



HU000227875B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **227 875**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

- (21) A bejelentés ügyszáma: **P 08 00614**
- (22) A bejelentés napja: **2008. 10. 13.**
- (40) A közzététel napja: **2010. 05. 28.**
- (45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlöny és Védjegyértesítőben: **2012. 05. 28.**
- (51) Int. Cl.: **G01N 33/48** (2006.01)
G01N 1/00 (2006.01)
G01N 15/00 (2006.01)
G01N 15/14 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)
G01N 35/00 (2006.01)
G01N 334/83 (2006.01)
G01N 21/05 (2006.01)
G01N 21/47 (2006.01)

| | |
|---|--|
| (72) Feltaláló(k): Tremmel Attila Zsolt 16%, Siófok (HU) Tóth-Miklós Péter 16%, Budapest (HU) Kovács Péter 16%, Szentendre (HU) Svarcz Miklós Zsolt 16%, Pomáz (HU) Laczó László Lehel 16%, Budapest (HU) Mendele Bálint Tibor 20%, Budapest (HU) | (73) Jogosult(ak): Diatron Medicinai Instrumentumok Laboratóriumi Diagnosztikai Fejlesztő-Gyártó Zártkörűen Működő Részvénytársaság, Budapest (HU) |
| | (74) Képviselő: Szabó Zsolt, DANUBIA Szabadalmi és Jogi Iroda Kft., Budapest |

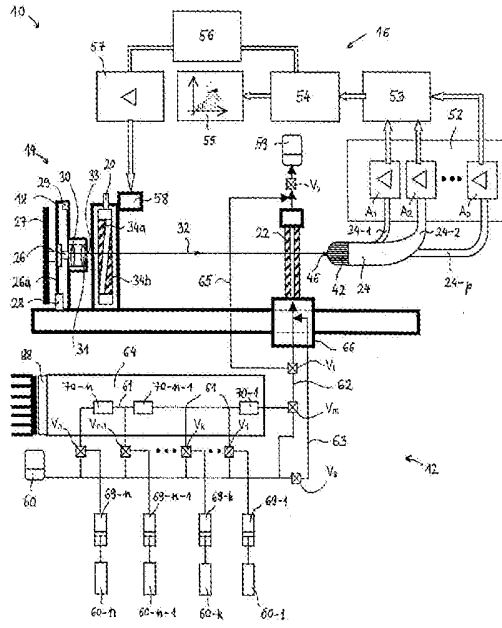
(54) **Optikai elvű áramlási citométer, továbbá vizsgálati eljárás**

(57) Kivonat

A jelen találmány humán vagy állati vér sejttes elemei in vitro történő mérésére szolgáló áramlási citométerhez, illetve ilyen alkalmazó vizsgálati eljáráshoz kapcsolódik.

A találmány szerinti áramlási citométer, valamint vizsgálati eljárás a technika állását képező hasonló típusú citométerekhez képest javított detektálási tulajdonságokkal rendelkezik és automatizált nyalábpozicionálást biztosít. Ezek eléréséhez a humán vagy állati vér sejttes elemein szóródó fény összegyűjtése és megfelelő optikai detektorokhoz (A1, ..., Ap) továbbítása speciális véggel (42) kiképzett csatolóelemmel, célszerűen egy vagy több optikaiszál-köteggel (24-1, 24-2, ..., 24-p) történik. A vérminta mérésre történő előkészítését, vagyis a humán vagy állati vér megfelelő reagenssel való elegyítését speciális felépítésű hidro-pneumatikai egység (12) végzi. Emellett a mérés tényleges elvégzése egy speciális felépítésű áramlási cellát (22) használva történik, amely nagymértékben hozzájárul az áramlási citométer (10) jel/zaj viszonyának javulásához.

I. ábra



OPTIKAI ELVŰ ÁRAMLÁSI CITOMÉTER, TOVÁBBÁ VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

A találmány tárgya optikai elven alapuló áramlási citométer, közelebbről tekintve humán vagy állati teljes vér alakos elemei *in vitro* történő mérésére szolgáló, javított detektálási tulajdonságokkal rendelkező optikai elvű hematológiai elemzőkészülék. A találmány tárgya emellett egy, az optikai elvű áramlási citométert alkalmazó vizsgálati eljárás is.

Az humán és állati eredetű minták diagnosztikai célú elemzése területén az áramlási citometria több évtizedes múltra tekint vissza. Az áramlási citometria, illetve az áramlási citométerek sejtek gyors, multiparaméteres vizsgálatára alkalmas laboratóriumi módszer/eszközök. Segítségükkel az egyes sejtípusok kevert sejtpopulációkban külön-külön mérhetők, analizálhatók és szeparálhatók fenotípusuk vagy funkcionális állapotuk szerint. A napjainkban alkalmazott áramlási citométerek a paraméterek egy részét optikai elvű méréssel határozzák meg. A szórt vagy elnyelt, polarizált fény elemzésén alapuló módszereket gyakran a sejt-
15 tes elemek populációinak meghatározására használják. Ilyen megoldást ismertet például az US-7,113,266 sz. USA-beli szabadalom. Optikai elvű méréssel emellett egyidőben mérhető egy adott minta, speciálisan humán vagy állati teljes vér képezte minta különböző alakos elemeinek (vörös vértestek, vérlemezkék, fehér vérszettek, úgymint limfociták, monociták, granulociták, stb.) nagysága és azok granu-
20 láltsága.

Az elterjedten alkalmazott optikai elvű mérés értelmében (e tekintetben l. például a WO99/58955 sz. és a WO01/94938 A1 sz. nemzetközi közzétételi iratokat) a vizsgálni szándékozott vérmintát (vagy annak egy részét) meghatározott környezeti körülmények között, általában különálló kamrákban, manuálisan vagy
25 automatizált formában először megfelelő reagensekkel elegyítik, miáltal a mintából az egyes kamrákban különböző mintaoldatokat hoznak létre. A vérminta tekintett biokémiai előkészítése a populációk pontosabb szeparálása érdekében a méréstől elválaszthatatlan. Az így nyert mintaoldatokat egyenként vékony, célszerűen egyenes áramlási csatornával rendelkező ún. áramlási cellán (vagy küvettán)
30 áramoltatják keresztül. Eközben a cellán átfolyó mintaoldatot megvilágítási zónában az áramlás irányára közel merőleges irányból egy vagy több, adott hullámhosszú lézerefénnyel világítják meg (egy csatornás/többcsatornás vizsgálat). Az

áramlási cella csatornáján a mintaoldattal együtt keresztülhaladó alakos elemeken szóródó lézerefényt egy vagy több különböző küpszög tartományban, megfelelő kialakítású érzékelőelem(ek) (például fotodetektorok, fotoelektronsokszorozó csövek, stb.) útján detektálják. A detektált jeleket ezután megfelelő algoritmusokkal elemzik és ennek eredményeként a vizsgált minta alakos elemeire (sejtjeire) vonatkozó információkat állítanak elő. A vizsgálatok egy részénél a detektálást egy kis- és egy nagyszögű tartományban végzik, a különféle sejtekről szóródott lézerefényt felhasználva. A kisszögű tartományból érkező lézerefény detektálásával kapott elektronikus jel a vérminta sejtjeinek méretével, míg a nagyszögű tartományban detektált lézerefény szolgáltatja elektronikus jel a vérminta sejtjeinek belső granuláltságával arányos. Mivel a megvilágító lézerefény az alakos elemekről szóródó lézerefényhez képest lényegesen nagyobb teljesítményű, a megvilágító lézerefény azon részét, amely a detektor(oka)t közvetlenül, azaz a minta alakos elemein való szóródás nélkül éri el, különböző módszerekkel próbálják csökkenteni.

Bizonyos esetekben a szóródott lézerefényt optikaiszál-köteg segítségével gyűjtik össze. Ilyenkor rendkívül lényeges az optikai szálakba történő be- és az azokból történő kicsatolás hatékonysága. Ilyen megoldást ismertet például az US-6,798,508 sz. USA-beli szabadalom, ahol az optikaiszál-köteg elemi optikai szála-
inak fénybecsatoló végei egy konkáv tartóelemben körkörös kialakított furatokba vannak beleerősítve és a megvilágítási zóna irányába néznek. Emellett az elemi optikai szálak fénybecsatoló végeinek erőteljesebb megvilágítása céljából a szóródott lézerefény útjában a fénybecsatoló végek előtt gyűjtőlencsét rendeznek el, amint azt például az US-5,461,476 sz. USA-beli szabadalom ismerteti.

A citometriás mérések megfelelő pontossággal történő végrehajtásához a vizsgálat tárgyát képező mintát az áramlási cella csatornáján való áthaladása közben fókuszálni szükséges. Az esetek többségében e célból az ún. hidrodinamikus fókuszálást alkalmazzák. Ennek lényege, hogy a mintát az áramlási cella csatornájába való belépését megelőzően arra alkalmas elrendezésben egy laminárisan áramló folyadékba (ún. köpenyfolyadék) táplálják: a mintát egy, az áramlási útban a cellát megelőzően kialakított kúpos szűkület geometriai tengelye mentén elhelyezett mintabetápláló tűn keresztül juttatják be a köpenyfolyadékba, annak áramlási sebességével közel azonos sebességgel. Ennek eredményeként egy, az

áramlási cella csatornájának keresztmetszeténél kisebb keresztmetszetű minta-
áramot hoznak létre. A köpenyfolyadék és a mintaoldat folyamatos áramlását álta-
lában pumpák segítségével tartják fenn, amint azt például az US-5,895,764 sz.
USA-beli szabadalom tárgyalja. A mintaáramban a hidrodinamikai fókuszálás és a
5 lamináris áramlás következtében az alakos elemek mindvégig az áramlási ke-
resztmetszet közepén, egy néhányszor $10\ \mu\text{m}$ belső átmérőjű „folyadékcsőben”
haladnak. A sejtek mintaárambeli „követési távolsága” a minta hígítási mértékének
szabályozásával állítható be. Megfelelő mértékű hígítás alkalmazásával elérhető,
hogyan a vizsgálat tárgyát képező minta alakos elemei a mintaáramban lényegében
10 egyesével haladjanak át a megvilágítási zónán. Ezáltal a mintaoldat minden egyes
alakos eleme lényegében azonos megvilágítást kap.

Az US-6,228,652 B1 sz. USA-beli szabadalom olyan vérképelemző készüléket tárgyal,
amelyben a mintafolyadékot tartalmazó és vezető áramlási ág, vala-
mint a köpenyfolyadékot tartalmazó és szállító áramlási ág csupán egyetlen, köz-
vetlenül az áramlási cella előtt elhelyezkedő pontban találkozik egymással, így
15 nem képez közös kezdő- és végponttal rendelkező, párhuzamos áramlási ágak al-
kotta zárt áramlási pályát.

A fentiek fényében a jelen találmánnyal célunk olyan optikai elvű áramlási
citométer megvalósítása, amely a klinikai gyakorlatban napjainkban alkalmazott
20 hasonló elven működő citométerekhez képest fő részegységei tekintetében to-
vábbfejlesztett részegységekből áll.

Speciálisan, a jelen találmánnyal célunk olyan optikai elvű áramlási cito-
méter megvalósítása, amelynél az érzékelőelem(ek)et a minta sejtes elemeinek
megvilágítására használt megvilágító lézerefénynek viszonylag kis mennyisége éri
25 el közvetlenül.

Emellett a jelen találmánnyal célunk olyan áramlási citométer megvalósítá-
sa, amelynél a vizsgálat tárgyát képező minta sejtes elemein szóródó lézerefény
kimagasló hatékonysággal és mérnöki kompromisszumoktól mentes módon kerül
összegyűjtésre és detektálásra.

30 A találmánnyal további célunk olyan áramlási citométer megvalósítása is,
amely a különféle sejtpopulációk megbízhatóbb és pontosabb szeparálása érde-

kében javított hatásfokú hidro-pneumatikus biokémiai mintaelőkészítő egységet foglal magában.

A hiba- és zavarmentes mérések stabilan működő áramlási citométert igényelnek. Ily módon a teljes élettartam alatt elengedhetetlen az optikai elemek rendszeres beállítása. A klinikai gyakorlatban elterjedten alkalmazott citométerek esetén a szóban forgó beállítást általában manuálisan végzik. A manuális beállítás azonban szakirányú tudást igényel, és a beállítás minősége nagyban függ a beállítást végző kezelőszemély hozzáértésétől. Ilyen manuális beállítást alkalmazó megoldást ismertet például az US-5,631,730 sz. USA-beli szabadalom, amelynek értelmében a megvilágításra szolgáló nyaláb megvilágítási zónára történő körülbelüli ráállítása a nyaláb útjában elrendezett tükrökkel (durva pozicionálás), míg a nyalábnak a megvilágítási zónában való keresztirányú pontos beállítása egy, a nyaláb útjában elrendezett kisszögű prizmapár prizmai távolságának a változtatásával (finom pozicionálás) történik. Ennek fényében a jelen találmánnyal további célunk még egy olyan áramlási citométer megvalósítása is, amely az optikai elemek beállítását, így például a megvilágítást végző lézerefény foltjának pozicionálását, kezelőszemélyzet beavatkozása nélkül időről-időre (szükség esetén) automatikusan elvégzi.

A találmánnyal emellett további célunk még olyan optikai elvű áramlási citométer megvalósítása is, amely automatikus minősítések végrehajtására alkalmas a tekintetben, vajon a megvilágításra használt lézernyaláb intenzitása egy, a terjedési irányára merőleges keresztmetszetben megfelelő hibahatáron belül egyenletes-e, vagy az optikai út kellően tiszta-e.

Mindezek mellett a jelen találmánnyal további célunk még egy optikai elven alapuló olyan vizsgálati eljárás kidolgozása is, amely a találmány szerinti áramlási citométert alkalmazva hatékony és automatizált vizsgálati eljárást valósít meg folyadékfázisú minta sejtes elemeinek vizsgálatára.

Az előzőek fényében a találmány tárgyát képező, optikai elvű áramlási citométer megvalósítására irányuló célkitűzéseket az 1. igénypont szerinti áramlási citométer kidolgozásával értük el. A találmány szerinti, optikai elvű áramlási citométer előnyös példakénti kiviteli alakjait a 2-17. igénypontok határozzák meg. Az előzőek fényében a találmány tárgyát képező vizsgálati eljárás kidolgozására

irányuló célkitűzéseket a 18. igénypont szerinti optikai elvű eljárással értük el. A találmány szerinti vizsgálati eljárás előnyös példakénti kiviteli alakjait a 19-28. igénypontok határozzák meg.

