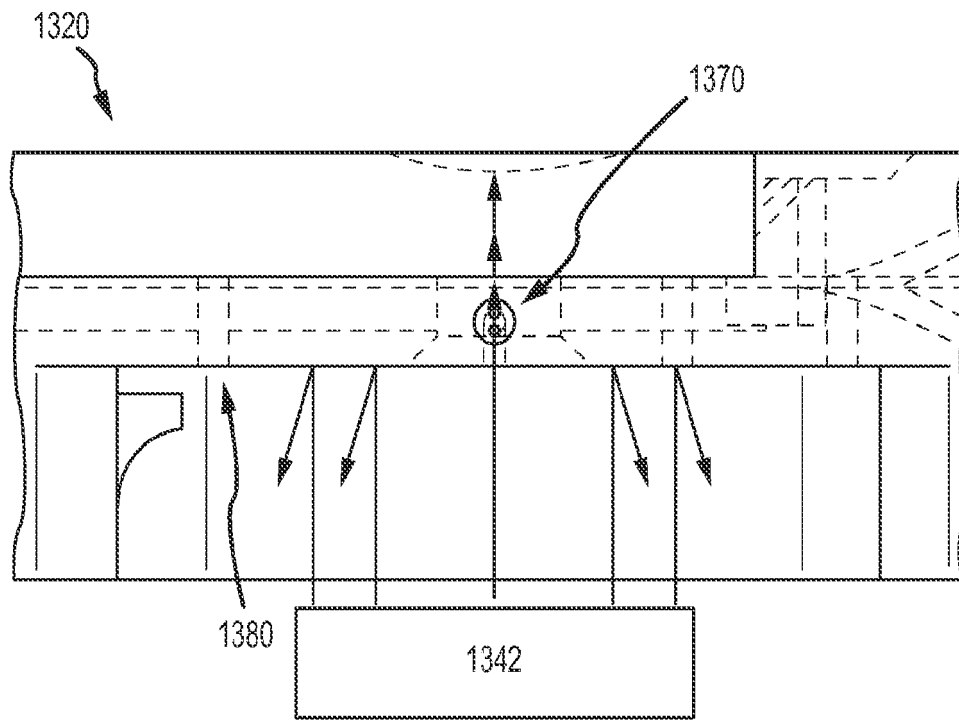


FIG. 13A

