

385591

P.- 46.318

OLP 997



7 ENE. 1971

Memoria descriptiva

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE <u>G 01</u> <u>812</u>
SUBCLAS <u>n</u> <u>k</u>

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de CORNELL AERONAUTICAL LABORATORY, INC.

entidad / de nacionalidad norteamericana

con domicilio en 4455 Genesee Street, Buffalo, Nueva York,
Estados Unidos de América.

por: "UN APARATO PARA IDENTIFICAR PARTICULAS ESPECIFICAS DE
MICROESTRUCTURAS DIVERSAS DENTRO DE UN FLUIDO"

(Clase Internacional G01n)



7 JUN 1971

5 El presente invento se refiere en general a un aparato para identificar partículas específicas de microestructuras diversas dentro de un fluido. Más concretamente, el invento se refiere a un aparato capaz de diferenciar, contar, clasificar y recoger partículas de una muestra de fluido.

10 Por cuanto el invento es de la máxima utilidad para el análisis de muestras de sangre, en la descripción que sigue se expondrá el uso del aparato en relación con la sangre como la muestra de fluido, aunque será fácilmente evidente para los expertos en la técnica que el invento tiene un mayor campo de aplicación y que puede ser utilizado como por ejemplo, cuando se desea, identificar y/o clasificar partículas de microestructuras.

15 La práctica clínica corriente implica el análisis de muestras de la sangre de un paciente para determinar el tipo, la cantidad y las características de los diversos elementos formados de la misma; los cuales, como es bien sabido, comprenden: glóbulos rojos o hematíes, -
20 cinco variedades principales de glóbulos blancos o leucocitos, y plaquetas. La técnica corriente consiste en depositar una pequeña cantidad de sangre completa sobre una -
platina de microscopio, tenerla y observar físicamente, -
diferenciar y contar los corpúsculos que contienen la san-
25 gre.

30 Se conocen actualmente varios dispositivos con los que se trata de automatizar el recuento de la sangre. Estos, en su mayor parte, son capaces de contar glóbulos rojos y, por tratamiento por descomposición química, el total de glóbulos blancos. Ninguno de estos dispositivos

385591



7 ENE 1971

5 conocidos puede diferenciar en tiempo real las cinco variedades básicas de glóbulos blancos, ni sirven para todas las células, incluidas las plaquetas, sin procedimientos secundarios, y ninguno de ellos sirve para clasificar y reservar la célula muestreada.

10 De acuerdo con una de las prácticas actualmente conocidas, se diluye una muestra de sangre y, para contar los glóbulos blancos o leucocitos, se descompone una parte de la muestra para destruir los hematíes y se impulsa con bomba a través de una cámara de observación iluminada en campo oscuro. Al pasar cada partícula a través de la cámara un receptor fotográfico registra la dispersión de luz hacia adelante originada por los leucocitos. Para contar los hematíes, la muestra que queda sin descomponer se diluye más y se impulsa con bomba a través de la cámara. Este dispositivo no puede diferenciar entre tipos de células, y la muestra es destruida en el ensayo.

20 En otra práctica conocida se utiliza un fluido conductor para diluir la muestra. Al pasar el fluido a través de la cámara de muestreo, cambia la conductividad del fluido debido a la presencia de las células. Es posible la diferenciación entre hematíes y leucocitos debido al tamaño relativo de las dos clases de células y a la consiguiente diferencia de conductividad de las células. Este sistema no es fiable para el recuento de plaquetas, y también se destruye la muestra en el proceso.

30 Teniendo presente lo expuesto en lo que antecede, hemos proporcionado en líneas generales un aparato de acuerdo con el invento para identificar partículas específicas de microestructuras diversas dentro de un fluido,

385591



17 ENC.

5 caracterizado por medios de conducción que contienen una muestra de dicho fluido con dichas partículas en el mismo, medios de exploración que exploran eficazmente la microestructura de las partículas individuales en dicho fluido -
10 como consecuencia del paso de dicho fluido por una región definida, medios detectores que responden a dichos medios de exploración para desarrollar una señal de salida eléctrica, y medios para analizar y tratar dicha señal de salida para obtener de la misma una pluralidad de señales -
15 de salida que cada una corresponde a un constituyente en partículas específico de dicha muestra.

 Cuando la muestra de fluido comprende sangre y las partículas que hay en el fluido constituyen los elementos formados de la sangre, el aparato del invento puede -
20 diferenciar entre todos los tipos de células de la sangre sin necesidad de tñido ni de tratamiento de descomposición química. Además, las células no son destruidas mediante su identificación y, si se desea, pueden clasificarse y recogerse las células para posterior análisis.

25 Más concretamente, el invento se refiere a un aparato para uso con fluidos de muestra que contienen partículas que tienen microestructuras que afectan al recorrido de la iluminación desde una fuente de iluminación. Una muestra del fluido puede ser diluida e impulsada con
30 bomba a través de una cámara de observación microcapilar para flujo sustancialmente sucesivo de las partículas individuales dentro del fluido. La microestructura de cada partícula puede ser observada mediante un sistema óptico para fase transiluminada. Un dispositivo fotosensible responde a las variaciones de recorrido óptico dentro de una

385591



parte de cada partícula observada, y genera una señal de salida variable indicadora de esas variaciones. La señal de salida puede ser analizada mediante un circuito lógico convenientemente programado el cual desarrolla señales de control que son aplicadas a controladores de flujo para clasificar y recoger las diferentes partículas sobre la base de sus diversas microestructuras.

Cuando se usa sangre como fluido de muestra, el invento se basa en el hecho de que cada tipo de células de la sangre presenta una microestructura que tiene su propia configuración arbitraria espacial, la cual no varía con el tamaño ni con la madurez de la célula. Es decir que la distribución espacial de las densidades ópticas para cada una de las configuraciones de microestructura es específica para cada tipo de célula. Así, los tipos de células individuales pueden identificarse por las diferencias en sus microestructuras. Hemos llegado a determinar que no es necesario observar ni explorar la microestructura completa de cualquier célula dada para poder llegar a identificarla, pudiendo obtenerse información suficiente para la identificación de la célula explorando u observando solamente la parte de la microestructura contenida dentro de una estrecha rebanada a través de una célula orientada arbitrariamente, mientras ésta pasa a través de los medios de conducción, los cuales pueden comprender un tubo microcapilar.

Puesto que la célula y su microestructura presentan sustancialmente el mismo color y el mismo contraste, el uso de iluminación no coherente no permitirá usualmente ver la microestructura. No obstante, puesto que exis

385591



7 ENVI

5 ten pequeñas diferencias de recorrido óptico dentro de la microestructura de la célula, es posible utilizar unos medios detectores que respondan a tales diferencias de recorridos. La señal desarrollada por tales medios detectores, convenientemente analizada y tratada, puede ser traducida para identificación del tipo de célula particular que generó tal señal. De esta manera el aparato puede funcionar en tiempo real para diferenciar, contar, clasificar y recoger los elementos formados de la sangre completa.