A találmányt a továbbiakban a csatolt rajzra hivatkozással ismertetjük részletesen, ahol az

- 1. ábra a találmány szerinti, optikai elvű áramlási citométer egyik lehetséges példakénti kiviteli alakjának tömbvázlata – a tekintett kiviteli alak részét képező hidro-pneumatikai egység reagens ágainak száma n , fényelvezető ágainak (és ezzel összhangban detektálási kúpszögterományainak) száma p ; a
- 10 – 2. ábra az 1. ábrán szemléltetett hidro-pneumatikai egység egy olyan előnyös példakénti kiviteli alakjának tömbvázlata, amely három darab reagens ággal (teljes vér és izotóniás hígítószer képezte mintaoldat, hemolizálószer, valamint stabilizálószer) rendelkezik; a
- 3. ábra az 1. ábrán feltüntetett hidro-pneumatikai egység részét képező bioké-
15 miai előkészítő egység k -edik tagjának tömbvázlata; a
- 4A ábra a találmány szerinti áramlási citométer részét képező optikai egységben alkalmazott fénygyűjtő optikaiszál-köteg fénybecsatoló végének perspektivikus ábrázolása; a
- 4B ábra a 4A ábrán vázolt fénygyűjtő optikaiszál-köteg fénybecsatoló végének
20 hosszmeteszete, amelynek felnagyított részletei azt mutatják, hogyan változnak az optikaiszál-köteget alkotó elemi optikai szálak belépőfelületeinek az elemi szálak geometriai tengelyével bezárt szögei az optikaiszál-köteg középvonalától sugárirányban kifelé haladva; az
- 5A ábra a 4A ábra szerinti, három darab elvezető köteggel megvalósított fénygyűjtő optikaiszál-köteg hosszmeteszete; az
25
- 5B ábra az 5A ábra szerinti optikaiszál-köteg egy olyan kiviteli alakjának elől-
nézete, amely a ráeső közvetlen (azaz nem szóródott) lézerefény összegyűjtésére és elvezetésére szolgáló ellipszis alakú központi elvezető köteggel rendelkezik; az
- 30 – 5C ábra az 5A ábra szerinti optikaiszál-köteg egy olyan kiviteli alakjának elől-
nézete, amely a ráeső közvetlen (azaz nem szóródott) lézerefény kitakarására szolgáló kitakarólemezzel rendelkezik; a

- 6A ábra a találmány szerinti áramlási citométer optikai egységében alkalmazott, kisszögű prizmapárral megvalósított nyalábmozgató szerv perspektivikus nézete; a
- 5 – 6B ábra a nyalábmozgató szerv egy lehetséges másik példakénti kiviteli alakját ábrázolja perspektivikus nézetben, ahol a nyalábmozgató szervet maga a lézerforrástartó képezi; a
- 7A és a 7B ábrák rendre az 1. ábrán feltüntetett hidro-pneumatikai egység részét képező keverőegység egyenesvonalú falakkal megvalósított egyik szorítóelemét, illetve az abban elhelyezett és vele egymásra merőleges irányokban 10 összenyomott (deformált) rugalmas falú csődarab képezte mikroreaktort mutatja perspektivikus nézetben; a
- 7C és a 7D ábrák rendre az 1. ábrán feltüntetett hidro-pneumatikai egység részét képező keverőegység ivelt falakkal megvalósított egyik szorítóelemét, illetve az abban elhelyezett és vele egymásra merőleges irányokban össze- 15 nyomott (deformált) rugalmas falú csődarab képezte mikroreaktort mutatja perspektivikus nézetben; a
- 8. ábra egy, a 2. ábrán bemutatott hidro-pneumatikai egység részét képező, 7A és/vagy 7C ábrák szerinti szorítóelemekből összeállított, három reagens ággal rendelkező keverőegységet szemléltet perspektivikusan; a
- 20 – 9. ábra a megvilágító lézerfény automatikus mintára pozicionálásának folyamatát ábrázolja ellipszis alakú lézerfényfolt esetében; a
- 10A és 10B ábrák a találmány szerinti, optikai elvű áramlási citométerben használt áramlási cella egyik lehetséges példakénti kiviteli alakját szemléltetik 25 rendre az áramlási csatorna mentén vett hosszmetsetben, valamint felülnézetben; a
- 11A és 11B ábrák a találmány szerinti áramlási citométerben használt további áramlási cella kiviteli alakokat ábrázolnak felülnézetben.

Az 1. ábra a találmány szerinti, optikai elven működő áramlási 10 citométer egyik előnyös példakénti kiviteli alakját szemlélteti, amely reagensek széles tartományából választott egy vagy több reagenssel elegyített biológiai minta, például 30 humán vagy állati eredetű teljes vér alakos elemei vagy egyéb sejtes elemek több tulajdonságának (méret, belső granuláltság, stb.) egyidejű és *in vitro* történő mé-

résére szolgál. A tekintett 10 citométernek alapvetően három, egymással együttműködő fő komponense van: a biológiai minta megfelelő reagensekkel elegyített oldatának előállítására és mérési helyre történő továbbítására (előtolására) szolgáló 12 hidro-pneumatikai egység, a mérés során a mintaoldat kívánt megvilágítását biztosító és a minta alakos elemeinek tulajdonságaival kapcsolatos információkat hordozó, mintáról szóródott fény összegyűjtésére és detektor(ok)hoz vezetésére szolgáló 14 optikai egység, valamint a detektor(ok) által a beeső fény hozzájuk vezetett hatására előállított villamos jeleket feldolgozó és az így nyert információk legalább egy részét felhasználva a 14 optikai egység működését szabályozó és/vagy a sejtes elemek keresett tulajdonságait meghatározó 16 vezérlő és kiértékelő egység.

A 14 optikai egység a mérés elvégzéséhez szükséges megvilágítást biztosító 18 adómodult, 20 nyalábmozgató szervet, 22 áramlási cellát, továbbá 24 optikaiszál-köteget tartalmaz fényútban elrendezve. A 18 adómodul 26 lézerforrást, annak áramellátását biztosító 27 meghajtóáramkört, valamint 29 hőmérsékletérzékelő jele alapján a 26 lézerforrás hőmérsékletének stabilizálását megvalósító 28 hőmérsékletstabilizátort (előnyösen – rajzon nem ábrázolt – hűtésre szolgáló Peltier-elemet és fűtésre szolgáló fűtőellenállást) foglal magában. A 26 lézerforrás előnyösen 26a lézerforrástartóban van elrendezve. A 26 lézerforrás egy vagy több hullámhosszon koherens és állandó átlagos kimenő fényteljesítményű megvilágító lézerefényt szolgáltat. A 26 lézerforrást előnyösen egy vagy több, különböző hullámhosszon emittáló lézerdióda képezi, amely lézerdióda/lézerdiódák a tekintett fényút kiindulási pontjában van/vannak elrendezve. A 14 optikai egység optikai tengelyét a 26 lézerforrástól a 24 optikaiszál-köteg közös 42 végének geometriai középpontjáig terjedő egyenes szakasz jelöli ki. A fényútban a 26 lézerforrás által emittált lézerefény terjedési irányában, a 18 adómodul részeként, egy vagy több arra alkalmas optikai elemmel megvalósított 30 kollimátor van elrendezve, amely a szóban forgó lézerefényt párhuzamosítja. A párhuzamosított lézerefény 22 áramlási cellára fókuszálása céljából a fényútban a 30 kollimátort követően 31 fókuszálóelem (előnyösen egy vagy több lencse) van elhelyezve. Az így nyert 32 lézernyaláb a terjedési irányára merőleges síkban ellipszis alakú foltot határoz meg, amely a 22 áramlási cellát annak egy kijelölt tartományában világítja meg. A 32 lézernyaláb

láb teljesítménysűrűség-eloszlása a 22 áramlási cella középvonalában, a fényútra merőleges síkban Gauss függvény szerinti (továbbiakban: gaussi). A párhuzamosított és fókuszált 32 lézernyaláb formázására adott esetben a 31 fókuszálóelemet követően a fényútban elrendezett, adott szélességű és egymásra merőleges irányban terjedő 33 rések szolgálhatnak. A 33 rések feladata a megvilágításra használt gaussi 32 lézernyaláb szélső, kisebb teljesítménysűrűségű részeinek levágása és ezáltal a megvilágításra használt fény mennyiség csökkentése, illetve a 26 lézerforráshoz a 14 optikai egység egyéb elemeiről visszaverődő lézerefény minél teljesebb kiküszöbölése. Megjegyezzük, hogy a 33 rések szerepét speciális kialakítású áramlási cella is elláthatja, amint azt a 10. és 11. ábrákhoz kapcsolódóan ismertetjük majd.

A találmány szerinti 10 centiméter 1. ábrán vázolt példakénti kiviteli alakjánál a 18 adómodult elhagyó 32 lézernyaláb a fényútban elhelyezett automatizált 20 nyalábmozgató szervre esik. A 20 nyalábmozgató szerv gondoskodik arról, hogy a megvilágító 32 lézernyaláb a 22 áramlási cellát éppen a kijelölt tartományban világítsa meg (nyalábpozicionálás). A 20 nyalábmozgató szerv egyik lehetséges példakénti kiviteli alakjában (lásd a 6A ábrát) kisszögű 34a, 34b prizmák párként van kialakítva, amely 34a, 34b prizmák alaphelyzetben ellenpárhuzamos állásúak. Ennek eredményeként a kilépő és a belépő 32 lézernyaláb egymással párhuzamos tengelyű. A 34a, 34b prizmák egy közös, az optikai tengellyel lényegében egybeeső geometriai tengely körül együtt és/vagy egymástól függetlenül elforgathatók és ezzel a megvilágító 32 lézernyaláb foltjának kiterjedése módosítható. A prizmapár 360°-ban történő teljes körülfordításával a 32 lézernyaláb megvilágító foltja a prizmapár beállításától függően egy, az optikai tengelyre merőleges síkban fekvő körgyűrű alakú 35 tartományon söpör végig. A gyűrű belső d átmérője a 34a, 34b prizmák távolságától és csúcshögtől függ. A gyűrű külső D átmérőjét a 32 lézernyaláb optikai tengelyhez viszonyított maximális szögkitérése szabja meg, ami a kisszögű 34a, 34b prizmák törési szögének kétszeresével egyezik meg. A 32 lézernyaláb a prizmapáron való áthaladáskor a 34a, 34b prizmák szöghelyzetétől függő irányban többszörösen megtörik és ily módon terjedési iránya a kívánt módon változtatható. Ennek eredményeként a 32 lézernyaláb a 20 nyalábmozgató

szervet elhagyva a 22 áramlási cella és a 24 optikaiszál-köteg által kijelölt irányban halad tovább.

A 20 nyalábmozgató szervet egy lehetséges másik példakénti kiviteli alakjában (lásd a 6B ábrát) maga a 26 lézerforrástartó képezi, amely az optikai tengelyre merőleges síkból a 32 lézernyaláb terjedési irányába adott szögben megdöntve állítja be a 32 lézernyaláb kívánt, azaz a 22 áramlási cella és a 24 optikaiszál-köteg által kijelölt terjedési irányát. Ebben az esetben a 32 lézernyaláb maximális kitérését és így a megvilágító folt által bejárható 35' tartományt a mozgató mechanika maximális billentési szöge határozza meg.

A 20 nyalábmozgató szervet elhagyó 32 lézernyaláb a 14 optikai egység részét képező 22 áramlási cellára esik. A 22 áramlási cellát legegyszerűbb kiviteli alakjában (lásd például az 1., 2. és 4A ábrákat) egy hosszúkás hengeres vagy hasáb alakú test képezi, amelynek térfogatában hosszirányban terjedő áramlási 22a csatorna van kiképezve, minek eredményeként a tekintett test a 32 lézernyaláb haladási irányában adott falvastagsággal rendelkezik. Az áramlási 22a csatorna a 22 áramlási cella hosszirányára merőleges metszetben célszerűen általában kör vagy téglalap alakú. Az áramlási 22a csatorna átmérője legalább 100 μm és legfeljebb néhány száz μm , előnyösen kb. 250 μm . Amint az korábban már említésre került, a 32 lézernyaláb a 22 áramlási cellát annak 22a csatornája középvonalában egy lényegében ellipszis alakú és gaussi teljesítménysűrűség-eloszlású folt (megvilágított tartomány) világítja meg. Az ellipszis alakú folt kis- és nagytengelye rendre kb. 30 μm és kb. 50 μm közé, illetve kb. 150 μm és kb. 300 μm közé esik, előnyösen rendre kb. 30 μm és kb. 200 μm nagyságú. A 22 áramlási cella a 14 optikai egységben oly módon van elrendezve, hogy áramlási 22a csatornája az optikai tengelyre lényegében merőleges legyen. Ennek megfelelően a 22 áramlási cellában a mérés során a mérendő minta a 14 optikai egység optikai tengelyére lényegében merőleges irányban áramlik.

A találmány szerinti 10 citométerben alkalmazható további lehetséges példakénti 22', 22'', 22''' áramlási cella kiviteli alakokat a 10A és 10B, illetve a 11A és 11B ábrák szemléltetik. A tekintett 22', 22'', 22''' áramlási cellák mindegyike négy-négy, célszerűen egybevágó, téglalap alaplapú és fedőlapú csonkagúla formájú prizmából van kialakítva oly módon, hogy áramlási 22a', 22a'', 22a''' csator-



náik falait a csonkagúla formájú prizmák fedőlapjai határozzák meg a prizmák fedőlappal összefordított és megfelelő oldallapjaik mentén páronként (például ragasztással) egyesített helyzetében. A 22', 22'', 22''' áramlási cellák tekintett kiviteli alakjainál, azok konstrukciója következtében, a 22a', 22a'', 22a''' csatornák összeszűkülő belépő és táguló kilépő zónákkal rendelkeznek. A 22', 22'', 22''' áramlási cellákat alkotó prizmák üvegből, kvarcból, műanyagból, illetve tetszőleges, a 26 lézerforrás által kibocsátott lézerfény(ek) hullámhosszán/hullámhosszain fényát-eresztő, továbbá a 22a', 22a'', 22a''' csatornákon átvezetett anyagokkal szemben ellenálló anyagból lehetnek; a megfelelő anyag megválasztása a területen járatos szakember számára kézenfekvő.

A 22', 22'', 22''' áramlási cellák mindegyike olyan kialakítással rendelkezik, hogy a ráeső megvilágító lézerfény a 22a', 22a'', 22a''' csatornákon kívüli tartományokban a 24 optikaiszál-köteg irányában nem tud továbbhaladni. Ezáltal jelentős mértékben csökken az 24 optikaiszál-köteget közvetlenül elérő megvilágító fény mennyisége, ami segíti a mérések elvégzését és javítja a jel/zaj viszonyt. Amint azt a 10B ábra mutatja, a 22' áramlási cella esetében ezt úgy érjük el, hogy a 22' áramlási cellát alkotó prizmák szemközti párjait páronként eltérő törésmutatójú anyagból készítjük, ahol a prizmák anyagait és törésmutatóit úgy választjuk, hogy a 22' áramlási cellát a 22a' csatornán kívüli tartományokban elérő 32' lézernyaláb a 22' áramlási cellán való áthaladása közben a 22' áramlási cellát alkotó prizmák egymással érintkező oldallapjain, mint határfelületen, elszenvedett fénytörés(ek) következtében eredeti terjedési irányától jelentős mértékben (célszerűen legalább 45°-ban) eltérüljön. A prizmák anyagait előnyösen úgy választjuk, hogy a 32' lézernyaláb a 22' áramlási cellán áthaladása során a terjedése irányában utolsó határfelületen lényegében teljes visszaverődést szenvedjen.

Amint azt a 11A ábra mutatja, a fenti kívánt viselkedést egy másik példakénti 22'' áramlási cella esetében oly módon érjük el, hogy a 22'' áramlási cellán a 22a'' csatornán kívüli tartományokban áthaladó 32'' lézernyaláb terjedési útjában a cellát alkotó, egyesített prizmák utolsó határfelületénél 36 tükröző felület alakítunk ki, előnyösen például egy fém vékonyréteg formájában, amely a ráeső 32'' lézernyalábot eredeti terjedési irányától jelentős mértékben eltéríti, így az a 24 optikaiszál-köteget nem érheti el.

