

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 494 016**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/64** (2006.01)

**G01N 15/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2004 E 04715875 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 1756547**

54 Título: **Dispositivo para la medición de la luz, que procede desde partículas o desde células biológicas de tamaño microscópico**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.09.2014**

73 Titular/es:

**PARTEC GMBH (100.0%)  
Am Flugplatz 13  
02828 Görlitz, DE**

72 Inventor/es:

**GÖHDE, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 494 016 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Dispositivo para la medición de la luz, que procede desde partículas o desde células biológicas de tamaño microscópico.

5 Se conocen procedimientos para la caracterización de partículas o células biológicas de tamaño microscópico, en los que estas partículas se ponen en suspensión a través de un rayo de luz intenso, por ejemplo un láser. La luz dispersada por las partículas es capturada bajo ángulos diferentes y es detectada por foto detectores sensibles y es medida. Para la diferenciación de diferentes tipos de células, se marcan las células con la ayuda de colorantes fluorescentes especiales. Las diferentes células pueden ser coloreadas con marcadores diferentes. Si estas células pasan el rayo de luz para la excitación de la fluorescencia, emiten luz de fluorescencia, que es detectada y  
10 cuantificada de la misma manera con la ayuda de foto detectores. De esta manera, se pueden distinguir, por ejemplo, en un único proceso de medición diferentes células sanguíneas o glóbulos blancos entre sí, y se pueden contar.

15 Este procedimiento conocido bajo el concepto "Citofotometría de Flujo" o "Flow Cytometry" ha encontrado una gran difusión en el diagnóstico médico. Sirve, por ejemplo, para el reconocimiento automático de células cancerosas, para la cuantificación de subpoblaciones de leucocitos y para la evaluación del estado inmune de pacientes de HIV-SIDA a través de la detección y recuento de los leucocitos responsables de la defensa inmune. Además, estos procedimientos sirven como métodos analíticos con la utilización de partículas de plástico de tamaño microscópico, en las que se ligan las sustancias bioquímicas a medir como ácidos nucleicos y proteínas junto con colorantes de fluorescencia. A continuación se menciona de forma simplificada y como representación de otras posibilidades de  
20 aplicación, la utilización en el marco de la citofotometría de flujo.

25 El planteamiento del cometido técnico de la medición consiste en detectar efectivamente las cantidades muy pequeñas de luz, que proceden desde células o partículas tan pequeñas. Para poder dimensionar el mayor número posible de células o partículas dentro de una corta duración de tiempo, éstas se mueven muy rápidamente a través del rayo de luz. Los citómetros de flujo modernos detectan más de 10.000 partículas individuales por segundo en periodos de residencia en el rayo de luz inferiores a 10 µseg. Desde el punto de vista de la técnica de medición, esto significa que los tiempos de integración para la medición de la luz son muy cortos.

30 A pesar de todo, para poder alcanzar una sensibilidad suficiente de la medición, la luz emitida desde las partículas es detectada por objetivos microscópicos, que tienen una abertura numérica alta, para que sea detectada una porción grande de la luz. Por lo tanto, se utilizan elementos ópticos entre una cubeta de difusión y un foto detector, que deben alimentar al foto detector una porción lo más grande posible de la luz emitida por las células. Todos los citofotómetros de flujo conocidos en la práctica utilizan objetivos del mismo tipo con abertura numérica alta para la detección de un ángulo espacial lo más grande posible y, por lo tanto, de una porción lo más grande posible de la luz fluorescente emitida desde las células, puesto que la luz no es reflejada por las partículas en una dirección determinada, sino que es emitida esféricamente. A través de elementos ópticos conectados a continuación, sistemas  
35 de lentes y reproducciones intermedias, la luz fluorescente llega al o a varios foto receptores.

Se conoce a partir del documento US 5 822 062 un dispositivo de este tipo, que trabaja con lentes ópticas.

40 Una característica de estas disposiciones ópticas conocidas es que los sistemas ópticos utilizados, debido a la nitidez reducida de fondo unida con la abertura numérica alta, requieren una reproducción óptica muy precisa del lugar de medición o bien de la célula a medir. Esto conduce a altos requerimientos en la precisión de los componentes, en la estabilidad mecánica de toda la disposición de medición y, por lo tanto, a un gasto de ajuste considerable. La sensibilidad correspondientemente grande de estos sistemas de medición no permite, por ejemplo, el empleo móvil, por ejemplo en laboratorios móviles para el control microbiológico de aguas residuales o para la determinación concomitante con la terapia del estado inmune de pacientes HIV-SIDA en regiones sin el abastecimiento médico básico respectivo o bien sin infraestructura de laboratorio.