10 Una vez identificada la partícula que pasa a través de los medios de conducción, el presente invento permite segregarla mediante la provisión de medios adecuados que controlan el flujo de partículas, por medio de una pluralidad de tubos flexibles, a una pluralidad de recipientes o vasos de recogida separados. Los tubos pueden ser controlados por elementos piezoeléctricos, electrostrictivos o magnetostrictivos conectados a ellos, los cuales producen movimiento de los tubos preseleccionados para alinearse con el flujo que sale del tubo microcapilar en respuesta a la señal de control.

20 Los objetos y ventajas del invento serán evidentes de la descripción detallada que sigue, considerada juntamente con los dibujos que se acompañan, en los que:

25 La figura 1 es una representación esquemática del aparato de acuerdo con el presente invento; con partes del mismo representadas en forma de bloques;

la figura 2 es una vista en corte tomada a través de la línea 2-2 de la figura 1;

30 la figura 3 es una vista en corte tomada a través de la línea 3-3 de la figura 1;

385591



la figura 4 es un esquema más detallado del analizador de señal de la figura 1, en que se ilustran los componentes usuales del mismo en forma de bloques;

5 la figura 5 es una representación gráfica que sirve de ejemplo del espectro de energía relativa en función de la frecuencia para los diversos tipos de leucocitos de la sangre;

la figura 6 es un diagrama funcional esquemático del clasificador ilustrado en la figura 1;

10 la figura 7 es una vista en corte del clasificador ilustrado en la figura 1; y

la figura 8 es una vista similar a la de la figura 1 que ilustra una modificación.

15 Como anteriormente se ha indicado, aunque la descripción que se hace es de aplicación en el campo del análisis de la sangre, se hace resaltar también que ello se ha hecho únicamente con fines ilustrativos, y no debe entenderse como una limitación de los conceptos del invento a este campo particular.

20 En la sangre humana normal hay siete elementos formados, los cuales están en forma de células o de fragmentos de células que son vertidos en la sangre y que son producidos por la médula de los huesos y por otras fuentes. Los elementos formados están en suspensión en una solución
 25 de plasma salina. Las células ocupan aproximadamente el 50% del volumen total de la sangre en circulación. Los glóbulos blancos o leucocitos son verdaderas células con núcleos y con movilidad activa; son los mayores de los elementos formados y su tamaño varía entre 12 micras y 20
 30 micras. Hay cinco tipos de glóbulos blancos; a saber: neu-



7 [illegible]

trófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos. Los otros elementos formados de la sangre son los hematíes o eritrocitos (glóbulos rojos) y los trombocitos (plaquetas). El número medio de elementos formados por milímetro cúbico de sangre es el siguiente:

5

<u>TIPO DE "CELULA"</u>	<u>NÚMERO</u>
Eritrocitos	5,40 x 10 ⁶
Neutrófilos	4,40 x 10 ³
Eosinófilos	0,20 x 10 ³
10 Basófilos	0,04 x 10 ³
Linfocitos	2,50 x 10 ³
Monocitos	0,30 x 10 ³
Trombocitos (plaquetas)	250 x 10 ³

15

Los leucocitos tienen una densidad óptica neutra y son bastantes flexibles y de fácil modificación de su forma, en general esférica. Los eritrocitos (hematíes o glóbulos rojos) son fragmentos de células que no contienen núcleo. Todos los hematíes tienen aproximadamente el mismo tamaño y la misma forma, y son discos bicóncavos de 7,2 micras de diámetro por 2,4 micras de grueso. Son bastante flexibles y bastante densos ópticamente debido al contenido en hemoglobina. Los trombocitos o plaquetas son los elementos formados más pequeños. Tienen aproximadamente 2 micras de diámetro y contienen un gránulo bastante -

20

25

Con referencia ahora a los dibujos, y más concretamente a la figura 1, se ha representado esquemáticamente un recipiente para muestra en 10, con una parte inferior de forma cónica alrededor de la cual están situados una pluralidad de hilos eléctricos que forman bobinas

30

385591



7

11 para cooperar con un agitador 12 montado interiormente. Las bobinas 11 están conectadas a una fuente adecuada de energía eléctrica (no ilustrada).

5 Situado junto al recipiente 10 de muestra hay un vaso 13 para entregar una cantidad medida de sangre no diluida al recipiente 10. Para este fin, un miembro de - pistón 14 se aplica a deslizamiento a la pared cilíndrica interior del vaso 13, para entregar la sangre no diluida desde una entrada 16 a una salida 18, la cual comunica con el recipiente 10.

10 Junto al recipiente 10 se ha dispuesto un vaso 20 de suministro de diluyente para suministrar una cantidad medida de fluido diluyente, tal como una solución salina, a un recipiente 10 de muestra. Un pistón 22 desliza dentro de la pared cilíndrica del vaso 20 y controla la - entrega de diluyente desde una entrada 24 a una salida 26, la cual está en comunicación de fluido con el recipiente 10.

20 Un pistón 28 está recibido a deslizamiento en el recipiente 10 para entregar la mezcla de sangre y diluyente a través de la parte cónica inferior 30 del mismo a una conducción 32 cilíndrica enteriza o convenientemente acoplada. Pueden hacerse funcionar pistones, 14, 22 y 28 para proporcionar un caudal constante, mediante cualquier número de actuadores usuales adecuados (no ilustrados). Alternativamente puede proveerse cualquier estructura adecuada para mezclar y entregar la sangre y el diluyente con un caudal constante.

25 La conducción 32 comunica con un paso 33 microcapilar de diámetro reducido, el cual, como se ha ilustra-

385591



do en la figura 2, es de sección transversal rectangular aplastada. El tamaño del paso 33 debe ser suficientemente pequeño para permitir que las partículas pasen a su través en sustancialmente una sola fila. Cuando las partículas son los elementos formados de la sangre completa, se ha comprobado que es apropiado un tamaño del orden de 8 por 10 micras. El paso microcapilar 33 convenientemente dimensionado, ilustrado en las figuras 1 y 2, puede fabricarse a partir de un par de placas ópticamente transparentes, tales como de vidrio, 330 y 332, que tienen emparejada entre ellas una capa 334 que puede haberse depositado en vacío y haberse tratado con una protección o máscara apropiada para evitar que se efectúe el depósito de esa capa en una tira central de la placa de vidrio. Cuando se combinan las placas 330 y 332, esa tira central en que no se ha efectuado el depósito formará entonces el paso capilar 33. Es de señalar que puede emplearse cualquier otra técnica adecuada para conseguir un paso capilar de las dimensiones requeridas. La conducción 32 se acopla a una parte 336 de boca de forma de embudo del emparedado de vidrio, por medio de un tapón elástico 338 ó similar.

Junto al paso microcapilar 33 se dispone un sistema óptico de fase para ampliar y observar el flujo de partículas a su través, cuyo sistema comprende: una fuente de iluminación 34, un diafragma 36 que tiene una abertura central 38, lentes condensadoras 40, lentes de objetivo 42 y una placa de fase o de difracción 44. El sistema óptico proporciona imágenes de las muestras que pasan a través del paso microcapilar 33 sobre un plano de imagen 46, en el cual hay situado un dispositivo fotosensible

385591



7 ENE 19

5 adecuado 48, ilustrado a escala considerablemente amplia-
da para mayor claridad, el cual puede comprender típicamen-
te un fotodetector planar de silicio NPN. El tamaño del -
dispositivo fotosensible o detector 48 es tal, con respec-
to al tamaño de la muestra de la que se obtiene la imagen,
un leucocito por ejemplo, que solamente una rebanada de -
sección transversal delgada de la imagen de la célula atra-
viesa el detector al pasar a través del paso microcapilar
10 33, cuya imagen se ha representado en 33i en la figura 3.
La señal procedente del detector 48 es alimentada a tra-
vés de la línea 49 a un amplificador de señal A en el cual
es convenientemente ampliada, y la salida del mismo es con-
ducida por la línea 49.