Amint azt a 11B ábra mutatja, a fenti kívánt viselkedést egy másik példakénti 22'' áramlási cella esetében oly módon érjük el, hogy a 22'' áramlási cellán a 22a'' csatormán kívüli tartományokban áthaladó 32'' lézernyaláb terjedési útjában a cellát alkotó egyesített prizma határfelületeinek legalább egy részénél
5 38 csillapító réteget rendezünk el, előnyösen például egy, a 26 lézerforrás által emittált hullámhossz(ok)on optikai elnyelő anyagból készített bevonat formájában, amely a ráeső 32'' lézernyaláb energiájának egy részét, ideális esetben annak teljes egészét elnyeli, és így a 24 optikaiszál-köteget a 22'' áramlási cella anyagán keresztül csak kis mennyiségű fény éri el közvetlenül.

10 Visszatérve az 1. és a 4A ábrákhoz, a mérés során a 22 áramlási cella 22a csatornáján áramlik keresztül a mérendő minta, amelyben a vizsgálat tárgyát képező 40 objektumok (a mintától függően például teljes vér alakos elemei vagy egyéb sejtes elemek, valamint ezekhez hasonló) lényegében a mintaáram középvonalában és egyesével haladnak, amint azt a következőkben részletesen is-
15 mertetjük majd. A 40 objektumok előrehaladásuk közben elérik a 22a csatornáinak a 32 lézernyaláb által megvilágított tartományát (a megvilágítási zónát), ahol a rájuk eső lézertény egy része a tér minden irányába adott térbeli mintázat szerint szóródik. Amint az köztudott, az eltérő méretű, formájú, és adott esetben belső szerkezettel rendelkező 40 objektumok a rájuk eső fényt az egyes térbeli tartomá-
20 nyokba különböző mértékben szórják. A szórt fény ezen térbeli mintázat szerint, például meghatározott kúpszógtartományonként történő elemzéséből következtetni lehet a vizsgálat tárgyát képező 40 objektumok keresett tulajdonságaira.

Ehhez a mérés következő lépéseként a különböző tértartományokba szóródott lézertény összegyűjtésére van szükség, ami a speciális kiképzésű előlő-
25 (közös) 42 véggel rendelkező 24 optikaiszál-köteg feladata. A (például sejtes elemek képezte) 40 objektumok vizsgálatához kiválasztott különböző tértartományok számától függően a 24 optikaiszál-köteg több különálló elvezető 24-1, 24-2, ..., 24-
p kötegre bomlik szét, ahol az elvezető 24-1, 24-2, ..., 24-p kötegek mindegyike egy-egy vizsgált tértartományba szóródott és onnan összegyűjtött lézertényt to-
30 vábbít a 16 vezérlő és kiértékelő egységbe, melynek összetevőit a későbbiekben részletesen ismertetjük majd.

Amint azt a 4A, 4B és 5A-5C ábrák mutatják, a 24 optikaszál-köteg üveg-
ből vagy műanyagból készített, önmagukban ismert elemi 44 optikai szálakból
épül fel, amelyek átmérője kb. 70 μm és kb. 500 μm közé esik. A 24 optikaszál-
kötegben az elemi 44 optikai szálak szorosan egymás mellett, a lehető legkom-
5 paktabb térkitöltési séma szerint helyezkednek el, és egymáshoz ragasztással
vagy szintereléssel kapcsolódnak. Ennek eredményeként a 44 optikai szálak kö-
zötti geometriai veszteség minimális. A 24 optikaszál-köteg elülső 42 vége 45
elválasztólemezekkel (célszerűen gyűrű alakú) tartományokra van felosztva. Az
egy-egy tartományokba tartozó 44 optikai szálak alkotják az elvezető 24-1, 24-2, ... ,
10 24-p kötegeket (1. ábra), amelyek a már említett 16 vezérlő és kiértékelő egység-
hez csatlakoznak. A 24 optikaszál-köteg elülső 42 végén egy hosszúkás, az opti-
kai tengelyre merőlegesen terjedő 46 kitakarólemezzel van ellátva (5C ábra). Egy
lehetséges másik kiviteli alakjánál a 24 optikaszál-köteg a 46 kitakarólemez he-
lyett egy ellipszis alakú központi elvezető 47 köteget foglal magában (5B ábra). A
15 46 kitakarólemez és az ellipszis alakú 47 köteg feladata rendre a 42 véget közvet-
lenül (azaz szóródástól mentesen) elérő megvilágító fény útjának elzárása annak
kitakarása, illetve felfogása/elvezetése által. Itt kívánjuk megjegyezni, hogy a 46
kitakarólemez a 22 áramlási cella 24 optikaszál-kötegre néző felületének egy
megfelelő mintázat szerinti bevonatolásával is helyettesíthető, amennyiben a be-
20 vonat anyagául például a 11B ábra kapcsán ismertetett fényelnyelő tulajdonságú
anyagot használjuk.

Speciálisan az 5A ábra a 24 optikaszál-kötegeknek egy olyan példakénti kivi-
teli alakját ábrázolja, amelynél a 45 elválasztólemezek a 44 optikai szálakat három
koncentrikus tartományra, azaz egy, a 24 optikaszál-köteget közvetlenül elérő lé-
25 zerfényt fogadó központi tartományra, továbbá egy ún. kisszögű és egy ún. nagy-
szögű tartományra osztja fel aszerint, hogy azok melyik térbeli tartományból beér-
kező lézerfényt gyűjtik össze. A 24 optikaszál-köteg ezen kiviteli alakja különösen
előnyös egy olyan citométerben való alkalmazásra, amely humán vagy állati teljes
vér képezte minta alakos elemeinek a vizsgálatára szolgál.

30 Visszatérve a 4B ábrához, a mérendő 40 objektum áthalad az ellipszis ala-
kú és Gauss-függvény szerinti teljesítménysűrűség eloszlással rendelkező megvi-
lágító 32 lézernyalábon. A 40 objektumról szóródó fény intenzitása a 40 objektum

szerkezetétől, valamint a megvilágító fény intenzitásától függ, ami a gaussi 32 lézernyaláb tengelyében a legnagyobb. Egy kiválasztott 44 optikai szálhoz a megvilágító 32 lézernyalábból származó 32a direkt fény és a gaussi nyaláb tengelyén áthaladó 40 objektumon szóródó 32b szórt fény nem azonos szög alatt (rendre φ_2 és φ_1) érkezik meg, így a beesési szögtől függően a becsatolás hatékonysága is eltérő lesz.

A 24 optikaszál-köteg középvonalában elhelyezkedő egyedi 44 optikai szál az optikai tengelyre merőleges 50 belépőfelülettel rendelkezik, a középben elhelyezkedő 44 optikai szállal párhuzamosan beeső nyaláb becsatolási tényezője a legnagyobb. A legnagyobb becsatolási tényezővel rendelkező irány a 24 optikaszál-köteg középvonalától távolodva a 44 optikai szál hossz tengelyével α szöget bezáró 50' belépőfelület esetén φ_1 szöggel elfordul. Az ideális becsatolási iránytól távolodva a beeső nyaláb becsatolási tényezője csökken, majd egy határszöget elérve a beeső nyaláb a 44 optikai szálba már nem tud belépni és a köztes anyagban nyelődik el. Az egyedi 44 optikai szálak becsatolási karakterisztikája a találmány szerinti 24 optikaszál-köteg közös 42 végének kiképzése következtében úgy módosul, hogy a becsatolási karakterisztika maximuma a látszólagos mérendő 40 objektumok irányában jelentkezik. A teljes 24 optikaszál-kötegre maximális lesz a becsatolási hatékonyság – kiegészítő kondenzorlencse alkalmazása nélkül. A közvetlen megvilágító lézertényező fókuszpontja eltér a szórt fény látszólagos fókuszpontjától, így a rá vonatkozó becsatolási tényező minden egyes egyedi 44 optikai szál esetében kisebb lesz, mint a szórt fényre vonatkozó becsatolási tényező.

Az előzőek értelmében a 24 optikaszál-köteg közös 42 vége az optikai tengelyre merőleges sík formájában vagy félgömb formájában vagy egyéb, szakember számára ismert optikai gyártóberendezésekkel, célszerűen csiszolás útján nyerhető, például aszférikus felület formájában állítható elő.

A 24 optikaszál-köteg egyik előnyös kiviteli alakjánál a közös 42 vég egy olyan félgömb formájában kerül kialakításra, amelynek sugara megegyezik a látszólagos mérendő 40 objektum és a 24 optikaszál-köteg távolsága kb. felével.

A 24 optikaszál-köteg közös 42 végének kívánt kiképzésével kondenzorlencse alkalmazása nélkül érhető el, hogy a 44 optikai szálakba a mérendő 40 ob-

jektumon szóródó lézerefény csatolódjon be a legnagyobb hatékonysággal. Az ettől eltérő irányokból érkező megvilágító fény a 44 optikai szálakba ennél kisebb hatékonysággal csatolódik be. A 24 optikaiszál-köteg közös 42 végének megfelelő kiképzésével nő a 16 vezérlő és kiértékelő egység részét képező analóg 52 erősítőmodul bemenetére jutó hasznos szórtfény-teljesítmény, továbbá csökken az analóg 52 erősítőmodul bemenetére jutó megvilágítófény-teljesítmény, illetve az ebből eredő zaj. Vagyis a 24 optikaiszál-köteg közös 42 végének előzőekben bemutatott kialakításával a találmány szerinti 10 citométer használatakor egyértelműen javul a jel/zaj viszony.

Visszatérve az 1. ábrához, a 24 optikaiszál-köteg által továbbított, térbeli tartományonként összegyűjtött lézerefényt a 16 vezérlő és kiértékelő egység, pontosabban annak analóg 52 erősítőmodulja fogadja, amely egy sokcsatornás erősítő. Az 52 erősítőmodul bemenetén csatornánként egy-egy (rajzon külön nem jelölt) A_1, \dots, A_p detektort (előnyösen egy-egy PIN típusú vagy egy-egy lavina fotodiódát) tartalmaz, amely transzimpedanciás erősítőkhöz csatlakozik. Az egyes csatornák több AC-csatolt fokozatot tartalmaznak a kapott villamos jel további erősítésére, szintillesztésére és szűrésére. Az analóg 52 erősítőmodul kimenetén a beeső fényteljesítménnyel arányos villamos jel jelentkezik. Egy lehetséges másik kiviteli alaknál az analóg 52 erősítőmodul kimenetén emellett egy további, az átlagos beeső fényteljesítménnyel arányos villamos jel is megjelenik.

Az analóg 52 erősítőmodul a 16 vezérlő és kiértékelő egység részét képező analóg-digitális 53 átalakítómodulhoz csatlakozik, amely az analóg 52 erősítőmodul kimeneti jeleit csatornánként digitalizálja és 54 jelfeldolgozó egységhez továbbítja.

Az 54 jelfeldolgozó egység a 40 objektumok által szórt fénynek megfelelő, az analóg 52 erősítőmodul kimenetén keltett majd az analóg-digitális 53 átalakítómodul által digitalizált villamos impulzusok paramétereit, például azok csúcsértékét, időtartamát, átlagértékét, integrálját, jelformáját határozza meg, amelyekből a 16 vezérlő és kiértékelő egység részét képező 55 méréskiértékelő egység ezt követően a minta 40 objektumainak fizikai tulajdonságait származtatja. Az így nyert fizikai tulajdonságok szükség szerint megjeleníthetők és/vagy a későbbi felhasználás céljából megfelelő adathordozón tárolhatók.

A megvilágító 32 lézernyaláb szabályozása/pozicionálása céljából az 54 jelfeldolgozó egység által meghatározott paraméterek egy részét felhasználva 56 szabályozóegység 57 motormeghajtó útján megfelelő áttételt alkalmazva 58 motor segítségével a 20 nyalábmozgató szervet vezérli, amint azt a későbbiekben részletesen tárgyaljuk majd.

Megjegyezzük, hogy a 16 vezérlő és kiértékelő egység egyik előnyös kivitel alakjánál az analóg-digitális 53 átalakítómodult, az 54 jelfeldolgozó egységet, az 55 méréskiértékelő egységet, valamint az 56 szabályozóegységet (illetve ezek közül egyet vagy többet) megfelelően programozott számítógép is helyettesítheti, amely gondoskodik az analóg villamos jelek digitalizálásáról, a digitális jelek kiértékeléséről és az így nyert eredmények (előnyösen például a minta alakos elemeknek populációit külön-külön kirajzoló szórásdiagramok formájában történő) megjelenítéséről és szükség szerinti tárolásáról, valamint azok alapján a megvilágító 32 lézernyaláb kívánt/szükségszerű szabályozásáról.

Amint azt az 5A ábra vázlatosan mutatja, a 24 optikaszál-köteg elvezető 24-1, ..., 24-p kötegeinek végei szintén speciális kiképzéssel rendelkeznek. A kialakítás lényege, hogy a 24-1, ..., 24-p kötegek keresztmetszeténél kisebb érzékelőfelülettel bíró detektorok esetén a 24-1, ..., 24-p kötegek kicsatoló végeit elhagyó fény az 52 erősítőmodul bemenetein lévő A_1, \dots, A_p detektorok érzékelőfelületeit minél nagyobb arányban érje el anélkül, hogy ehhez kondenzorlencse használatára lenne szükség. Ehhez az elvezető 24-1, ..., 24-p kötegek kicsatoló végei gömbi vagy aszférikus felületet meghatározón vannak kiképezve. Ilyen esetben ahhoz, hogy az egyes 24-1, ..., 24-p kötegekből kilépő, összetartó nyalábot alkotó fény teljes egészében az A_1, \dots, A_p detektorok érzékelőfelületeire essék, az A_1, \dots, A_p detektorokat a 24-1, ..., 24-p kötegek végeitől adott távolságban kell elrendezni. Ezáltal a detektorok érzékelőfelületeinek geometriai veszteségektől mentes megvilágítása érhető el kiegészítő optikai elemek (pl. lencsék) használata nélkül is. Egy lehetséges másik kiviteli alaknál, ahol a detektorok érzékelőfelületei az elvezető 24-1, ..., 24-p kötegek keresztmetszeteinél nagyobbak, a 24 optikaszál-köteg A_1, \dots, A_p detektorokhoz csatlakozó elvezető 24-1, ..., 24-p kötegeinek kicsatoló végei egy, az adott 24-1, ..., 24-p köteg geometriai tengelyére merőleges sík formájában vannak kiképezve.

A továbbiakban az 1. és a 2. ábrához kapcsolódóan a találmány szerinti, áramlási 10 citométerben alkalmazott speciális 12 hidro-pneumatikus egységet, illetve annak működését ismertetjük részletesen.

A találmány szerinti 10 citométer 12 hidro-pneumatikus egységének feladata, hogy a vizsgálandó mintából az optikai elvű mérés elvégzésére alkalmas mintaoldatot előállítsa, az így nyert mintaoldatot a tekintett mérésre előkészítse, majd a 22 áramlási cella 22a csatornájába állandó térfogatáram mellett betáplálja és a 22a csatornán a mérés végrehajtása közben keresztülvezesse. A mintaoldat előállítását és előkészítését a vizsgálandó minta és különféle reagensek elegyítését, majd az elegyben lejátszódó (bio)kémiai reakciók időbeli és térbeli lefolyásának szabályozását (speciálisan az elegyíteni szándékozott reagensek térfogatarányainak, az inkubációs időeknek és a hőmérsékletnek a beállítását) foglalja magában – mindez biokémiai 64 előkészítő egységben kerül végrehajtásra. Az előkészített mintaoldat 22 áramlási cellába táplálása speciális, önmagában ismert kialakítású 66 közösítőtag segítségével történik, amely egyben a mintaoldat hidrodinamikai fókuszálásáról is gondoskodik. A megfelelő paraméterekkel (hőmérséklet, viszkozitás, stb.) rendelkező köpenyfolyadék alkalmazásával történő hidrodinamikai fókuszálás önmagában ugyancsak ismert.