45 Se conoce a partir del documento DE 197 52 033 A1 un dispositivo para la detección de partículas con estructuras ópticas no reproducibles, en el que a través del contorno o bien la sección transversal de la estructura conductora de luz, existe la posibilidad de concentrar la luz y modificar la distribución de la intensidad sobre la sección transversal.

50 La invención tiene el cometido de mejorar un dispositivo del tipo indicado al principio, con el propósito de que esté configurado robusto manteniendo la sensibilidad de medición y la exactitud de medición y se pueda emplear en laboratorios móviles, y de que se puedan reducir o bien ahorrar totalmente el gasto de mantenimiento, la medida en intervenciones de ajuste y la sensibilidad a averías.

Este cometido se soluciona por medio de un dispositivo con las características de la reivindicación 1.

55 Con otras palabras, la invención propone configurar el elemento óptico como cilindro con una superficie de reflexión cilíndrica. En lugar de una estructura complicada, que comprende varias lentes ópticas, se utiliza un elemento óptico robusto, de una sola pieza, que no necesita ningún ajuste o mantenimiento. Como cilindro en el sentido de la

5 presente propuesta se designan aquí, como se explica en detalle a continuación, tanto cuerpos macizos como también cuerpos huecos. La forma de la sección transversal de un cilindro de este tipo es con preferencia redonda circular, por ejemplo en virtud de ventajas de fabricación; las ventajas de acuerdo con la propuesta se obtienen, sin embargo, también por ejemplo en el caso de secciones transversales de forma ovoide o poligonal, configuradas de forma diferente de un círculo. Las superficies de reflexión cilíndricas proporcionan un túnel para la luz, a través del cual llega prácticamente sin pérdida desde la cubeta de paso hacia el foto detector.

Aparte de una robustez mejorada se posibilitan otras ventajas a través de la configuración propuesta del dispositivo.

Sensibilidad mejorada del dispositivo:

10 La disposición propuesta permite la medición de cantidades mínimas de luz, que proceden desde partículas o células de tamaño microscópico. Frente al estado de la técnica, esta disposición no requiere lentes o sistemas de lentes complicados. De esta manera se suprimen los inconvenientes de las lentes necesarias en otro caso con abertura numérica alta y el gasto de ajuste alto implicado con ello. La disposición propuesta requiere claramente menos superficies límites ópticas. Esto conduce a pérdidas de luz más reducidas y, por lo tanto, a una mayor sensibilidad de medición.

15 Con un diámetro correspondientemente grande del cilindro receptor de la luz se puede asegurar que la porción de la luz detectable, en general, de acuerdo con la técnica de medición llega lo más completamente posible al cilindro receptor de la luz, es decir, al espacio rodeado por la superficie de reflexión cilíndrica. Esto es coherente con que el ángulo espacial de la luz fluorescente a detectar se determina esencialmente por el ángulo de reflexión total en las superficies límites del líquido y la pared de vidrio en el canal de la cubeta y la ventana de la cubeta. De la luz fluorescente emitida esféricamente solamente la porción emitida dentro de este ángulo espacial puede llegar desde la cubeta de paso hacia el foto detector. De acuerdo con la invención, el diámetro de la superficie de reflexión cilíndrica es aproximadamente 50 veces o todavía mayor que la distancia mínima entre las partículas emisoras de luz y el orificio de entrada de la luz del cilindro.

20 Otra ventaja de la disposición propuesta en comparación con el estado de la técnica consiste en que se detecta un ángulo espacial mayor y, por lo tanto, una porción mayor de la luz fluorescente emitida que el que es posible con óptica de lentes convencional. Si el cilindro no está configurado, por ejemplo, como cilindro hueco, sino macizo y está constituido de vidrio, entonces está conectado con preferencia por medio de una masilla óptica con la cubeta de paso o bien con su ventana. De esta manera se incrementa el ángulo espacial de la luz detectada de nuevo en una medida considerable. La razón de ello son pérdidas más reducidas a través de reflexión en superficies límites, como son inevitables en ópticas de lentes convencionales.

Montaje y puesta en servicio más sencillos del dispositivo:

En comparación con un sistema óptico de lentes se reduce en primer lugar el número de los componentes necesarios, de manera que en primer lugar se simplifica, en principio, la fabricación del dispositivo.