15 Como se ha ilustrado en la figura 3, un segundo
fotodetector 50 está situado junto al detector 48 y res-
ponde a la iluminación que incide fuera de la imagen pro-
yectada 33i para compensar los cambios en los niveles de
iluminación desde la fuente de iluminación 34, como es -
corriente. La señal de iluminación de referencia es con-
ducida por la línea 51, la cual va al amplificador A.
20

La señal procedente del detector 48 es alimenta-
da a un analizador de señal 52 por la línea 49'. Como se
ha ilustrado en la figura 4, el analizador de señal com-
prende una pluralidad de filtros de banda estrecha 520,
25 522 y 524, los cuales entregan señales respectivamente a
una pluralidad de detectores o filtros de paso bajo 526,
528 y 530 a través de líneas 532, 534 y 536. Los detecto-
res 526, 528 y 530 entregan señales a los circuitos 538,
540 y 542, respectivamente, a través de las líneas 544,
30 546 y 548. Los circuitos 538 y 542 son circuitos de um-

385591



7000

bral, los cuales podrían comprender típicamente circuitos de báscula de Schmidt, mientras que el circuito 540 es un circuito de umbral variable, el cual podría comprender típicamente un comparador electrónico usual. La salida del detector 526 es también alimentada al comparador 540 a través de una bifurcación de la línea 544, como se ha ilustrado.

Con referencia nuevamente a la figura 1, las señales de salida de los circuitos 538, 540 y 542 son entregadas a un circuito lógico 54 a través de líneas 56, 58 y 60, respectivamente. Como se estudiará con mayor detalle en lo que sigue, el circuito 54 podría comprender típicamente un circuito lógico binario de tres bits, el cual puede producir hasta ocho salidas de decisión en respuesta a tres entradas. Las señales de salida del circuito 54 son entregadas a un contador 62 por las líneas 64, 66, 68, 70, 72, 74 y 76. Señales ramificadas de las líneas 64, 66, 68, 70, 72 y 74 son entregadas respectivamente para el control de un clasificador 78 por líneas 80, 82, 84, 86, 88 y 90. Las señales del contador 62 pueden ser alimentadas a indicadores y/o registradores adecuados por líneas 92, 94, 96, 98, 100, 102 y 104.

El clasificador 78 está convenientemente unido de modo fijo al emparedado de vidrio 330, 332, de tal modo que el paso capilar 33 comunica con el interior del mismo, como se ha ilustrado en la figura 7. Con referencia a las figuras 6 y 7, el alojamiento 78 del clasificador tiene fijados a la superficie externa inferior del mismo una pluralidad de vasos de recogida de muestra dispuestos circularmente 780, 782, 784, 786, 788, y 790, al-

385501



7 ENE

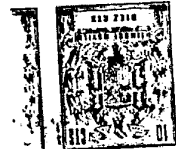
rededor de un vaso de recogida central 792. Una pluralidad de dispositivos motores 794, 796, 798, 800, 802 y 804 están fijados por un extremo al interior del alojamiento 78 del clasificador y, respectivamente, por sus otros extremos a una pluralidad de tubos de recogida flexibles 806, 808, 810, 812, 814, y 816, los cuales están dispuestos circularmente en un extremo alrededor del eje longitudinal del paso capilar 33. Los tubos pasan a través de aberturas en la base del clasificador 78, comunicando los extremos inferiores de cada uno de ellos, con el interior de su respectivo vaso de recogida 780, 782, 784, 786, 788 y 790. Un tubo central 818 que tiene un extremo superior abocinado es coaxial con el paso capilar 33 y está en comunicación con el vaso de recogida central 792, como se ha ilustrado en la Figura 7. Las señales procedentes del circuito lógico 54 por las líneas 80, 82, 84, 86, 88 y 90, son alimentadas respectivamente a dispositivos motores 794, 796, 798, 800, 802 y 804, para la actuación de los mismos.

Los dispositivos motores 794, 796, 798, 800, 802 y 804 pueden ser de los tipos: piezoeléctrico, electroestrictivo o magnetoestrictivo, los cuales, como es bien sabido, se alargan en respuesta a una señal aplicada.

Se ha previsto una bomba de circulación 820 para mantener un flujo de gas inerte, a través de los tubos de recogida, a los vasos de recogida. Para este fin, hay previstos una pluralidad de pasos de entrada (de los cuales solamente se ha ilustrado uno) entre cada uno de los vasos de recogida y la entrada de la bomba.

En el funcionamiento del aparato descrito en lo que antecede, tal como se aplica para el recuento, la iden

385591



tificación y la clasificación de los elementos formados de la sangre, se mezcla la muestra de sangre con el diluyente en el recipiente 10, por medio del agitador 12 magnético o de otro tipo adecuado. De preferencia se trata la mezcla con un anticoagulante para evitar que se coagule, y puede mantenerse a una temperatura constante por medios adecuados, no ilustrados. El diluyente actúa para proporcionar separación adecuada de las células para asegurar que las células individuales pasarán a través del sistema sucesivamente. Puesto que el tiempo de respuesta del aparato dependerá del espaciamento entre células al pasar éstas a través del paso microcapilar 33, el cual depende a su vez de la cantidad de diluyente, la proporción de diluyente empleada puede actuar para mantener el flujo de células dentro de un tiempo de respuesta razonable para el aparato. Por ejemplo, para un régimen de dilución de 10:1, para observar 1.000 células por segundo sería necesaria una velocidad de las células a través del paso microcapilar de 0,024 metros por segundo.

Si se observan las células bajo iluminación óptica ordinaria no coherente, no será posible discernir sus microestructuras. Ello se debe a que hay solamente una diferencia muy pequeña en recorrido óptico entre la microestructura y las partes circundantes de las células, sin que haya diferencia alguna esencial en cuanto a color o a contraste. Existe solamente una diferencia de fase que no es visible bajo la iluminación ordinaria. No obstante, con la iluminación de fase del presente invento, la estructura o microestructura de granos sustancialmente invisibles de las células, a medida que desfilan a través del capilar 33



7 Ene 71

sucesivamente, se hace visible en el plano de imagen 46.