A 12 hidro-pneumatikus egység kezdőpont és végpont között terjedő zárt folyadékáramlási pályát foglal magában. A folyadékáramlási pálya 62 mintaágból és 63 köpenyfolyadék-ágból áll, melyek a bemutatott kiviteli alaknál egymással célszerűen párhuzamosan terjednek. A 62 mintaág és a 63 köpenyfolyadék-ág kezdőpontját a köpenyfolyadék tárolására szolgáló, adott (célszerűen légköri) nyomáson tartott 60 tartály képezi. A 62 mintaághoz, annak különböző pontjaiban, V_1, \dots, V_n szelepeken keresztül rendre 60-1, ..., 60-n tartályok csatlakoznak, melyek különféle reagensek – és ezek között maga a minta – tárolására szolgálnak. Az egyes reagenseknek a 60-1, ..., 60-n tartályokból a 62 mintaágba való betáplálására a V_1, \dots, V_n szelepek egyik beömlésével közlekedő 69-1, ..., 69-n reagenspumpák szolgálnak. A 62 mintaág és a 63 köpenyfolyadék-ág a 66 közösítőtagban találkoznak, ahonnan a 22a csatornán keresztül a végpontig együtt haladnak tovább. A 12 hidro-pneumatikus egység végpontjában egy, a 22 áramlási cellából távozó mintaoldatot fogadó és adott esetben összegyűjtő, a 60 tartályban fenntar-

tott állandó nyomásnál mintegy 0,35-0,7 bar értékkel alacsonyabb nyomású 59 vákuumtartály van elrendezve. A kezdőpont és a végpont közötti folyadékáramlási pályát szükség szerint elágazó csővezetékek biztosítják. Ezen csővezetékekbe van egymást követően beiktatva a kezdőponttól a végpont felé mutató áramlási irányban a biokémiai 64 előkészítő egység, a 66 közösítőtag, majd a 22 áramlási cella (a megadott sorrendben). Emellett a 62 mintaágba közvetlenül a 66 közösítőtagot megelőzően áramlásirányban kétutas V_m és V_i váltószelepek, míg a 63 köpenyfolyadék ágba V_s szelep van beiktatva. A 22 áramlási cellából kilépő minta-áram az 59 vákuumtartályt V_v szelepen keresztül éri el. A V_m váltószelep beömléseinek egyike a 64 előkészítő egységgel közlekedik, míg másik beömlése a 63 köpenyfolyadék-ágba csatlakozik be áramlásirányban a V_s szelepet megelőzően. A V_m váltószelep kiömlése a V_i váltószelep beömlésével közlekedik. A V_i váltószelep egyik kiömlése a 66 közösítőtagba torkollik, míg másik kiömlése 65 elkerülővezetéken keresztül az áramlási pályába csatlakozik be áramlásirányban a 22 áramlási cella és a V_v szelep között. A V_i , V_m váltószelepek, valamint a V_s , V_v szelepek célszerűen elektronikusan vezérelt precíziós szelepek, melyek a 12, 12' hidro-pneumatikai egységben fennálló áramlási viszonyokat befolyásolják.

A biokémiai 64 előkészítő egység a különféle reagensek kezelésére/bekeverésére moduláris kialakítással rendelkezik: tetszőleges számú (az 1. ábrán változtatott kiviteli alak esetében n darab), egymással csatlakoztatott 68-1, ..., 68- n reagens ágat tartalmaz reagensekkel. A szóban forgó 68-1, ..., 68- n reagens ágak célszerűen lényegében azonos felépítésűek, bár ez nem követelmény. A k -adik 68- k reagens ágat szematikusan a 3. ábra szemlélteti. A 68- k reagens ág a k -adik reagens tárolására szolgáló 60- k tartályt, a tekintett reagens meghatározott adagolási sebességgel történő adagolására alkalmas 69- k reagenspumpát, a reagens betáplálását biztosító kétutas V_k szelepet, valamint 71- k beömléssel és 72- k kiömléssel rendelkező 70- k mikroreaktor foglalt magában. A váltószelep formájában kialakított, előnyösen elektronikusan vezérelt mágnesszelep képezte V_i szelep – az általa kijelölt aktuális áramlási útnak megfelelően – a 69- k reagenspumpa által adagolt k -adik reagenst vagy a köpenyfolyadékot vezeti a 71- k beömléshez. A moduláris felépítésű biokémiai 64 előkészítő egység egy kiválasztott közbenső (például k -adik) reagens ága mikroreaktorának a beömlése az áramlásirányban őt

megelőző (azaz $(k-1)$ -edik) reagens ág mikroreaktorának a kiömlésével, míg a tekintett reagens ág mikroreaktorának a kiömlése a rákövetkező (azaz $(k+1)$ -edik) reagens ág mikroreaktorának a beömlésével közlekedik arra alkalmas 61 csatlakozóelemeken keresztül, amint azt az 1. ábra mutatja. A 64 előkészítő egységben az áramlási irányban legelső 68-n reagens ág beömlése a 60-n tartállyal, míg az áramlási irányban legutolsó 68-1 reagens ág kiömlése a 66 közösítőtaggal van csatlakoztatva az említett V_m és V_i váltószelepeken keresztül. A vizsgálat tárgyát képező minta célszerűen az áramlási irányban legelső 68-n reagens ágban lévő 60-n tartályban kerül elhelyezésre, bár ez nem törvényszerű. A reagens ágak közül egy vagy több a későbbiekben részletesen ismertetésre kerülő automatizált nyalábpozicionáláshoz adott esetben kalibrálóanyag(ka)t tartalmazhat. A reakcióidő az egyes 70-1, ..., 70-k mikroreaktorokban egyenesen arányos az adott mikroreaktor térfogatával és fordítotán arányos az azon átáramló folyadékárammal.

A 2. ábra a találmány szerinti 10 citométer egy olyan 12' hidro-pneumatikus egységének a tömbvázlata, amelynek három 68-1, 68-2, 68-3 reagens ágat tartalmazó biokémiai 64' előkészítő egysége van. Ezen kiviteli alak célszerűen humán vagy állati eredetű teljes vér alakos elemeinek mérésére szolgál. A 68-1 reagens ág tartalmazza a teljes vér képezte mintát (adott esetben izotóniás hígítószerral elegyítve), a 68-2 reagens ágban történik a hemolízist beindító hemolizálószert hozzáadása, míg a 68-3 reagens ágban valósul meg a stabilizálószer, azaz a hemolízist leállító reagens vérmintához adása.

A biokémiai 64, 64' előkészítő egység egyik fő feladata, hogy a belőle távozó mintaáram teljes térfogatára nézve a lehető leghomogénabb legyen és benne a kívánt reakciók a lehető legteljesebb mértékben lejátszódjanak, vagyis a mintaáram kívánt biokémiai előkészítése megtörténjék. A reagensek mintaáramhoz való hozzáadása az egymás utáni reagens ágak (egyidejű vagy egymást követő) működtetésével történik a megfelelő szelepek beállítása útján.

A mintaáram és a hozzáadott reagensek elegyét homogenizálásnak kell alávetni. E célból valamennyi mikroreaktor keverőegységgel van ellátva. Ilyen 80 keverőegységet ábrázol vázlatosan a 8. ábra. A 80 keverőegység a mikroreaktor rugalmas külső falát szorítja össze, és ezáltal a mikroreaktor belső terében – annak megbontása nélkül – különböző alakú kamrákat és csatornákat formáz. A te-

kintett 80 keverőegység ugyancsak moduláris felépítésű: kívánt számú elemi szorítóelem egyesítésével kerül kialakításra. Az ilyen elemi 82, 82' szorítóelemeket, illetve az azok alkalmazásával nyert deformált csövek képezte 83, 83' mikroreaktorokat szemléltetik rendre a 7A, 7C és 7B, 7D ábrák. A tekintett 82, 82' szorítóelemeket adott távolságra lévő sík 84, 84' alapok között, a 84, 84' alapokra lényegében merőlegesen terjedő, egymástól adott távolságban elrendezett legalább két 85a, 85b és 85a', 85b' fal képezi, ahol a 85a, 85b és 85a', 85b' falak mindegyike egy-egy, a 83, 83' mikroreaktor fogadó 86a, 86b és 86a', 86b' réssel van ellátva. A 86a, 86b rések egymásra lényegében merőlegesen terjednek. Ehhez hasonlóan, a 86a', 86b' rések egymásra lényegében szintén merőlegesen terjednek. A 86a, 86b és 86a', 86b' rések alakja tetszőleges lehet például határolhatják azokat egyenes élek (7A ábra), illetve a határoló élek egy része ívelt is lehet (7C ábra). A csatornák és kamrák alakját a 82, 82' szorítóelemek formája, a tekintett rések mérete, továbbá a 83, 83' mikroreaktor falának rugalmassága határozza meg. A kialakuló kamrák és csatornák a rajtuk átáramló keveréket turbulens áramlásra készítetik, így annak összetevőit tökéletesen összekeverik. Az összekeverés mértéke – a kamrák és csatornák alakján túlmenően – az alkalmazott 82, 82' szorítóelemek számával is befolyásolható. A 82, 82' szorítóelemek hibamentesen és egyszerűen kialakíthatók, például műanyagból fröccsöntéssel vagy sajtolással, illetve fémből öntés útján. Emellett a belőlük kialakított 80 keverőegység, a modulrendszerű felépítés következtében, sérülése esetén könnyedén javítható (például a sérült szorítóelem(ek) cseréjével) vagy átalakítás céljából egyszerűen módosítható. A sérült vagy adott esetben eltömődött 83, 83' mikroreaktor szakaszok ehhez hasonlóan szintén egyszerűen javíthatók/cserélhetők.

25 A reagensek és a mintaoldat reakcióinak ideális eredménnyel történő lejátszódása általában adott szűk hőmérséklettartományt követel meg. Ehhez a hőmérséklet előre beállított tartományban tartása céljából a biokémiai 64 előkészítő egység részét képező 68-1, ..., 68-n reagens ágak 88 hőmérsékletszabályozó szerv útján temperáláson esnek át. A 88 hőmérsékletszabályozó szerv a hőmérséklet növelését megfelelő fűtőelemmel, míg annak csökkentését megfelelő hűtőelemmel, előnyösen például egy Peltier elemmel valósítja meg.

Mérés végzéséhez a találmány szerinti 10 citométer három fő komponensének mindegyikét működésbe hozzuk. Ennek keretében a 12 hidro-pneumatikai egység felkészül a mérés végrehajtására alkalmas mintaáram előállítására és 22 áramlási cellába juttatására, a 14 optikai egység előállítja a 22 áramlási cella kívánt megvilágításához szükséges 32 lézernyalábot, míg a 16 vezérlő és kiértékelő egység szükség esetén – később részletesen ismertetésre kerülő módon – gondoskodik a 32 lézernyaláb megvilágító foltjának megfelelő beállításáról/pozicionálásáról.

A mérés megindítását megelőzően a 68-1, ..., 68-n reagens ágakat, valamint a 62 mintaágot a V_1, \dots, V_n szelepek és a V_m váltószelep 66 közösítőtag irányában vezető (nyitott) állása, a V_l váltószelep 65 elkerülővezeték irányában vezető (nyitott) állása, valamint a V_s szelep zárt és a V_v szelep nyitott állása mellett a 60-1, ..., 60-n tartályokból a 69-1, ..., 69-n reagenspumpák útján reagensekkel (köztük például a 60-n tartálybeli mintával) töltjük fel.

A feltöltés befejezését követően a V_1, \dots, V_n szelepek átállításával a 68-1, ..., 68-n reagens ágak reagensutánpótlását megszüntetjük és egyben a tekintett 68-1, ..., 68-n reagens ágakat, azok köpenyfolyadékkal történő feltöltése céljából, a köpenyfolyadékot tároló 60 tartállyal nyitjuk össze. Az 59 vákuumtartályban, valamint a köpenyfolyadékot tároló 60 tartályban fennálló nyomások különbsége következtében a V_l váltószelepen keresztül áramlás indul meg. A 62 mintaágbeli áramlás következtében a mintaoldal és az egyes 68-1, ..., 68-n reagens ágakból a 61 csatlakozóelemeken keresztül a 62 mintaágba táplált reagensek a 80 keverőegységekkel ellátott 70-1, ..., 70-n mikroreaktorokon való előrehaladás során egymással keverednek és reakcióba lépnek.

Ezután a 62 mintaágban elhelyezett V_l váltószelepet olyan állásba kapcsolva, hogy a 66 közösítőtag irányába vezessen; a mintaáram a már említett nyomáskülönbség hatására a 66 közösítőtagon keresztül fog az 59 vákuumtartály felé haladni. Az előkészített mintaáram 66 közösítőtaghoz való viszonylag gyors eljuttatása (vagyis ún. előtolása) érdekében célszerű lehet a 63 köpenyfolyadék ágban lévő V_s szelepet ideiglenesen zárt állásban tartani. Ezáltal az 59 vákuumtartálybeli és 60 tartálybeli nyomások különbsége teljes egészében a 62 mintaágra jut, ami a mintaáram előtolásának felgyorsulását eredményezi. A V_s szelep megnyitásával a

tekintett nyomáskülönbség hatására a 63 köpenyfolyadék ágban megindul a köpenyfolyadék áramlása a 66 közösítőtagon és a 22 áramlási cellán keresztül az 59 vákuumtartály irányába.

A mintaoldat és egy kiválasztott, például a k -edik 61 csatlakozóelemnél be-
5 táplált reagens keveredési arányát a folyadékáramlási pálya 60 tartálytól k -edik 61 csatlakozóelemig terjedő része áramlási ellenállásának (továbbiakban ellenállásának) és a k -edik reagens ág teljes egésze ellenállásának az aránya befolyásolja. A reakcióidő a teljes folyadékáramlási pályára érvényes ellenállásarányoktól függ. Az egyes 68-1, ..., 68- n reagens ágak ellenállásai például a 80 keverőegységet
10 felépítő 82, 82' szorítóelemek által a 83, 83' mikroreaktorok falára kifejtett nyomóerők beállításával rögzíthetők, amelyek szabályozása történhet akár manuálisan, akár automatizált formában.