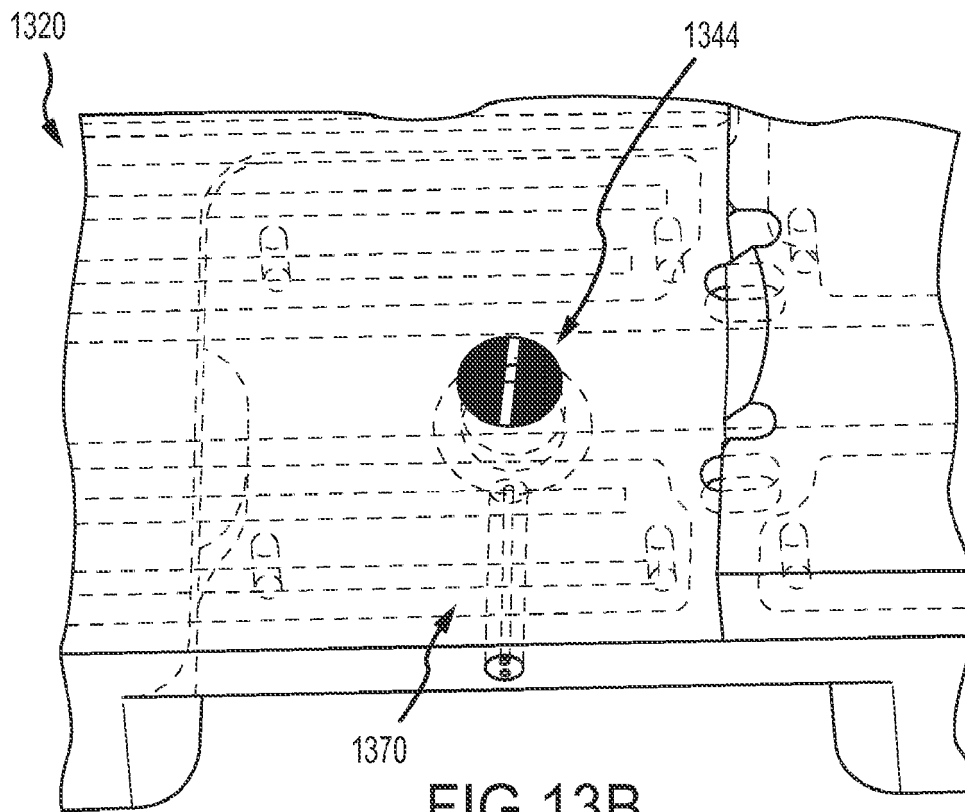


FIG. 13B

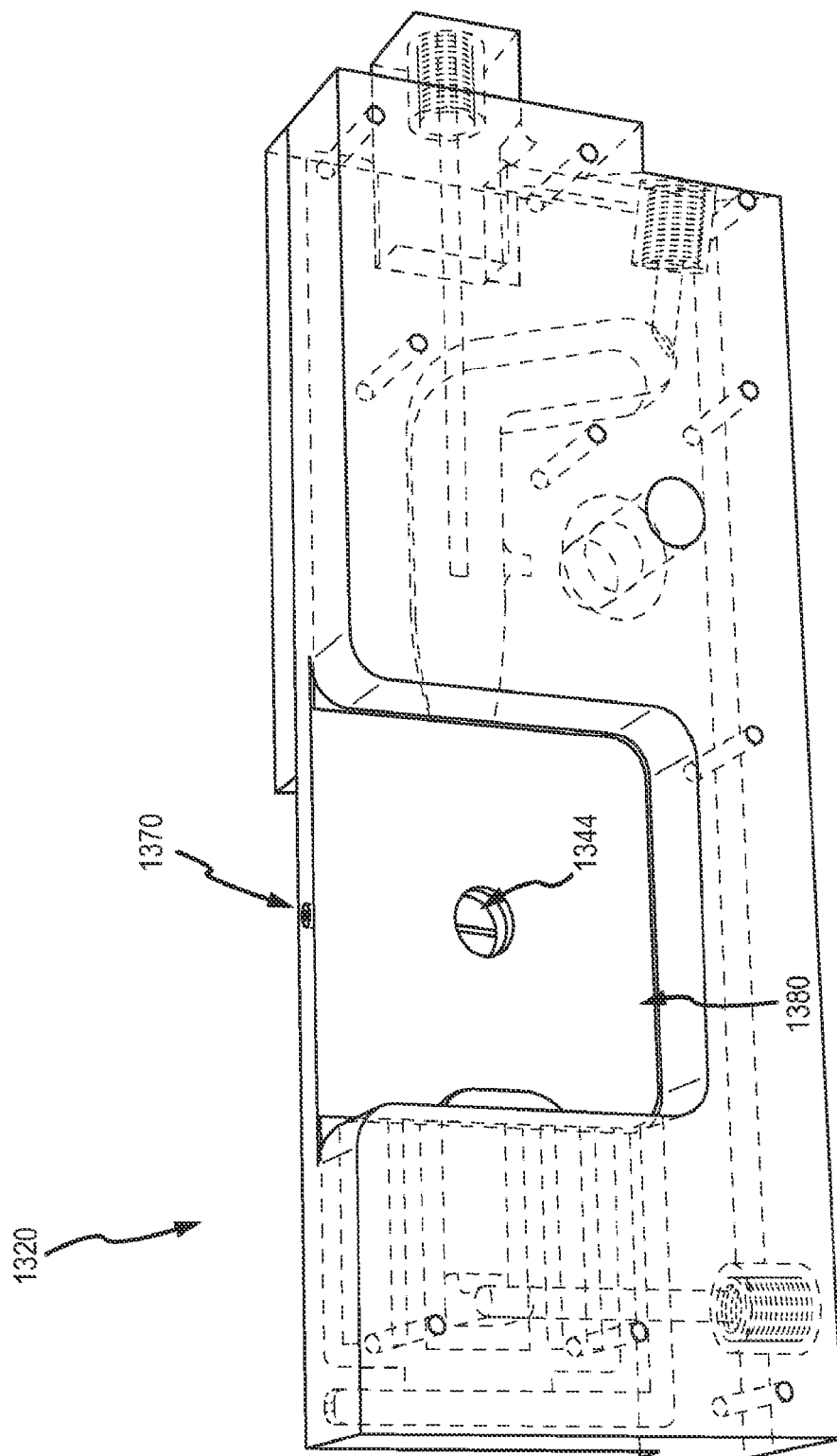