5 La abertura 38 en el diafragma 36 crea sustancialmente una fuente puntual de luz monocromática que incide sobre las microestructuras de la célula, así como sobre el medio circundante que hay entre ellas. Puesto que las microestructuras tienen índices de refracción que se traducen en recorridos ópticos que difieren de los correspondientes al medio circundante, la radiación que pasa a su través experimenta un cambio de fase con respecto al

10 resto de la radiación. En otras palabras, las microestructuras actúan difractando o desviando el conjunto de los rayos que inciden sobre ellas, mientras que el resto del haz luminoso permanece sin desviar o sin difractar. El haz desviado se ha ilustrado por las líneas de trazos d, mientras que el haz no desviado se ha ilustrado por las

15 líneas de trazo lleno 7 en la Figura 1. Puesto que la diferencia de recorrido entre las microestructuras y el medio circundante es muy pequeña, es bien sabido que el desplazamiento de fase introducido por las microestructuras será igual a un cuarto de longitud de onda. La placa 44 de fase o de difracción actúa introduciendo un desplazamiento de un cuarto de onda adicional entre el haz desviado y el haz no desviado. De esta manera, cuando los haces d y u se combinan o interfieren en el plano de imagen 46,

20 habrá entonces una diferencia de contraste entre las microestructuras de la muestra y el medio circundante, cuya diferencia puede verse y detectarse. Para un estudio más detallado de los fenómenos de sistemas ópticos de fase o de iluminación de fase deberá hacerse referencia a la publicación "Phase Microscopy Principles and Applications" --

25

30

385591



7 Ene 51

5 ("Principios y Aplicaciones de la Microscopía de Fase")
de Bennet, Jupnik, Osterberg y Richards, editada por John
Wiley and Sons, Inc., 1.951. El paso microcapilar 33 es
de preferencia de sección transversal rectangular aplasta-
da, como se ha ilustrado, para evitar la necesidad de co-
rrecciones especiales que serían necesarias con pasos de -
sección transversal circular.

10 La imagen de la célula que pasa a través de la
parte de cámara de observación transiluminada del paso 33
será amplificada a muchos aumentos, a 1.000 aumentos por
ejemplo, y proyectada sobre la superficie del detector 48.
En la Figura 3 se ha representado el tamaño del fotodete-
tor 48 con respecto a la imagen del paso capilar 33i, a -
escala muy ampliada, para mayor claridad. Realmente, el -
15 área sensible del detector es bastante pequeña en compara-
ción con el tamaño de la imagen proyectada de la célula,
y puede ser típicamente del orden 0,10 x 0,10 micras. De
esta manera los componentes individuales de la microestruc-
tura de la célula producirán un valor continuamente varia-
20 ble de la intensidad de luz que incide sobre el detector
48 al desplazarse la célula más allá del área sensible del
mismo.

25 Las variaciones en la intensidad de la radiación
incidente sobre el detector 48 pueden producir una resis-
tencia u otro cambio adecuado dentro del detector, depen-
diendo de la elección particular del detector, la cual ori-
gina una fluctuación del voltaje en la línea de salida 49.
Ese voltaje es amplificado en A, con modulación adecuada
si es necesario desde el detector de referencia 50 por la
30 línea 51, y es alimentado como una señal de entrada en la

385591

7 ENE 1971



línea 49' al analizador de señal 52. Una parte de cada -
imagen de célula amplificada, tan ancha como el detector,
efectúa solamente una pasada a través del detector y sola-
mente son detectadas las microestructuras que están en un
5 plano perpendicular al eje óptico en el punto focal, no -
obstante, como se verá en lo que sigue, la información con-
tenida en tal parte de la imagen de la célula, debidamen-
te analizada, es suficiente para identificar y diferenciar
el tipo de célula.

10 Se ha comprobado que el análisis espectral o de
Fourier de las señales sin tratar desarrolladas por el de-
tector producirá un espectro de potencia diferente para ca-
da tipo de célula; y esto se cumple independientemente del
tamaño, de la madurez y de la orientación de la célula. En
15 otras palabras un análisis de un gran número de células
del mismo tipo proporcionará espectros de potencia sustan-
cialmente idénticos.

Los datos ilustrados por las curvas de la Figu-
ra 5 son ejemplos de espectros de potencia para los cinco
20 tipos de glóbulos blancos, determinados mediante un análi-
sis de Fourier de un gran número de señales sin tratar de
cada tipo de célula. Como se ha ilustrado en la Figura 5,
las curvas se expresan en términos de niveles de potencia
espectral relativa en función de la frecuencia, en ciclos
25 por unidad de longitud. Es de hacer notar que otras técni-
cas de análisis de la señal pueden producir curvas que di-
fieran de las ilustradas en la Figura 5. Estas curvas, sin
embargo, serían también diferentes para cada tipo de célu-
la.

30 Una vez determinados estos distintivos espectros

385591



7 ENE

de potencia, es cuestión relativamente sencilla elegir -
aquellos valores del espectro de potencia relativa dentro
de bandas de frecuencia particulares que diferencien un -
tipo de célula de otro. Por cuanto puede haber muchos va-
5 lores diferenciadores de nivel de potencia relativa/banda
de frecuencia, así como muchas combinaciones diferentes de
los mismos que pueden incorporarse por separado o conjun-
tamente en un diseño particular, los ejemplos que se dan
en lo que sigue han de considerarse únicamente como ilus-
10 trativos de un conjunto de valores que se comportan satis-
factoriamente; pueden usarse otros que se comportarían -
igualmente bien.

Así, a fin de identificar los glóbulos blancos,
las señales procedentes del amplificador A y aplicadas a
15 la entrada del analizador de señal en 49' se analizan por
este para determinar lo siguiente:

- (1) Para un ciclo por unidad de longitud ¿es ma-
yor que 100 la potencia relativa?
- 20 (2) Para seis ciclos por unidad de longitud ¿es
la potencia relativa igual o mayor que la
potencia para un ciclo por unidad de longi-
tud?
- (3) Para diez ciclos por unidad de longitud ¿es
menor que 10 la potencia relativa?

25 De la inspección de la figura 5 puede verse que:
una respuesta afirmativa a la pregunta (1) combinada con
respuestas negativas a las preguntas (2) y (3) identifica-
rán a un neutrófilo; una respuesta negativa a las tres pre-
guntas identificará a un monocito; respuestas negativas a
30 las preguntas (1) y (3), combinadas con una respuesta afir

385591

7 ENE 1971

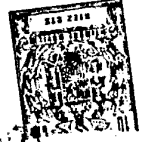


5 mativa a la pregunta (2) identificará a un linfocito; res-
puestas afirmativas a las preguntas (1) y (3) combinadas
con una respuesta negativa a la pregunta (2) identificarán
a un eosinófilo; y respuestas negativas a las preguntas
(1) y (2) combinadas con una respuesta afirmativa a la pre-
gunta (3) identificarán a un basófilo.

10 Debido al gran contenido en hemoglobina de los
glóbulos rojos y puesto que, a diferencia de los glóbulos
blancos, los glóbulos rojos no contienen núcleo ni gránu-
los, tienen un espectro de potencia completamente diferen-
te al que tienen los glóbulos blancos. Aunque no se ha -
ilustrado en la Figura 5, se ha comprobado que la poten-
cia relativa del glóbulo rojo es superior a 100 para 1, 6
y 10 ciclos por unidad de longitud. Por lo tanto, respues-
15 tas afirmativas a las preguntas (1) y (2) combinadas con
una respuesta negativa a la pregunta (3) identificarán un
glóbulo rojo. Siendo las plaquetas el único elemento for-
mado que queda, pueden identificarse cuando se obtiene una
señal que no esté comprendida dentro de ninguno de los már-
20 genes de valores dados en lo que antecede.