Az így létrejött, reagensekkel elegyített és a megfelelő (bio)kémiai reakciókon átesett mintaoldat a 66 közösítőtagba áramlik. A 66 közösítőtag a 62 minta-
15 ágból érkező mintaáramot geometriai kialakításának eredményeként a 63 köpenyfolyadék ágból érkező köpenyfolyadék-áram középvonalába helyezi és annak keresztmetszeti kiterjedését a 22 áramlási cella 22a csatornájának keresztmetszeténél kisebb keresztmetszetre szűkíti. A köpenyfolyadékkal körülvevett minta a 66 közösítőtagból a 22 áramlási cella 22a csatornájába áramlik. Az áramlás lamináris,
20 így a köpenyfolyadék és a minta egymással nem keveredik. A köpenyfolyadék az áramlási 22a csatormán való áthaladás közben a mintát mindvégig a 22a csatorna középvonalában tartja. A lamináris áramlás kialakulásához és fennmaradásához a 66 közösítőtagban az oda belépő mintaáramnak és a köpenyfolyadék-áramnak a mintaáram belépési pontjában közel azonos sebességgel kell rendelkeznie. Megjegyezzük, hogy a mintaáram sebessége az ideális érték környezetében
25 kismértékben módosítható a lamináris áramlás fenntartása mellett. A megfelelő sebességek beállítása a 69-1, ..., 69- n reagenspumpák használata nélkül, a 62 mintaág és a 63 köpenyfolyadék ág áramlási ellenállásaival történik. A két ágban kialakuló térfogatáramok aránya fordítottan arányos a teljes folyadékáramlási pályának a két ágat képező részei ellenállásának az arányával és egyértelműen
30 meghatározza a kialakuló mintaáram keresztmetszetét. Tehát a találmány szerinti 10 citométer áramlási 22a csatornájában haladó mintaáram keresztmetszete vég-

ső soron a 62 mintaág és a 63 köpenyfolyadék ág áramlási ellenállása arányának a változtatásával (kismértékben) szabályozható. Speciálisan, a 62 mintaág ellenállásának növelésével (például a reagens ágak számának mérséklésével), vagy a 63 köpenyfolyadék ág ellenállásának csökkentésével a mintaáram keresztmetszete csökken, és megfordítva. Mindezek eredményeként a mérés egy stabil, ingadozásoktól mentes mintaáramon végezhető, ami pontosabb eredmények származtatását teszi lehetővé. Megjegyezzük, hogy a 22 áramlási cella és az 59 vákuumtartály közé beiktatott V_1 szeleppel, amit például egy változtatható átömlésű, elektronikusan vezérelt precíziós szelep képezhet, a teljes folyadékáramlási pálya mentén jelentkező nyomásesés értékét változtathatjuk. Megjegyezzük továbbá, hogy a V_1 szeleppel a 62 mintaágbeli és a 63 köpenyfolyadék ágbeli folyadékáramlások sebességeinek aránya adott határok között tetszőlegesen szabályozható és kívánt értékre állítható be, amivel elősegíthetjük, hogy a 66 közösítőtagban a mintaoldat és a köpenyfolyadék lamináris áramlása alakuljon ki.

Ezzel párhuzamosan a 26 lézerforrás kibocsátja a megvilágításra szolgáló lézernyaláb formájában a 22 áramlási cellára esik és megvilágítja a 22a csatormán átfolyó folyadékáramot. A 22 áramlási cellán átáramló, köpenyfolyadékkal körülvett és biokémiailag kívánt módon előkészített minta áthalad a megvilágító 32 lézernyalábon és eközben a benne lévő 40 objektumok a 32 lézernyaláb fényének egy részét térben szórják. A 22 áramlási cella kialakításától függően (lásd a 10A, 10B és 11A, 11B ábrák kapcsán bemutatott 22', 22'', 22''' áramlási cellákat) a 32 lézernyalábot elnyeli, eredeti irányától eltéríti vagy átérteszti. A 22 áramlási cellát meghatározott térbeli tartományban (jelen esetben, a 2. ábrával összhangban, egy kisszögű tartományban, amely az optikai tengellyel előnyösen kb. $1,5^\circ$ és kb. 3° közötti szöget zár be, és egy nagyszögű tartományban, amely az optikai tengellyel előnyösen kb. 4° és kb. 8° közötti szöget zár be) elhagyó szóródott lézernyaláb a 24 optikaszál-köteg közös 42 végére esik, ahol a korábban ismertetett módon az elemi optikai szálakba becsatlóódik, majd az elvezető 24-1, ..., 24-p kötegek útján az 52 erősítőmodul bemenetén lévő A_1, \dots, A_p detektorok érzékelőfelületeire jut, ahol megfelelő villamos jeleket generál. Az így kapott villamos jelek ezután a korábban már ismertetett módon kerülnek feldolgozásra.

Miután a mérendő mintaáram a 22a csatornán teljes hosszában áthaladt, a V_m váltószelep átállításával a V_v és a V_s szelepek nyitott állása, valamint a V_l váltószelep változatlanállása mellett a fennálló nyomáskülönbség hatására a 66 közösítőtagon és az áramlási 22a csatornán kizárólag köpenyfolyadék áramlik keresztül, ami elvégzi azok tisztítását/mosását és így a 22 áramlási cellát előkészíti a következő minta mérésére.

Itt kívánjuk megjegyezni, hogy a találmány szerinti 10 citométerben a V_1, \dots, V_n szelepek, a V_m, V_l váltószelepek, valamint a V_s, V_v szelepek megfelelő beállítása (vagyis azok kivánt irányú nyitott/zárt állásba juttatása) mellett az előzőekben részletezett, egymás után zajló feltöltési, keverési, előtolási és mérési lépések kiválthatók kizárólag az 59 vákuumtartályban és a köpenyfolyadékot tároló 60 tartályban uralkodó nyomások különbségével is, amint az a fenti ismertetés alapján a területen járatos szakember számára nyilvánvaló. Ilyen esetben a 69-1, ..., 69-n reagenspumpák feladata például a megfelelő reagensek kivánt mennyiségeinek a kimérésére korlátozódik. A nyomásvezérelt keverés, valamint a mérés és előtolás lejátszódhat egyidejűleg is – ilyen esetben a V_l váltószelep a 66 közösítőtag irányában nyitott és így a keverék közvetlenül a 22 áramlási cellába jut. Ebben az esetben a reakcióidőt a 22 áramlási cella ellenállása befolyásolja.

A minta biokémiai előkészítése és mérése ugyanakkor végrehajtható két különálló lépésben is. A biokémiai 64, 64' előkészítő egység a V_l, V_m váltószelepeken keresztül közvetlenül kapcsolódik a nyomástartályokhoz (vagyis a köpenyfolyadékot tároló 60 tartályhoz és az 59 vákuumtartályhoz). A 60 tartály és az 59 vákuumtartály között fennálló nyomáskülönbség hatására a reagensek és a minta keveredése az előzőekben ismertetett módon történik, azonban az előkészített minta nem áramlik át azonnal a 22 áramlási cellán. Ehelyett a V_l váltószelep átkapcsolását követően külön lépésben halad át a 22 áramlási cellán – ebben az esetben a biokémiai 64, 64' előkészítő egység a V_m váltószelep segítségével a 62 mintaágról lekapcsolható. Ebben az esetben a lamináris áramlást megszabó 62 mintaágbeli és 63 köpenyfolyadék-ágbeli áramlási ellenállások a két lépésben külön-külön optimálisan állíthatók be.

A találmány szerinti megoldás egy lehetséges további előnyös kiviteli alakjánál a biokémiai előkészítés nem a nyomáskülönbség által vezérelt módon, ha-

nem a 69-1, ..., 69-n reagenspumpák által kényszerített módon jön létre. Ebben az esetben a V_1, \dots, V_n szelepek a 68-1, ..., 68-n reagens ágakat a 69-1, ..., 69-n reagenspumpákkal kapcsolják össze és a megfelelő térfogatáramokat a tekintett 69-1, ..., 69-n reagenspumpák hozzák létre. Ezen elrendezés nagyszámú reagens
5 esetén alkalmazható előnyösen, mivel segítségével a megfelelő reakcióparaméterek egyszerűbben beállíthatók.

Amint arra korábban már utaltunk, a pontos mérésekhez elengedhetetlen a megvilágító 32 lézernyaláb 22 áramlási cellára, illetve annak a 22a csatornában haladó 40 objektumra való pozicionálása, vagyis a 10 citométer beállítása. A kö-
10 vetkezőkben a találmány szerinti 10 citométer 32 lézernyalábjának automatikus pozicionálását mutatjuk be a 9. ábrához kapcsolódóan. Az automatikus pozicionálás célja az ellipszis alakú gaussi teljesítménysűrűség-eloszlású 32 lézernyaláb megvilágító 32' foltjának olyan ideális beállítása, amelynél a 22 áramlási cellán át-
áramló mintaáram egyes 40 objektumainak megvilágítása a lehető legegyszerűsebb. Ezzel célunk egyrészt a megvilágítás egyenetlenségéből fakadó zaj csök-
15 kentése, másrészt pedig egy olyan eszköz biztosítása, amellyel a 10 citométer folyamatos működése közben egyszerűen ellenőrizhető a 32 lézernyaláb és az alkalmazott optikai elemek megfelelő volta.

A 32 lézernyaláb automatikus pozicionálása két lépésben történik: az alap-
20 és a finombeállítási szakaszokban. Az alapbeállítási szakaszban a 22a csatornában nem áramlik folyadék. A finombeállítási szakaszban a mintaárammal megegyező módon a 22a csatornán, annak középvonalában, folyadék áramlik keresztül, ahol a folyadékot azonos méretű kalibráló objektumokat (például mikrogolyókat) tartalmazó folyadék vagy teljes vérből származtatott minta képezi. A
25 szóban forgó kalibráló objektumokat adott esetben tartalmazhatja valamelyik, más célra nem használt reagens ág, illetve az a 22 áramlási cellába beadagolható kívülről.

Az automatikus pozicionálás végrehajtásához a 14 optikai egység optikai tengelyébe eső 24 optikaiszál-köteg speciális kialakítását használjuk fel. Nevezetesen, amint azt 5B és 5C ábrák mutatják, a 24 optikaiszál-köteg ellipszis alakú
30 központi elvezető 47 köteggel, vagy központi helyzetű 46 kitarólemezzel van kialakítva. A 9. ábrához kapcsolódóan egy olyan pozicionálási eljárást ismertetünk,

ahol a 24 optikaiszál-köteg ellipszis alakú központi elvezető 47 köteggel rendelkezik. Ilyen esetben a 32' folt helyes pozicionálásának elérésekor az 52 erősítőmodul 47 köteggel tartozó kimeneti csatornájában jelentkező, átlagos fényteljesítménnyel arányos villamos jel (speciálisan például a villamos U feszültség) értéke maximális lesz. Ez annak következménye, hogy ezen helyzetben a megvilágító lézerefény teljes egészében az ellipszis alakú központi elvezető 47 kötegre csatolódik be.

Az alapbeállítási szakaszban a 20 nyalábmozgató szerv a 32 lézernyalábbal, illetve annak 32' foltjával adott nagyságú lépésekben először függőleges irányban pásztáz végig a nyaláb teljes elmozdulási tartományában a 22 áramlási cellán. Amikor a 32' folt legalább egy része a 47 kötegre esik, a 47 köteggel tartozó kimeneti csatornában villamos jel (pl. feszültség) generálódik. A 32 lézernyalábbal való pásztázás mindaddig folytatódik, amíg a feszültség értéke növekszik. A feszültség (lokális) maximumának meghaladásakor a 20 nyalábmozgató szerv a 32 lézernyaláb függőleges irányú pásztázását az eddigi pásztázási iránnyal ellentétes irányban és kisebb lépésekben folytatja egészen addig, míg a feszültség egy újabb (lokális) maximumot el nem ér, illetve azt meg nem halad. Ekkor a pásztázás iránya ismételten megfordul és még kisebb lépésekben folytatódik tovább a feszültség következő (lokális) maximumának eléréséig. A 20 nyalábmozgató szerv ezen iteratív pásztázást a függőleges irányban addig folytatja, amíg két egymást követő feszültségmaximum különbsége egy előre megadott értéknél (jellemzően 0,5-1%-nál) kisebbé nem válik. Ennek elérésekor a 32 lézernyaláb függőleges irányú beállítását helyesnek tekintjük. Ezt követően a 32 lézernyaláb (32' folt) vízszintes irányú beállítására kerül sor egy, a függőleges beállításhoz hasonló iteratív folyamat útján. Az alapbeállítási szakasz természetesen a vízszintes irányú beállítással is kezdhető.

Amennyiben a helyes pozíció egyik irányban már ismert, a 32 lézernyaláb (32' folt) másik irányban történő alapbeállítása – az előző iteratív módszer helyett – a nyaláb vizsgált irányú teljes elmozdulási tartományára kiterjedő egyszeri, megfelelő kicsiny lépésekben végrehajtott végigpásztázásával és ezzel párhuzamosan az egyes lépésekben jelentkező feszültségértékek meghatározásával/feljegyzésével, majd az így nyert feljegyzett adatok alapján egyszerű maximumkereséssel



(globális maximum) is megvalósítható, amit például az 56 szabályozóegység hajthat végre.

Megjegyezzük, hogy a 32 lézernyaláb, és így a 32' folt, alapbeállítása központi 47 köteg helyett 46 kitakarólemezt alkalmazó elrendezésben hasonlóan zajlik, a különbség csupán annyi, hogy ilyen esetben például a feszültségmaximumok helyett a (lokális vagy globális) feszültségminimumokat kell figyelembe venni.

Az alapbeállítás végén a 32 lézernyaláb 32' foltja fedi a 22 áramlási cellát, de a helyzete nem feltétlenül optimális. A finombeállítási szakaszban a 32 lézernyaláb vízszintes helyzetét 5-10 μm pontossággal kell beállítani. A finombeállítási szakaszban a 32' folt vízszintesen végigpásztáz a 22 áramlási cella keresztmetszetén, a kalibráló 40 objektumon szóródó lézerfény az optikaiszál-kötegen keresztül a megfelelő detektor(ok)hoz jut, majd digitalizálását követően a jelfeldolgozó egység 10-500 ms hosszúságú időablakban meghatározza a keltett impulzusok csúcserékének időátlagát. Ezt követően a 20 nyalábmozgató szerv a 32 lézernyalábot (a 32' foltot) vízszintesen mindaddig mozgatja, amíg a keltett impulzusok csúcserékének rövid idejű átlaga el nem éri a maximumot. A pontos helyzet megkeresésére az előzőekben már ismertetett iteratív eljárást alkalmazzuk.

A 32 lézernyaláb automatizált pozícióra állása szükségtelemmé teszi a találmány szerinti citométer optikai egységének manuális beállítását és a felhasználtól nem igényel ezirányú szakértelmet. Másrészt az automatizált nyalábpozicionálás pontosabb beállítást tesz lehetővé, így csökken az egyenetlen megvilágítás miatt fellépő zaj és javul a jel/zaj viszony. Emellett az automatizált pozícióra állás felhasználható a lézernyaláb, illetve az alkalmazott optikai elemek megfelelő állapotban létének az ellenőrzésére is. Egyetlen, a teljes nyalábmozgató tartományon vízszintes irányban végrehajtott pásztázással felmérhető a teljes nyalábkeresztmetszet: amennyiben a lézernyaláb terjedési irányra merőleges keresztmetszete legfeljebb 30-60 μm kiterjedésű középső területének teljesítménysűrűség-eloszlása nem megfelelően egyenetlen (azaz a maximumtól való eltérés például az optikai elemek elszennyeződése következtében 1%-nál nagyobb), a találmány szerinti citométer optikai egysége karbantartást igényel, amire a felhasználó megfelelő értelmű figyelmeztetést kap.