FIG.13C

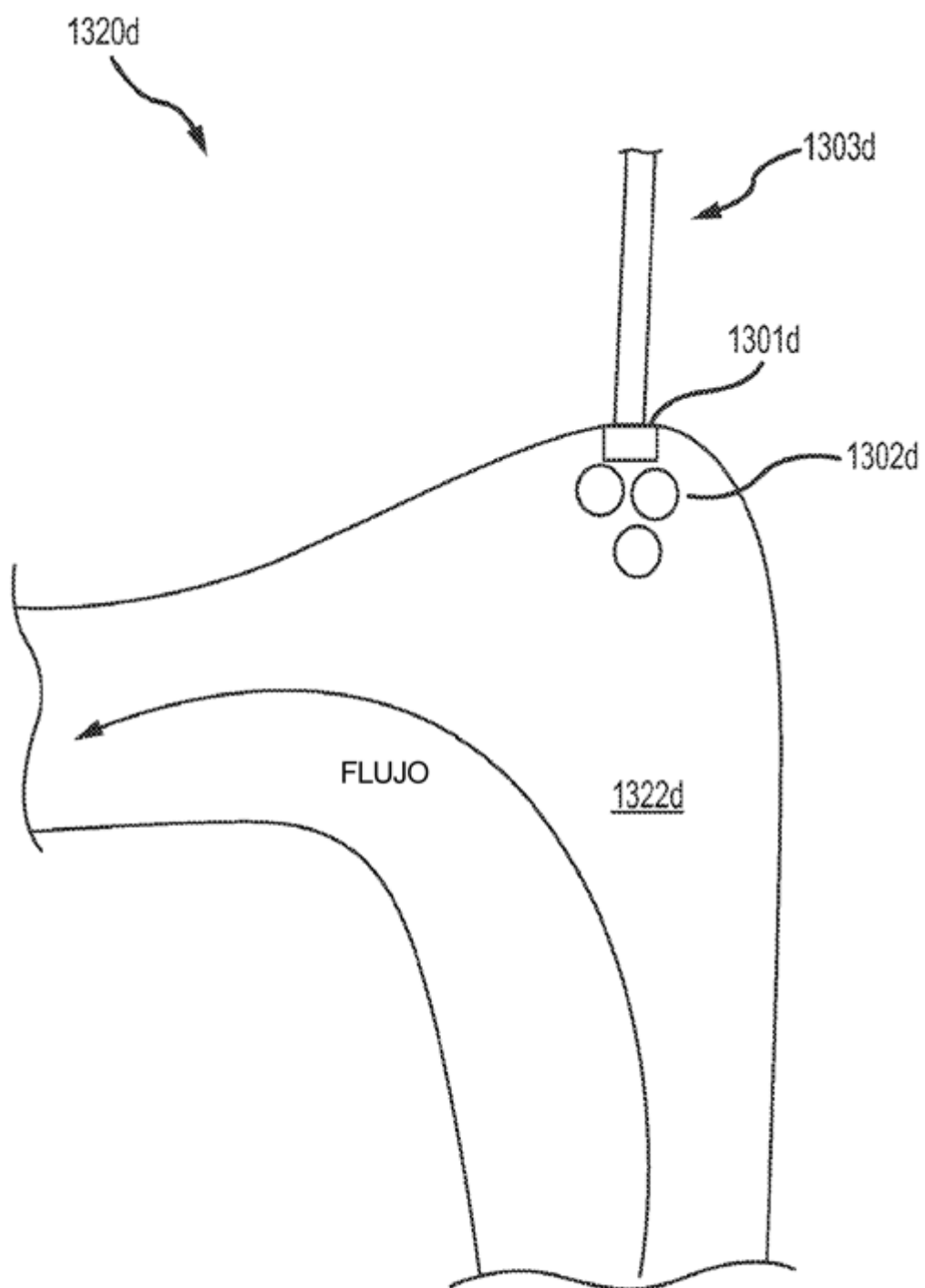


FIG.13D