25 De acuerdo con la técnica descrita en lo que an-
tecede para identificación, los filtros de banda estrecha
520, 522 y 524 actúan para permitir que aquellas señales
centradas alrededor de tres frecuencias en la relación de
1, 6 y 10 sean pasadas, respectivamente, a los detectores
526, 528 y 530, los cuales actúan para eliminar las per-
turbaciones transitorias de la señal, de una manera cono-
cida. El dispositivo de umbral 538 desarrollará una señal
en la línea 56 solamente si la potencia de la señal en la
30 línea 544 es mayor que un valor predeterminado (mayor que

385591



17 ENF 1971

100 en el ejemplo dado). Así, una señal en la línea 56 sería equivalente a una respuesta afirmativa a la pregunta (1). El comparador electrónico 540 compara la potencia de la señal procedente del detector 528 (para seis ciclos por unidad de longitud en el ejemplo dado) con la procedente del detector 526 (para un ciclo por unidad de longitud en el ejemplo dado), desarrollando una señal en la línea 58 solamente si la potencia en la línea 546 es igual o mayor que la de la línea 544, lo cual equivaldría a una respuesta afirmativa a la pregunta (2) anterior. La unidad de umbral 542 desarrollará una señal en la línea 60 solamente si la potencia de la señal en la línea 548 es menor que un valor predeterminado (menor que 10 en el ejemplo dado). Así, una señal en la línea 60 equivaldría a una respuesta afirmativa a la pregunta (3) anterior. Será por tanto evidente que la presencia o la ausencia de señales en las líneas 56, 58 y 60, en combinaciones particulares predeterminadas, indicará los cinco tipos de glóbulos blancos y los glóbulos rojos. Las señales que no queden comprendidas en estas combinaciones, por un proceso de eliminación, serán representativas de las plaquetas.

Las señales procedentes de las línea 56, 58 y 60 son alimentadas al circuito lógico 54, el cual podría comprender típicamente un descodificador binario de tres bits usual, que actúa en respuesta a tres entradas para proporcionar hasta ocho salidas de decisión, solamente siete de las cuales se usan como representativas de la identidad de cada uno de los cinco tipos de glóbulos blancos, de los glóbulos rojos y de las plaquetas. Así, una señal en la línea de salida 64 podría indicar un neutrófilo; en

385591

7 ENR 1944



la línea 66 podría indicar un monocito, en la línea 68 po-
dría indicar un linfocito; en la línea 70 podría indicar
un eosinófilo; en la línea 72 podría indicar un basófilo;
en la línea 74 podría indicar una plaqueta; y en la línea
5 76 podría indicar un glóbulo rojo. Estas señales se apli-
can a un contador usual o similar 62, el cual lleva la -
cuenta del número de veces que cada tipo de célula es iden-
tificado en tiempo real al pasar las imágenes de las mis-
mas más allá del detector. Las señales procedentes de los
10 contadores por las líneas 92, 94, 96 y 98, 100, 102, 104
pueden ser alimentadas a indicadores adecuados y/o regis-
tradores, los cuales podrían indicar o imprimir los siguien-
tes datos:

- 15 (1) Número de hematíes o glóbulos rojos por mi-
lím metro cúbico de sangre completa.
- (2) Número de plaquetas por milímetro cúbico de
sangre completa.
- (3) Número de glóbulos blancos por milímetro cú-
bico de sangre completa.
- 20 (4) Número de cada tipo de glóbulos blancos.
- (5) Tanto por ciento del total para cada tipo
de glóbulos blancos.

Con referencia de nuevo a las figuras 1, 6 y 7,
las señales de salida, indicadoras del tipo de célula, des-
25 de el circuito lógico 54 pueden emplearse como señales de
control por las líneas 80, 82, 84, 86, 88 y 90 que van al
clasificador 78. Una señal en cualquiera de estas líneas
accionará su correspondiente dispositivo motor 794, 796,
798, 800, 802 u 804, y hará que el mismo se alargue para
30 mover con ello uno de los tubos dispuestos circularmente

385591

7 ENERO 1961



806, 808, 810, 812, 814 u 816 y se traslade directamente
bajo la parte de salida del paso capilar 33 para recibir
el tipo de célula particular asociado con la señal de control. Como se ha ilustrado mediante las líneas de trazos
5 de la Figura 7, el tubo 816 ha sido movido por el dispositivo motor 804 a una posición directamente debajo del paso capilar 33. Las muestras de tipos de células particulares son entregadas a través de los tubos a vasos de recogida 780, 782, 784, 786, 788 y 790. La bomba 820 actúa
10 para mantener un flujo imperativo de gas inerte, tal como de nitrógeno, desde la boca de cada tubo a su vaso de recogida asociado. De esta manera, las células depositadas en los tubos de recogida desde el paso microcapilar serán introducidas en los vasos de recogida. Cuando no hay señal
15 para accionar ninguno de los dispositivos motores, la corriente que sale del paso capilar 33 será recibida por el tubo central 818, que conduce el vaso de recogida central 792, el cual puede usarse para recoger los hematíes o glóbulos rojos de la sangre, ya que estos son los que están
20 en mayor número. Para este fin, la línea 76 procedente del circuito lógico 54, que es la que indica los glóbulos rojos de la sangre, no precisa tener conexión de control con el clasificador. Así, en ausencia de una señal de control, el clasificador actuará para recoger normalmente los glóbulos rojos de la sangre.
25

El tamaño de los glóbulos blancos es en general mayor que el tamaño del paso microcapilar 33, y al pasar a través de éste se producirá un cierto alargamiento de los glóbulos blancos. Por consiguiente, el detector 48 -
30 "verá" siempre la imagen de una parte de los glóbulos blan

385591

7 ENE 1941



cos, la cual, como se ha señalado en lo que antecede, es suficiente para llegar a una identificación. No obstante, por lo que se refiere a los hematíes y a las plaquetas, es posible que un pequeño número de éstos puedan no ser "vistos" por el detector. Al ser las plaquetas menores que la abertura del capilar, podrían fluir fuera del área del detector. Los hematíes, por ser muy delgados, podrían evitar el detector al circular en sentido de canto contra las paredes del paso microcapilar.

10 Para asegurar que se cuentan todas las células, en especial todos los hematíes y todas las plaquetas, puede modificarse el aparato de la figura 1 como se ha ilustrado en las figuras 8 y 9, en las que se emplean números similares para representar las partes que son similares.

15 Un segundo detector 110, el cual puede ser un fotoperceptor en forma de tira, está situado para abarcar todo el espacio a través del paso microcapilar y está aguas arriba del detector 48, como se ha ilustrado en la figura 9. Puesto que el receptor de tira abarca todo el espacio del microcapilar, las pequeñas plaquetas y los hematíes en sentido de canto son también observados. El receptor de tira podría ser bastante estrecho, de aproximadamente 0,5 por 10 micras en el área sensible. La señal procedente del fotoperceptor de tira 110, por la línea 111, es convenientemente amplificada por el amplificador A' y alimentada por la línea 111' a un detector 112. El amplificador A' puede ser modulado a partir de la señal del detector de iluminación de referencia por la línea 51, como en la realización anterior.