Összefoglalva tehát: a jelen találmány szerinti és az előzőekben csupán néhány előnyös példakénti kiviteli alakjához kapcsolódóan a működése megértéséhez elégséges mértékben bemutatott optikai elvű áramlási citométer esetében

5 – a vizsgálat tárgyát képező mintáról, speciálisan humán vagy állati teljes vér képezte minta alakos elemeiről szóródó fény összegyűjtése és detektor(ok)hoz továbbítása speciális kiképzésű csatolóelemmel, előnyösen elemi optikai szálakból ragasztott vagy szinterelt és fénybecsatolásra szolgáló végén kívánt geometriával (célszerűen csiszolás útján) kialakított optikaiszál-köteggel történik;

– a vizsgálat tárgyát képező minta, speciálisan humán vagy állati teljes vér képezte minta és a vizsgálat elvégzéséhez szükséges reagensek adagolása, elegyítése

10 és temperált reakciója speciális mintaelőkészítő egységgel kerül megvalósításra, amely mintaelőkészítő egység az inkubációs idővel arányos térfogatú mikroreaktor, a kívánt reakció hőmérsékletét beállító hőmérsékletstabilizáló szervert, továbbá nyomáskülönbség vagy reagenspumpa által mozgatott folyadék-

15 áramban – a mikroreaktor megbontása nélkül – egymás után lamináris és turbulens szakaszokat biztosító keverőegységet foglal magában;

– a mérés és az előtolás során az előkészített minta, speciálisan a humán vagy állati teljes vér képezte minta mozgatása speciális hidro-pneumatikai elrendezésben történik, amelynek lényege, hogy a vérminta a mintaág és a kőpenyőfolyadék ág

20 áramlási ellenállásának aránya által meghatározott mintaáram-keresztmetszettel halad előre az áramlási cellában a folyadékáramlási pálya kezdőpontja és végpontja között fennálló nyomáskülönbség hatására;

– a mérés során az előkészített mintát, speciálisan a humán vagy állati teljes vér képezte mintát megvilágító lézertény mintára pozicionálása automatizált formában

25 történik, ahol a megvilágító lézernyaláb kalibráló mintaáram segítségével függőleges és vízszintes irányban oly módon kerül beállításra, hogy egyrészt a mintaáramban lévő alakos elemek lehető legegyszerűsebb megvilágítását szolgáltatassa, másrészt pedig a detektor(oka)t közvetlenül elérő része a lehető legkisebb legyen; továbbá

30 – a minta megvilágítására szolgáló lézertény detektorba jutó részének mérséklését speciálisan kialakított áramlási cella valósítja meg.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Optikai elvű áramlási citométer folyadékfázisú minta sejtes elemeinek *in vitro* vizsgálatára, amely tartalmaz

– kezdőponttól végpontig terjedő áramlási pályát, melyet a kezdőponttól a végpont felé mutató áramlási irány jellemez, ahol

– a kezdőpontot segédfolyadék tárolására szolgáló első tárolóeszköz képezi, amelyben első nyomás uralkodik, a végpontot második tárolóeszköz képezi, amelyben az első nyomástól alacsonyabb második nyomás uralkodik;

– az áramlási pályát a segédfolyadék továbbítására alkalmasan kialakított első és második áramlási ág alkotja, az áramlási pályába az áramlási ágakat egyetlen közös szakasszá egyesítő és hidrodinamikai fókuszálásra alkalmas kiképzésű közösítőtag (66) van beiktatva, ahol a közös szakasz adott keresztmetszeti területtel rendelkezik és bármely keresztmetszeti területén egyidejűleg a minta egyetlen sejtes elemének áthaladását biztosítón van kialakítva;

– a kezdőpont és a közösítőtag (66) között az első áramlási ágban egymással az áramlási irányban folyadékszállító módon csatlakoztatott reaktorok vannak elrendezve, a reaktorok a sejtes elemeket tartalmazó mintának és folyadékfázisú reagenseknek a tekintett áramlási ágba táplálására szolgáló különálló reagens ágaknak (68-k) képezik részét, továbbá a betáplált minta és a betáplált reagensek reakciójának/reakcióinak vezérelt lejátszódására és az így nyert előkészített minta áramlásirányú továbbítására alkalmas kialakítással rendelkeznek; továbbá

– az áramlási pálya közös szakaszának kijelölt tartományát alakformázott koherens fénynyalábbal a közös szakasz terjedési irányára lényegében merőleges irányból megvilágító eszközt;

– a közös szakasz megvilágított tartományából első térbeli mintázatban kilépő fénynyalábokat felfogó és azokat az első térbeli mintázattal megegyező térbeli mintázat szerint legalább egy optikai detektor (A_1, \dots, A_p) érzékelőfelületéhez továbbító optikai csatolóeszközt, ahol

- a megvilágító eszköz és az optikai csatolóeszköz közös optikai tengelybe esnek;
- a legalább egy optikai detektor (A_1, \dots, A_p) az érzékelőfelületére beeső nyalábok térbeli mintázatával összhangban legalább egy, az egyes beeső nyalábok detektált intenzitásaival arányos villamos jel létrehozására alkalmasan van kiképezve;
- a legalább egy optikai detektorral (A_1, \dots, A_p) villamosan csatlakoztatott és az azáltal előállított legalább egy villamos jel feldolgozására szolgáló jelkimenettel bíró jelfeldolgozó egységet (54); valamint
- 10 – a jelfeldolgozó egység (54) kimenetével villamosan csatlakoztatott, a feldolgozott villamos jelek legalább egy része alapján a minta sejtes elemeinek tulajdonságait meghatározó és/vagy a feldolgozott villamos jelek legalább egy részét a megvilágító eszköz által kibocsátott nyalábnak a közös szakasz kijelölt tartományára való pozicionálásához vezérlőparaméterként felhasználó vezérlő és kiértékelő egységet (16), **azzal jellemezve**, hogy
 - a kezdőpontból kiinduló első és második áramlási ágak rendre első és második áramlási ellenállásokkal rendelkeznek,
 - a citométer üzemi állapotában a közös szakasz keresztmetszeti területe az áramlási pálya kezdőpontja és végpontja között fennálló nyomáskülönbség hatására az áramlási irányban a közös szakaszban laminárisan áramló, a
 - 20 közösítőtag (66) által egyesített áramlási ágakon át a közös szakaszba belépő segédfolyadékból és előkészített mintából a közösítőtag (66) hidrodinamikai fókuszálásával nyert rétegzett kompozitáram alkotóáramainak keresztmetszeti területei között az első áramlási ág képviselte első áramlási ellenállás és a második áramlási ág képezte második áramlási ellenállás arányában oszlik meg.

2. Az 1. igénypont szerinti áramlási citométer, **azzal jellemezve**, hogy az optikai csatolóeszközt egymással párhuzamos geometriai tengelyű elemi optikai szálakból (44) összeállított optikaiszáj-köteg (24) képezi, amely a közös szakasz irányába néző és az első térbeli mintázatban terjedő nyalábokat az optikai szálakba (44) becsatoló felülettel kialakított elülső véggel (42), valamint a legalább egy

30 optikai detektor (A_1, \dots, A_p) érzékelőfelületére néző és az optikai szálakba (44) becsatolt nyalábokat az optikai szálakból (44) a térbeli mintázat kijelölt tartományai-

nak megfelelően csoportosítva kicsatoló felületekkel kialakított kicsatoló kötegekkel (24-1, ..., 24-p) rendelkezik, ahol az egyes kötegeket (24-1, ..., 24-p) az optikai szálak (44) különálló csoportjai képezik.

3. A 2. igénypont szerinti áramlási citométer, *azzal jellemezve*, hogy a közös vég (42) becsatoló felülete

(i) egy, az optikai tengelyre merőleges sík felület,

(ii) egy, a közös szakasz középvonala és az optikaiszál-köteg (24) optikai tengelyen mért távolsága mintegy felével megegyező sugarú gömbi felület, és

(iii) egy aszférikus felület

egyikének formájában van kiképezve.

4. A 2. vagy a 3. igénypont szerinti áramlási citométer, *azzal jellemezve*, hogy a legalább egy detektor (A_1, \dots, A_p) érzékelőfelületét egynél több érzékelőfelület-darab alkotja és az érzékelőfelület-darabok mindegyike az optikaiszál-köteg (24) egy-egy kötegével (24-1, ..., 24-p) van optikai csatolásban, továbbá valamennyi érzékelőfelület-darab/köteg pár esetében a tekintett érzékelőfelület-darab kiterjedését meghaladó keresztmetszeti területtel rendelkező köteg gömbi vagy aszférikus kicsatoló felülettel van kialakítva, míg az adott érzékelőfelület-darab kiterjedésével legfeljebb azonos nagyságú keresztmetszeti területtel rendelkező köteg az adott köteget alkotó optikai szálak (44) geometriai tengelyeire merőleges sík kicsatoló felülettel van kialakítva.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti áramlási citométer, *azzal jellemezve*, hogy a térbeli mintázat kijelölt tartományait a közös szakasz megvilágított tartományát az optikai tengellyel párhuzamosan elhagyó nyalábok első tértartománya, továbbá az optikai tengellyel mintegy $1,5^\circ$ -os szöget bezáró kúpszögtartomány és az optikai tengellyel mintegy $3,0^\circ$ -os szöget bezáró kúpszögtartomány közötti második tértartomány, valamint az optikai tengellyel mintegy $4,0^\circ$ -os szöget bezáró kúpszögtartomány és az optikai tengellyel mintegy $8,0^\circ$ -os szöget bezáró kúpszögtartomány közötti harmadik tértartomány képezi.

6. Az 5. igénypont szerinti áramlási citométer, *azzal jellemezve*, hogy az optikaiszál-köteg (24) elülső végén (42) az első tértartományból érkező nyaláb szabad továbbhaladását megakadályozó elem van elrendezve.

5 7. A 6. igénypont szerinti áramlási citométer, *azzal jellemezve*, hogy a tekintett elemet egy, az elülső végén (42) az optikaiszál-köteg (24) teljes szélességében és az első tértartomány magasságában terjedő, az optikai tengelyre szimmetrikusan elrendezett, a ráeső nyalábokat át nem eresztő kitakarólemez (46) képezi.

10 8. A 6. igénypont szerinti áramlási citométer, *azzal jellemezve*, hogy a tekintett elemet az optikaiszál-köteg (24) optikai tengelyre szimmetrikus ellipszis alakú központi elvezető kötege (47) képezi.

15 9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti áramlási citométer, *azzal jellemezve*, hogy a közös szakasz legalább részben egy, az áramlási pályát képező áramlási csatornát (22a, 22a', 22a'', 22a''') tartalmazó és az áramlási irányban egy, az áramlási pálya megvilágított tartományon túli pontjáig terjedő áramlási cellaként (22, 22', 22'', 22''') van kialakítva.

20 10. A 9. igénypont szerinti áramlási citométer, *azzal jellemezve*, hogy az áramlási cella (22', 22'', 22''') azon tartományai, melyek az áramlási cella (22', 22'', 22''') optikai tengelyre lényegében merőleges síkmetszeteiben az áramlási csatorna (22a', 22a'', 22a''') tekintett síkmetszeteekre vonatkoztatott merőleges vetülete által kijelölt tartományon kívül helyezkednek el, a megvilágító nyaláb áramlási cellán (22', 22'', 22''') való teljes áthaladását gátlón vannak kiképezve.

25 11. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti áramlási citométer, *azzal jellemezve*, hogy a megvilágító eszköz és a közös szakasz között a nyaláb útjában nyalábmozgató szerv (20) van elrendezve, amely a vezérlőegységgel van villamosan csatlakoztatva és a megvilágító nyalábot a közös szakaszon a kijelölt megvilágítási tartományra pozicionálón van kialakítva.

12. A 11. igénypont szerinti áramlási citométer, *azzal jellemezve*, hogy a nyalábmozgató szervet (20) ellenpárhuzamos állású kisszőgű prizmak (34a, 34b)

alkotják, melyek az optikai tengely körül együttesen és/vagy egymáshoz képest elforgathatók.

13. A 11. igénypont szerinti áramlási citométer, *azzal jellemezve*, hogy a nyalábmozgató szervet (20) a megvilágító eszköz tartóeleme képezi, amely a nyaláb haladási irányában az optikai tengelyre lényegében merőleges tengely körül meghatározott maximális szögben dönthetően van kialakítva.

14. Az 1-13. igénypontok bármelyike szerinti áramlási citométer, *azzal jellemezve*, hogy a reaktorok rugalmas falú mikroreaktorok (83, 83'), falaik legalább egy része a falakat teljes egészében befoglaló keverőegység (80) belső terében, a belső tér felületét alakhűen követő módon van elrendezve, továbbá a keverőegység (80) belső terét egymás után helyezett egymással közlekedő és egymáshoz képest eltérő átömlési keresztmetszetű szakaszok alkotják.

15. A 14. igénypont szerinti áramlási citométer, *azzal jellemezve*, hogy a keverőegység (80) moduláris felépítésű, ahol az egyes modulokat az eltérő átömlési keresztmetszetű szakaszokat biztosító belső kialakítással rendelkező, különálló szorítóelemek (82, 82') képezik.

16. Az 1-15. igénypontok bármelyike szerinti áramlási citométer, *azzal jellemezve*, hogy a megvilágító eszközt monokromatikus lézertény kibocsátására alkalmas lézerforrás (26) képezi.

17. Az 1-16. igénypontok bármelyike szerinti áramlási citométer, *azzal jellemezve*, hogy a sejtes elemeket humán vagy állati teljes vér alakos elemei képezik.

18. Eljárás folyadékfázisú minta sejtes elemeinek optikai elven történő *in vitro* vizsgálatára, amelynek keretében
-- kezdőpont és végpont között terjedő, közös szakasszal rendelkező első és második áramlási ágak alkotta áramlási útba a kezdőpontban segédfolyadékot táplálunk, miközben a kezdőpontban első nyomást, a végpontban pedig második, az első nyomás értékénél alacsonyabb második nyomást tartunk fenn;

- az első áramlási ágba, annak különböző pontjaiban, külön-külön a vizsgálat tárgyát képező mintát és reagenseket táplálunk be, miközben a tekintett áramlási ágba a segédfolyadék betáplálását szüneteltetjük;
- a betáplált mintát és reagenseket az első áramlási ágban a közös szakasz felé áramoltatva azokat egymással elegyítjük és reagáltatjuk, miáltal homogén mintaoldatot hozunk létre;
- a mintaoldatot a közös szakaszba való belépését megelőzően a második áramlási ágból származó segédfolyadék áramával kiváltott hidrodinamikai fókuszálásnak vetjük alá, aminek eredményeként egy, a sejtes elemeket egymás után egyesével szállító mintaoldat képezte első keresztmetszeti területű belső folyadékáramból, valamint egy, a belső folyadékáramot a segédfolyadék által köpenyként körülvevő második keresztmetszeti területű külső folyadékáramból álló, laminárisan áramló kompozitáramot alakítunk ki, ahol az első és a második keresztmetszeti területek arányát az első és második áramlási ágak képviselte áramlási ellenállások arányával állítjuk be;
- a kompozitáramot, annak lamináris áramlását fenntartva, a közös szakaszba tápláljuk és azon átvezetjük, miközben áramlási irányára lényegében merőleges irányból megvilágítjuk annak egyidejűleg egy-egy sejtes elemet tartalmazó részét;
- az egyes részekben lévő sejtes elemek szóródott nyalábokat szórásí mintázatukat megtartva egymás után legalább egy optikai detektorhoz (A_1, \dots, A_p) vezetjük, és a legalább egy optikai detektorral (A_1, \dots, A_p) az egymás utáni részek esetében beeső nyalábok detektált intenzitásaival arányos legalább egy-egy villamos jelet állítunk elő;
- az így nyert villamos jel(ek) feldolgozásával azok legalább egy része alapján a minta sejtes elemeire vonatkozó tulajdonságokat határozzuk meg.

19. A 18. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a szóródott nyalábokat optikai csatolóeszköz útján vezetjük a legalább egy optikai detektorhoz (A_1, \dots, A_p).

20. A 18. vagy a 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az áramlási ágakba táplált segédanyagot, mintát és reagenseket a kezdőpont és a végpont között fennálló nyomáskülönbséggel tartjuk áramlásban.

21. A 18. vagy a 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a mintát és a reagenseket az első áramlási ágba az áramlási ág betáplálási pontjaiba becsatlakozó reagenspumpákkal (69-1, ..., 69-n) tápláljuk be és tartjuk az áramlási ágban áramlásban.

22. A 18-21. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kompozitáramot a kezdőpont és a végpont között fennálló nyomáskülönbséggel hozzuk létre, majd ezt követően az említett nyomáskülönbséggel tartjuk áramlásban.

23. A 18-22. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a betáplált minta és a reagensek elegyítését, valamint egymással történő reagáltatását két-két betáplálási pont közé beiktatott egy-egy hőmérsékletszabályozott reaktorban hajtjuk végre, ahol az egyes reaktorok hosszát a minta és az egyes reagensek közötti kívánt mértékű reakció lejátszódását biztosítón választjuk meg.

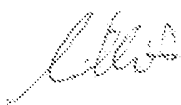
24. A 18-23. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kompozitáram megvilágítására használt fénynyalábot nyalábformázásnak, valamint alapbeállítási szakaszból és ezt követő finombeállítási szakaszból álló pozicionálásnak vetjük alá, amivel az egyes sejtes elemek lehető legegyszerűsebb megvilágítását biztosítjuk, ahol a szóban forgó pozicionálást a feldolgozott villamos jelek legalább egy részét vezérlőparaméterként felhasználva iteratív módon, adott küszöbfeltétel eléréséig ismétlődően hajtjuk végre.

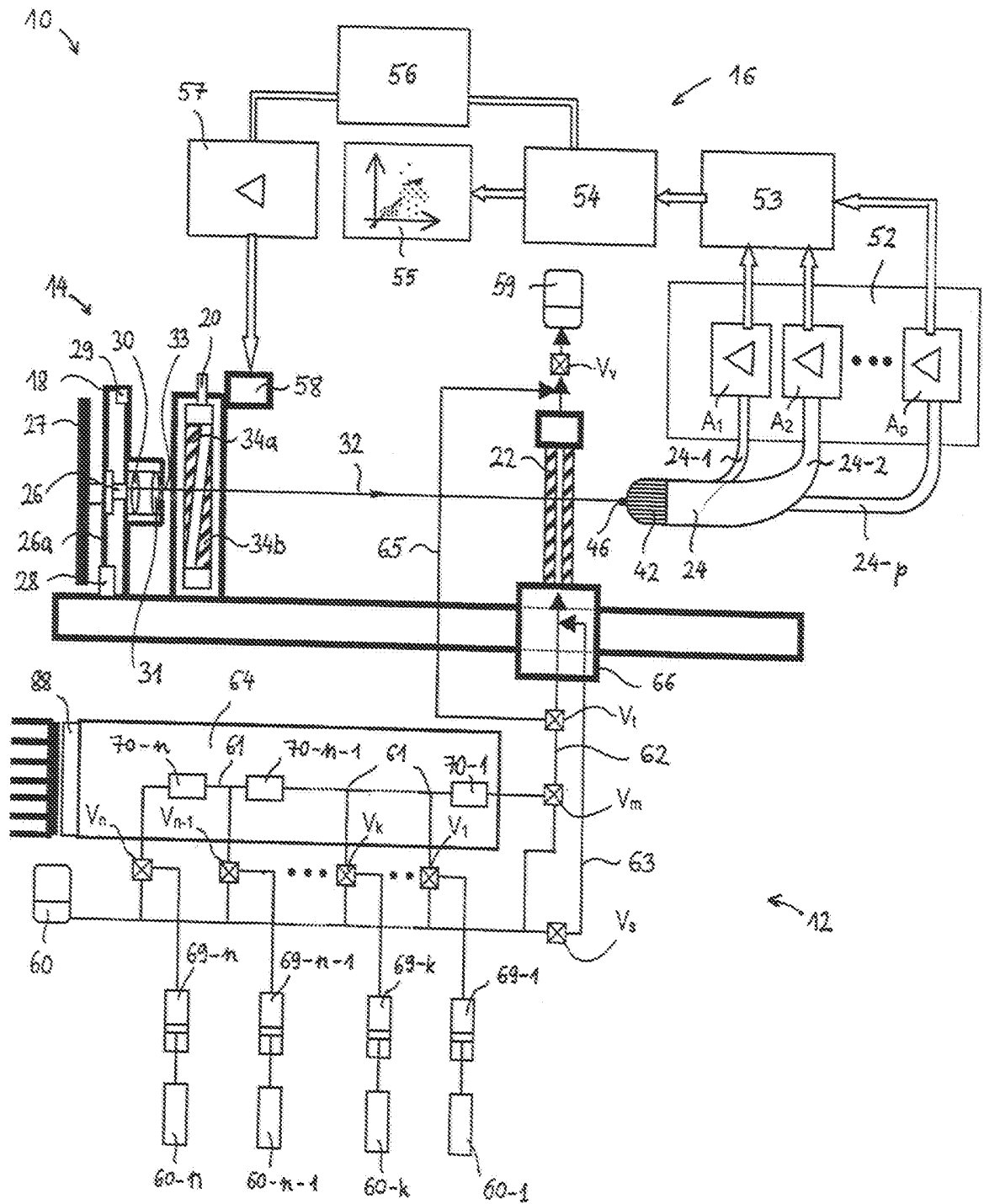
25. A 24. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a nyalábformázott és pozicionált nyalábként egy, a közös szakaszban átáramló kompozitáramot Gauss-eloszlást követő teljesítménysűrűséggel jellemzett ellipszis alakú folt (32') megvilágító lézernyalábot (32) használunk.

26. A 25. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az alapbeállítási szakaszban vezérlőparaméterként a megvilágító lézernyalábnak (32) a detektort (A_1, \dots, A_p) szóródásmentesen elérő része által keltett villamos jelet használjuk.

5 27. A 25. vagy a 26. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a finombeállítási szakaszban kompozitáramként a vizsgálni szándékozott sejtes elemekhez hasonló fizikai tulajdonságú kalibráló objektumokat (40) tartalmazó kompozitáramot vezetünk át a közös szakaszon és vezérlőparaméterként a megvilágító lézernyalábnak (32) az ezen objektumokon (40) szóródó és detektort (A_1, \dots, A_p) elérő része(i) által keltett villamos jele(ke)t használjuk.

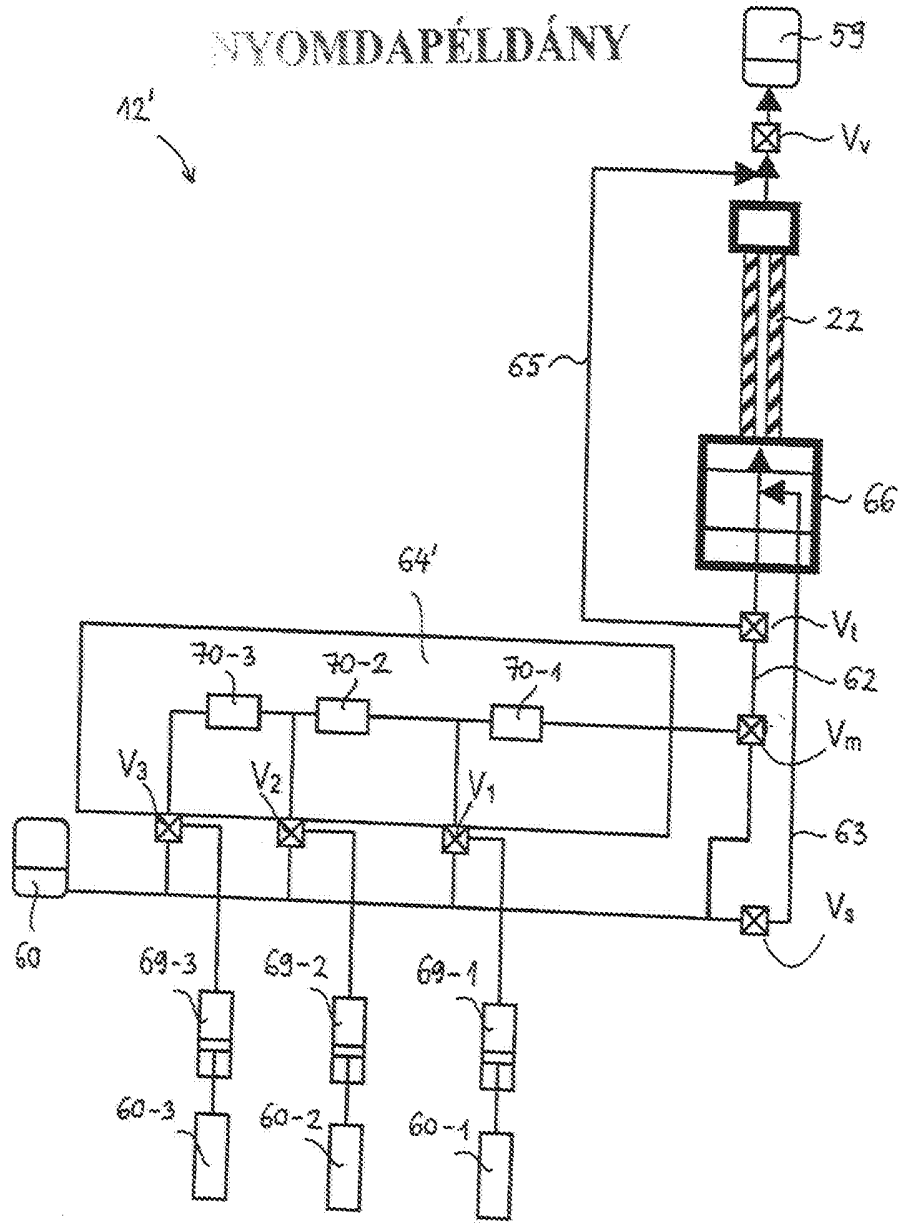
10 28. A 27. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kalibráló objektumként (40) a humán vagy állati teljes vér alakos elemeit vagy ezekkel azonos méretű mikrogolyókat használunk.


2002.02.28.