30 El detector 112 podría comprender típicamente un

385591

7 FEB 1971



integrador electrónico con circuitos umbral que actúan para clasificar directamente los hematíes y las plaquetas sobre la base de sus características claramente diferentes, tanto de cada uno con respecto al otro como con respecto a los glóbulos blancos. Así, la señal procedente de una plaqueta sería una cresta brusca en respuesta al pequeño diámetro de 2 micras de la misma. Por otra parte, la señal de un glóbulo rojo, mayor, duraría algo más y produciría un mayor cambio de voltaje. El detector 112 podría tener convenientemente dos umbrales, uno para las plaquetas y otro para los hematíes o glóbulos rojos. Si no se observa ni una plaqueta ni un glóbulo rojo, se alimenta una señal por la línea 114 a un circuito de activación usual 116, el cual permite que la salida amplificada del detector 48 sea alimentada al analizador de señal 52'. Las señales para las plaquetas y los glóbulos rojos son alimentadas respectivamente, por las líneas 120 y 122, a un contador 124 de glóbulos rojos y plaquetas, el cual puede estar separado del contador 62' de glóbulos blancos. La señal de plaqueta por la línea 122 es alimentada al clasificador 78 - por 126, para el control del vaso de recogida de muestras de plaquetas, como en la realización anterior.

Aunque en la exposición que antecede se han descrito dos realizaciones preferidas del invento, a los expertos en la técnica se les ocurrirán otras modificaciones, sin desviarse del espíritu del invento. Se pretende, por tanto, que el presente invento solamente quede limitado por el alcance de las reivindicaciones que se acompañan.

La presente solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, con fecha 18 de



7 ENE 1971

Noviembre de 1969, bajo el número 877.729, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

REIVINDICACIONES

5 Los puntos de Invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de la presente solicitud de Patente de Invención, en España por VEINTE años, son los siguientes:

10 1º.- Un aparato para identificar partículas específicas de microestructuras diversas dentro de un fluido, caracterizado por medios de conducto que contienen una muestra de dicho fluido con dichas partículas en el mismo, medios de exploración que exploran eficazmente la microestructura de las partículas individuales en dicho fluido -
15 como consecuencia de pasar dicho fluido por una región definida, medios detectores que responden a dichos medios de exploración para desarrollar una señal de salida eléctrica, y medios para analizar y tratar dicha señal de salida para obtener de la misma una pluralidad de señales de salida que cada una corresponde a un constituyente específico en partículas de dicha muestra.
20

25 2º.- Un aparato según la reivindicación 1, caracterizado porque dichos medios de conducto tienen al menos una parte que es transparente a la radiación electromagnética, comprendiendo dichos medios de exploración (a) una

385591

Handwritten signature and scribbles



TENE

fuente de iluminación para iluminar dicha parte de dichos medios de conducto y la muestra que hay en los mismos, y (b) medios de desplazamiento de fase para desplazar el recorrido de la radiación electromagnética que pasa a través de los componentes de la microestructura de dichas partículas con respecto a la radiación electromagnética que pasa entre ellos, respondiendo dichos medios detectores a la radiación que pasa a través de dicha parte de dichos medios de conducto para desarrollar dicha señal de salida eléctrica.

3ª.- Un aparato según la Reivindicación 2ª, caracterizado porque dicha fuente de iluminación coopera con medios ópticos para ampliar la imagen del fluido de muestra y de las partículas antes de que incidan sobre dichos medios detectores.

4ª.- Un aparato según la reivindicación 3ª, caracterizado porque dichos medios de conducto están dimensionados con relación al tamaño de dichas partículas de tal modo que las partículas se distribuyen en dichos medios de conducto en esencia sucesivamente.

5ª.- Un aparato según las Reivindicaciones 3ª o 4ª, caracterizado porque dichos medios detectores tienen un área sensible a la radiación que es mucho menor que la imagen de la partícula que incide sobre ella, con lo cual solamente una rebanada de sección transversal delgada de la imagen de la partícula atraviesa dicha área sensible al moverse dicha partícula con respecto a dichos medios de exploración.

6ª.- Un aparato según cualquiera de las Reivindicaciones 2ª a 5ª, caracterizado porque dichos medios de

Handwritten scribbles and numbers: 30, 2.1.71

385591

7 ENE 1971



desplazamiento de fase desplazan el recorrido en sustancialmente una cuarta parte de una longitud de onda.

5 7º.- Un aparato según cualquiera de las Reivindicaciones 2ª a 6ª, caracterizado porque dicha fuente de iluminación comprende una fuente de radiación sustancialmente monocromática.

10 8º.- Un aparato según cualquiera de las Reivindicaciones precedentes, caracterizado por medios de recuento que responden a dicha pluralidad de señales de salida obtenidas de dichos medios de análisis y tratamiento.

15 9º.- Un aparato según cualquiera de las Reivindicaciones 3ª a 8ª, caracterizado por segundos medios detectores situados adyacentes a dichos medios detectores primeramente mencionados, teniendo dichos segundos medios detectores un área sensible a la radiación dimensionada de tal modo que abarca la imagen del fluido de muestra en un plano que es sustancialmente perpendicular al eje longitudinal de los medios de conducto.

20 10º.- Un aparato según la reivindicación 9ª, caracterizado porque dichos segundos medios detectores están situados aguas arriba de dichos medios detectores primeramente mencionados con respecto al sentido de movimiento del fluido de muestra.

25 11º.- Un aparato según las Reivindicaciones 9ª o 10ª, caracterizado por medios de umbral que responden a señales de salida predeterminadas desde dichos segundos medios detectores, para proporcionar salidas indicadoras de las mismas.

30 12º.- Un aparato según la Reivindicación 11ª, caracterizado por medios de recuento que responden a di-

Handwritten scribbles and the number '30' are present on the left side of the page.

385591

7 June 1971



chas señales de salida predeterminadas desde dichos medios de umbral últimamente citados.

5 13^a.- Un aparato según las Reivindicaciones 11^a o 12^a, caracterizado por medios de capacitación para alimentar la salida de dichos medios detectores primeramente mencionados a dichos medios de análisis y tratamiento en respuesta a una señal de salida obtenida de dichos segundos medios detectores que difiere de la señal de salida - desde los mismos que da por resultado dichas señales de -
10 salida predeterminadas.

15 14^a.- Un aparato según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por al menos dos medios colectores, destinados para comunicación de flúido con dichos medios de conducto aguas abajo de dicha parte de los mismos, y medios de control que responden a dichas señales de control desarrolladas por dichos medios de análisis y tratamiento para poner medios colectores individuales predeterminados en comunicación de flúido con dichos medios de conducto.

20 15^a.- Un aparato según la Reivindicación 14^a, caracterizado porque el número de dichos medios colectores corresponde al número de diferentes constituyentes en partículas en dicho flúido de muestra.

25 16^a.- Un aparato según las Reivindicaciones 14^a o 15^a, caracterizado porque dichos medios colectores comprenden una pluralidad de tubos movibles, cada uno de -- ellos espaciado lateral y longitudinalmente desde un extremo de dichos medios de conducto, comprendiendo dichos medios de control dispositivos motores para mover dichos tubos a alineación axial con dichos medios de conducto.

30
2.1.71

385591

7 ENE 19



17º.- Un aparato según la Reivindicación 16ª, caracterizado porque dichos dispositivos motores se alargan en respuesta a dichas señales de control.

5 18º.- Un aparato según cualquiera de las Reivindicaciones precedentes, caracterizado porque dichos medios para analizar y tratar dicha señal de salida de los medios detectores comprenden una pluralidad de filtros de banda estrecha y un circuito lógico binario.

10 19º.- Un aparato según la Reivindicación 18ª, caracterizado porque dichos medios de análisis y tratamiento incluyen una pluralidad de circuitos de umbral que responden a la salida desde dichos filtros de banda estrecha, respondiendo dicho circuito lógico binario a la salida de los circuitos de umbral.

15 20º.- Un aparato según la Reivindicación 19ª, caracterizado porque dichos filtros de banda estrecha responden a las frecuencias contenidas dentro de dicha señal de salida desde dichos medios detectores primeramente mencionados, sustancialmente en la relación de uno, seis y -
20 diez, siendo dicho circuito lógico binario del tipo de - tres bitios.

25 21º.- Un aparato según cualquiera de las Reivindicaciones precedentes, caracterizado porque dicho fluido de muestra comprende sangre y dichas partículas comprenden los elementos formados de la misma.

30 22º.- Un aparato según la Reivindicación 21ª, en cuanto esa Reivindicación está subordinada a la Reivindicación 11ª, caracterizada porque dichas señales de salida predeterminadas son indicadoras de los eritrocitos y de las plaquetas, respectivamente, que hay en la sangre.

385591

7 ENE 1971



23ª.- Un aparato según cualquiera de las Reivindicaciones 16ª a 21ª, en cuanto las Reivindicaciones 19ª y 21ª están subordinadas a las Reivindicaciones 16ª o 17ª, caracterizado porque los ejes de dichos tubos están normalmente dispuestos circularmente alrededor del eje de dichos medios de conducto, habiéndose dispuesto un tubo central estacionario que está alineado axialmente con dichos medios de conducto:

24ª.- Un aparato según la Reivindicación 23ª, caracterizado porque dichos dispositivos motores comprenden cristales piezoeléctricos.

25ª.- Un aparato para identificar partículas específicas de microestructuras diversas dentro de un fluido.

Tal y como se ha descrito en la memoria que antecede, representado en el dibujo que se acompaña y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de treinta hojas escritas a máquina por una sola cara.

20

Madrid,

P.A.

7 ENE 1971

Por Poder:

PSO/.