1. ábra

NYOMDAPÉLDÁNY



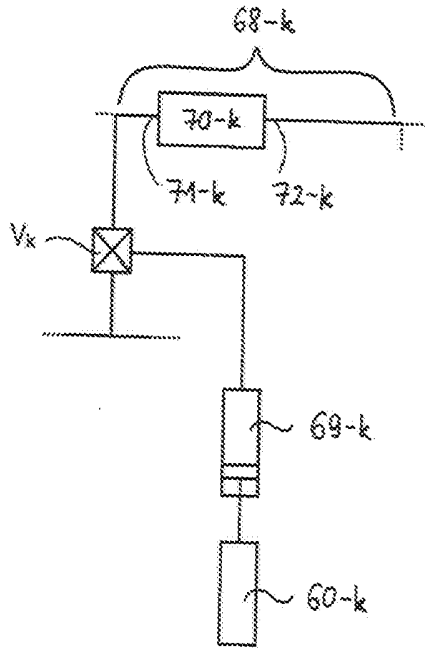
2. ábra

22286/08

MEGADÁS ALAPJÁUL
SZOLGÁLÓ VÁLTOZAT
~~MÁSOLATA~~

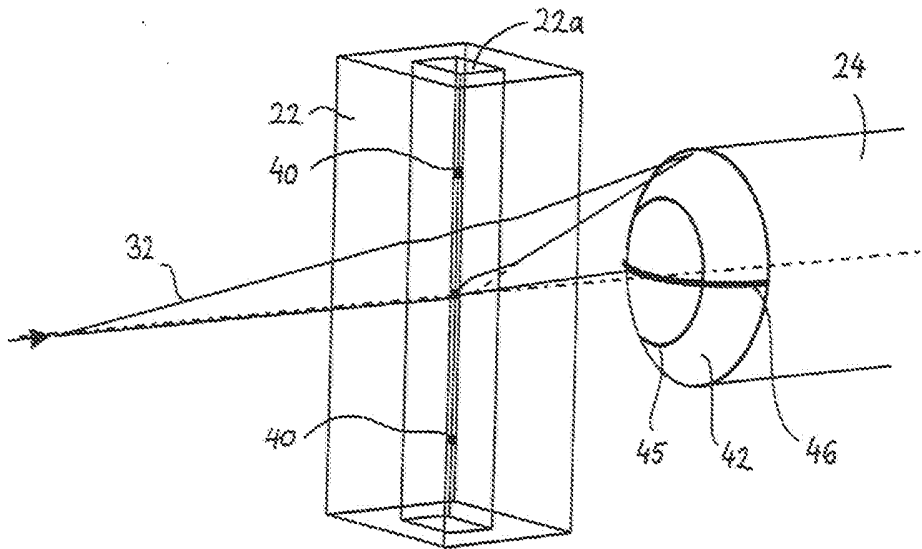
P0800614

3/8

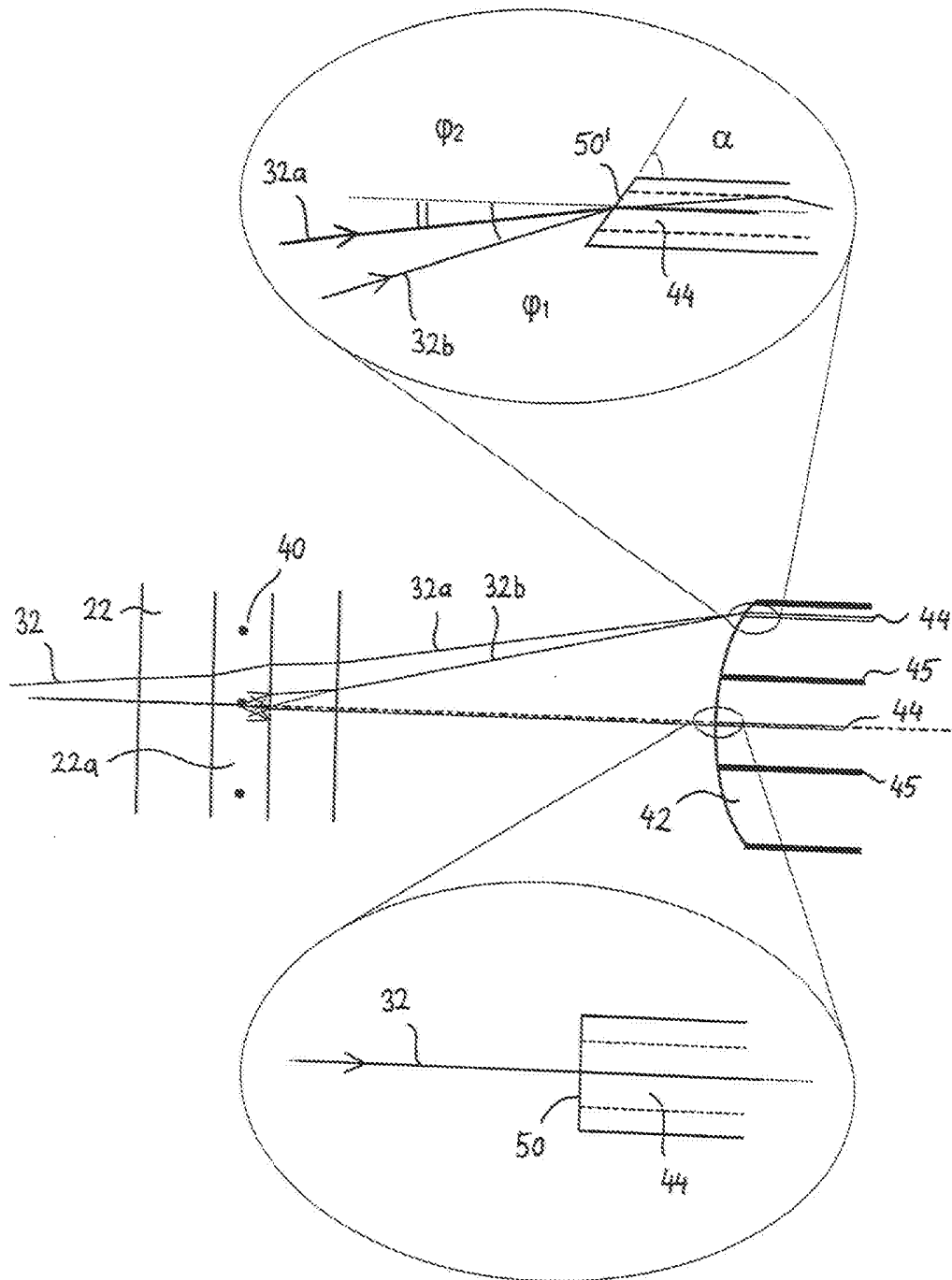


NYOMDAPÉLDÁN

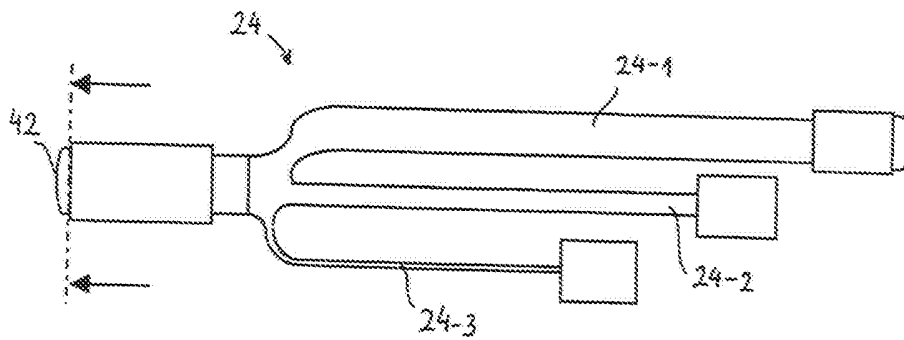
3. ábra



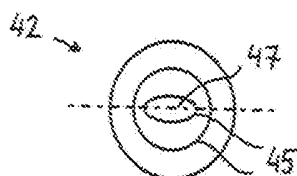
4A ábra



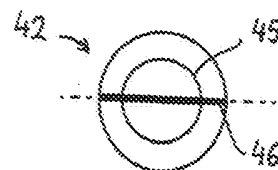
4B ábra



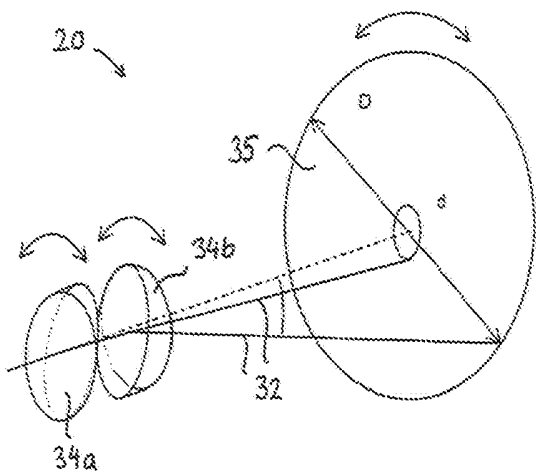
5A ábra



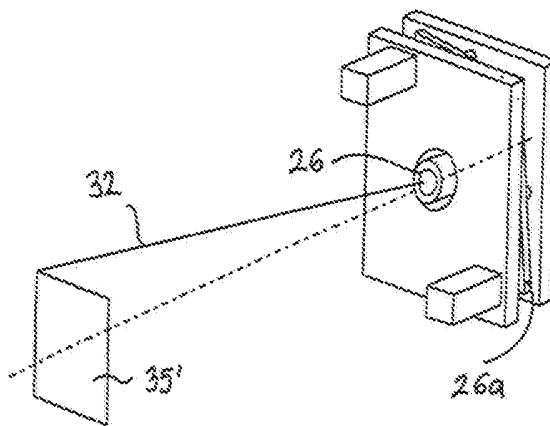
5B ábra



5C ábra

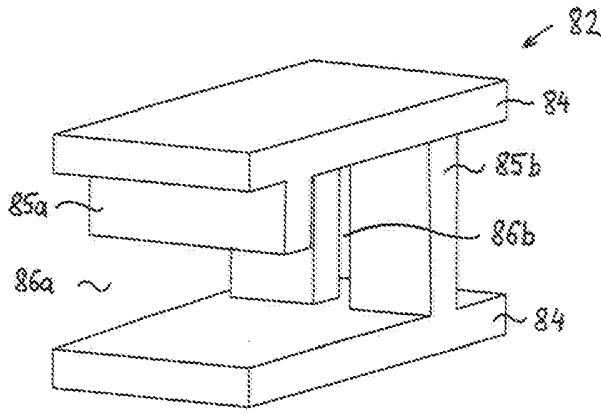


6A ábra

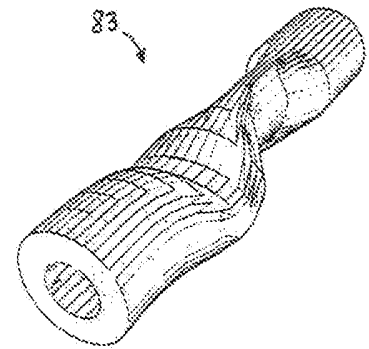


6B ábra

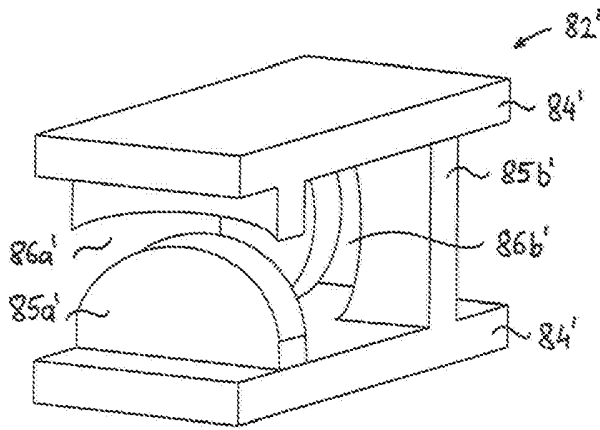
22286/08



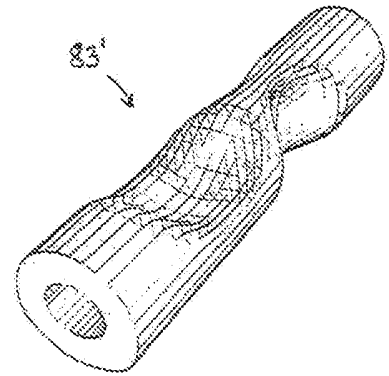
7A ábra



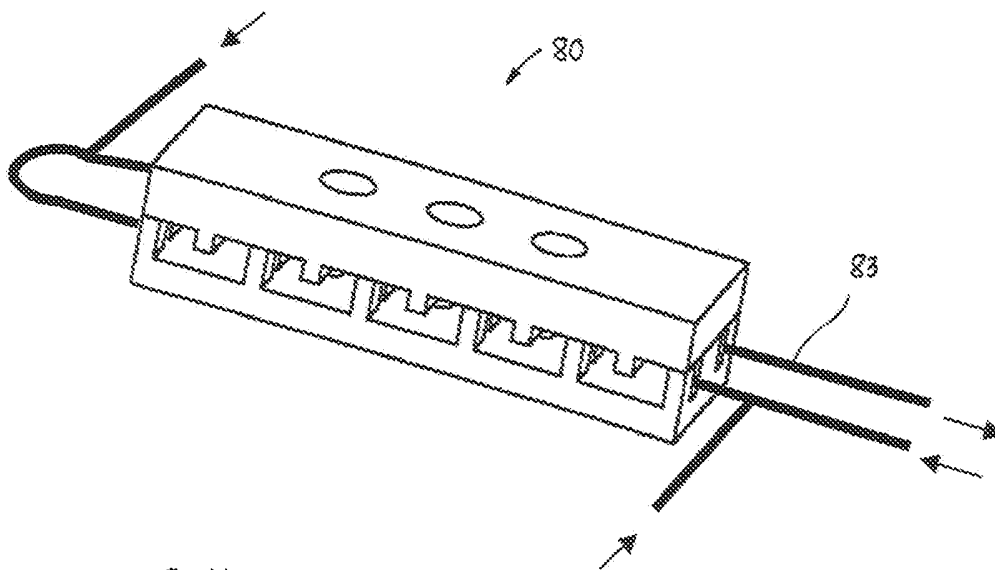
7B ábra



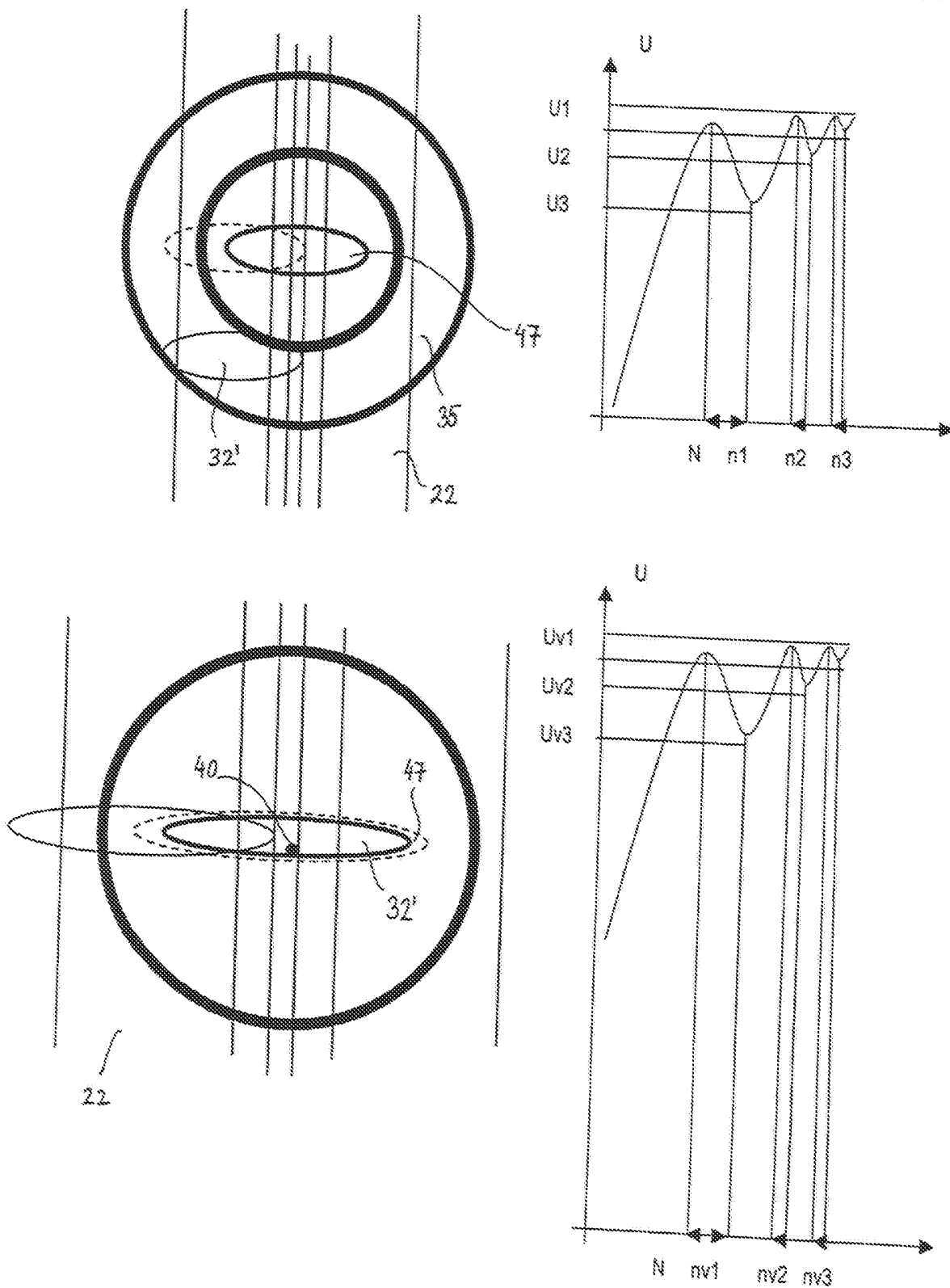
7C ábra



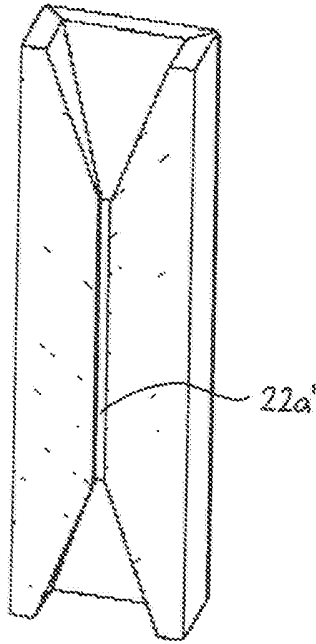
7D ábra



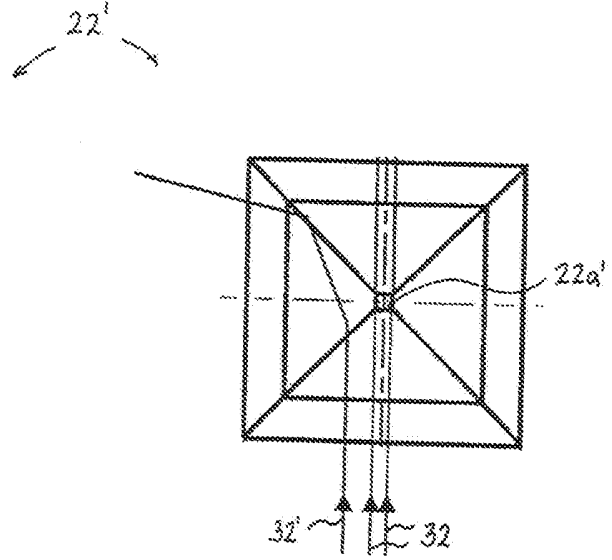
8. ábra



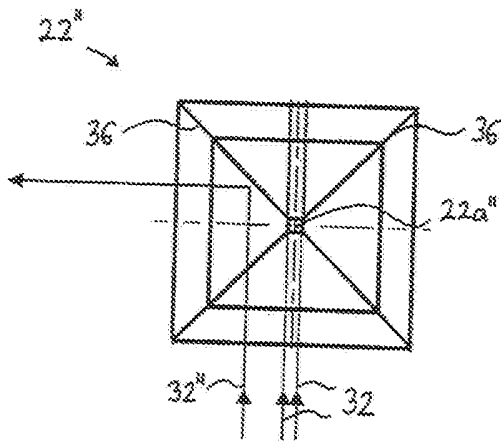
9. ábra



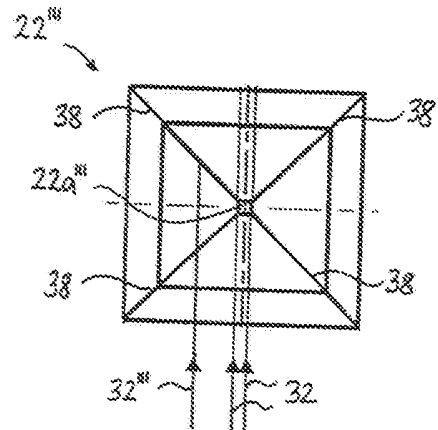
10A ábra



10B ábra



11A ábra



11B ábra