2.1.71

385591

385591

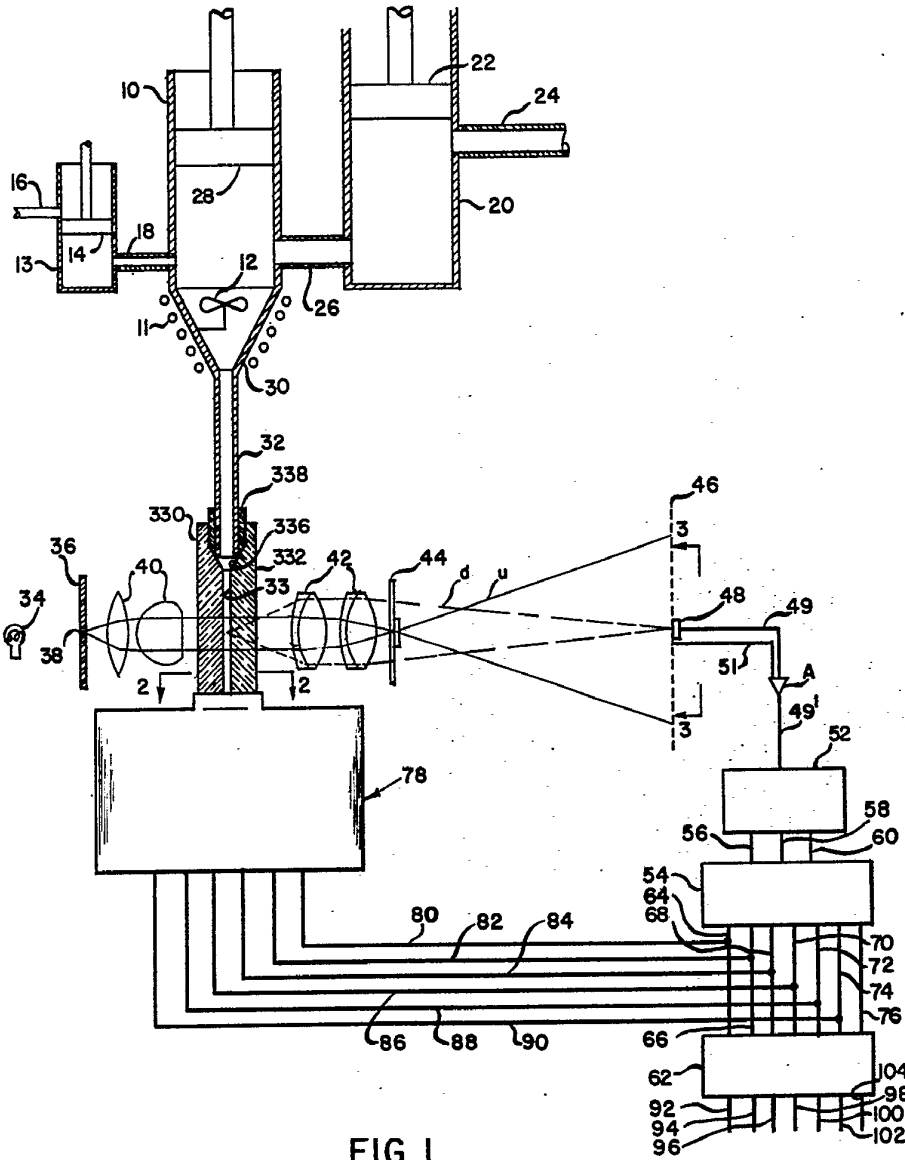


FIG. 1

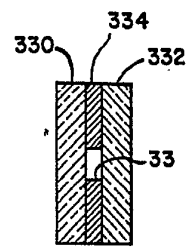


FIG. 2

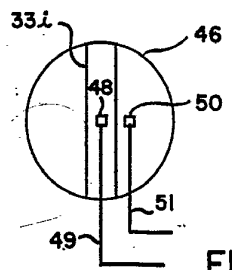


FIG. 3

385591



2

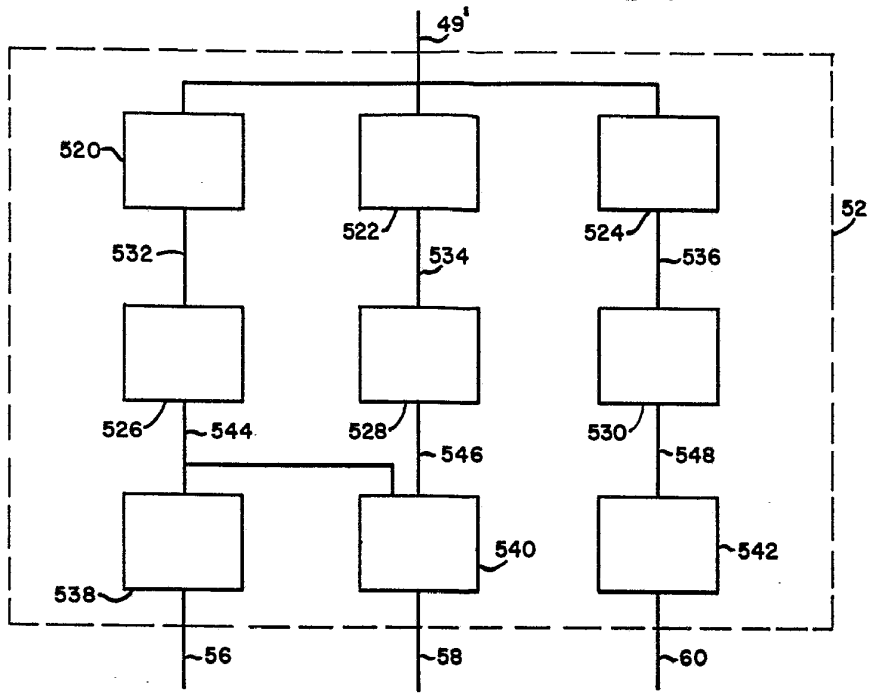


FIG. 4

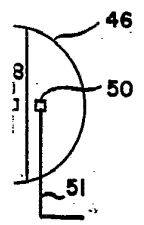


FIG. 3

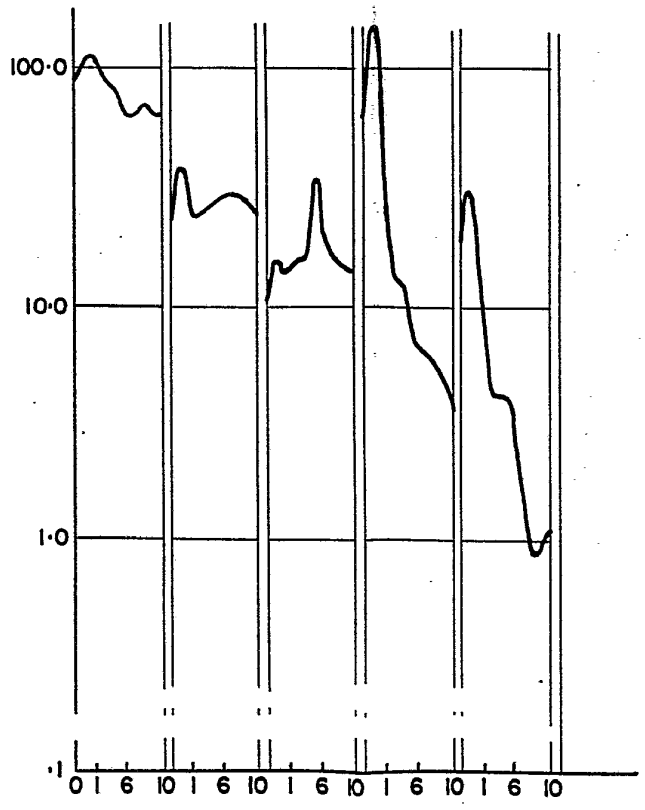


FIG. 5

APPROVED
FOR PUBLICATION
[Signature]

385591

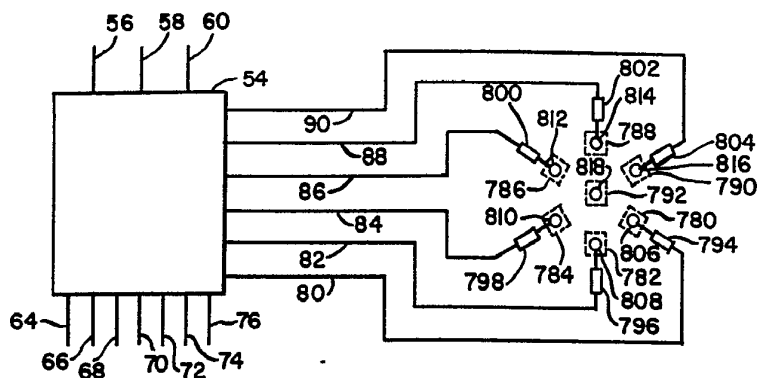


FIG. 6

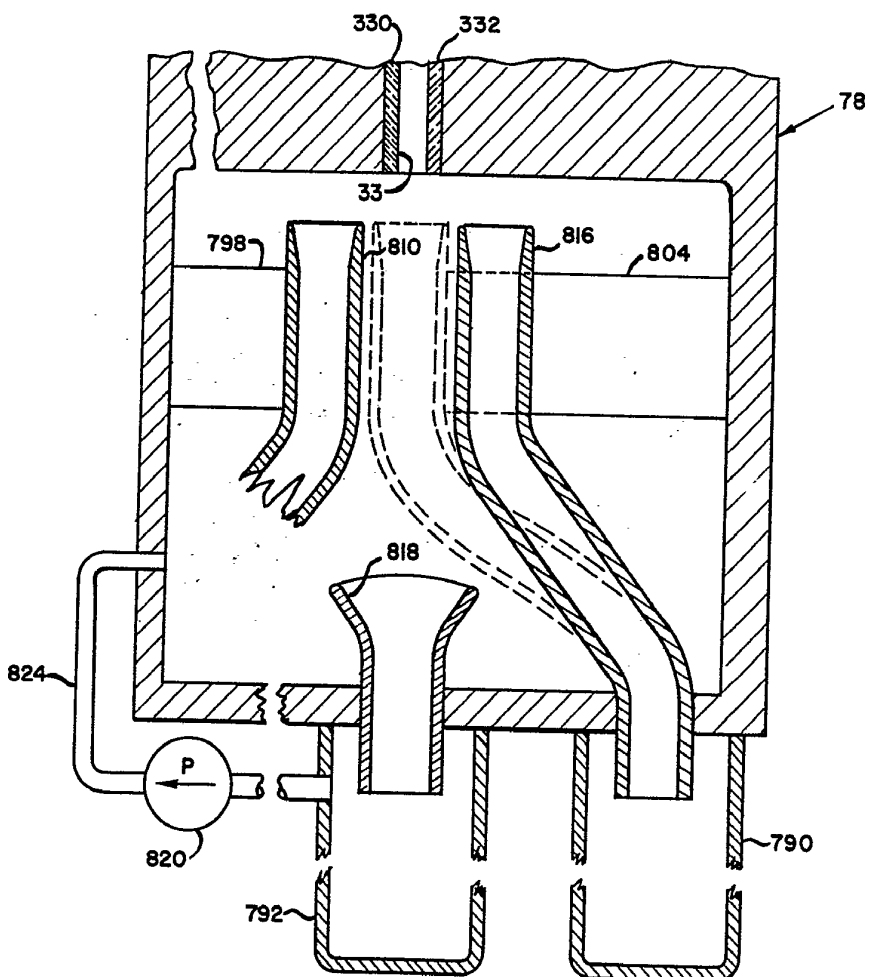


FIG. 7