35 En segundo lugar, con un diámetro todavía más incrementado de la superficie de reflexión cilíndrica que el indicado anteriormente, la porción de luz, que corresponde al ángulo espacial máximo posible, llega entonces también lo más completamente posible al cilindro receptor de luz, cuando la partícula a medir no se encuentra óptimamente cerca del orificio de entrada de la luz del cilindro, de manera que la distancia desde el cilindro receptor de la luz no es crítica, de manera similar a una zona de nitidez incrementada del fondo de un sistema óptico de lentes. La superficie de reflexión cilíndrica del cilindro tiene, por lo tanto, de manera ventajosa un diámetro comparativamente grande. De esta manera, la posición de la partícula a medir en ángulo recto con respecto a la dirección de observación es también no crítica, y en concreto de manera ventajosa sobre toda la anchura del canal de la cubeta, de manera que de forma fiable todas las partículas o bien células emisoras de luz pueden ser detectada según la técnica de medición con rendimiento máximo de la luz. Independientemente de la posición de la partícula, el mismo ángulo espacial de la luz fluorescente, es decir, aquella porción de la luz fluorescente irradiada, en general, esféricamente llega siempre al cilindro o bien al túnel receptor de la luz. Por lo tanto, se puede suprimir el ajuste sensible de la cubeta de medición frente al foto detector.

Facilidad de manejo del dispositivo:

50 El dispositivo propuesto para la detección de la luz de partículas microscópicas no requiere ningún reajuste o bien ningún ajuste óptico costoso y, en concreto, no en la puesta en funcionamiento ni posteriormente durante el funcionamiento. Todos los componentes están conectados fijamente entre sí de forma duradera. De esta manera, la disposición es insensible frente a vibraciones y es suficientemente robusta para posibilitar el empleo en laboratorios móviles. El dispositivo propuesto abre, por lo tanto, nuevos campos de aplicación de la citofotometría de flujo, en los que no se han podido emplear las disposiciones conocidas hasta ahora debido a su sensibilidad. Así, por ejemplo, es posible un diagnóstico inmune concomitante con la terapia para pacientes de HIV-SIDA en regiones agrícolas de los países más pobres.

Especialmente cuando el diámetro del cilindro es grande, como se ha mencionado anteriormente, resultan las ventajas de una llamada "apertura numérica grande", como se conocen, en principio, de sistemas de lentes ópticas, pero no se realizan en dispositivos del tipo indicado anteriormente y que no se pueden conseguir con los llamados conductores de luz formados por fibras de vidrio, de venta en el comercio, puesto que éstos presentan una apertura numérica considerablemente más reducida.

A continuación se explican en detalle ejemplos de realización de la invención con la ayuda de dibujos puramente esquemáticos. En este caso:

La figura 1 muestra un primer ejemplo de realización con una instalación de medición, que presenta un cilindro hueco.

La figura 2 muestra un segundo ejemplo de realización, en el que están previstas dos instalaciones de medición similares de la de la figura 1, y

La figura 3 muestra un tercer ejemplo de realización con una instalación de medición, que presenta un cilindro macizo.

En los dibujos se representa siempre un fragmento muy esquemático de un citofotómetro de flujo. A partir de la figura 1 se deduce de manera conocida en sí que dos corrientes parciales indicadas, respectivamente, por medio de flechas de un fluido de transporte 10 se reúnen por encima de una cánula 11. Las células 12 a contar y marcadas de forma fluorescente salen individualmente por el extremo superior de la cánula 11 y son transportadas junto con el fluido de transporte 10 a través de un canal interior 1 de una cubeta de paso 8 del dispositivo. Allí son irradiadas por un rayo láser fino y son excitadas para la emisión de luz fluorescente. En el dibujo el rayo láser se extiende perpendicularmente al plano del dibujo; por lo tanto, solamente se puede reconocer como un punto que incide sobre una célula 12 y se marca por medio de una flecha identificada con L. La anchura del canal interior 1 que se deduce a partir de la figura 1 es tan reducida que las células 12 llegan individualmente al rayo láser y generan impulsos de luz individuales, diferenciables y, por lo tanto, contables.

En la dirección de un receptor de fotones o bien foto detector 2, el canal interior 1 se cierra por medio de una pared de vidrio en forma de una ventana de pared fina. El espesor de pared es típicamente de 0,2 a 1 mm. Sobre esta ventana se encuentra un cilindro hueco 4 con un diámetro grande, en comparación con la anchura del canal interior 1, de típicamente 8 a 10 mm de diámetro interior. El área de la pared interior del cilindro hueco está azogada, de manera que resulta una superficie de reflexión cilíndrica para la luz fluorescente que llega al cilindro hueco 4. A favor de la robustez de todo el dispositivo, el cilindro hueco 4 puede estar constituido de metal, pero de la misma manera son posibles otros materiales, utilizando con preferencia aquellos materiales, que posibilitan una superficie muy lisa.

De acuerdo con la invención, el área de la pared interior está provista con una capa de espejo 5 adicional, que presenta propiedades de reflexión óptimas, la cual crea el área de reflexión cilíndrica.

En la dirección del foto detector 2, en el cilindro hueco 4 se conecta un filtro de luz fluorescente 6, que deja pasar la luz fluorescente, que debe ser medida por las células. Detrás del filtro de luz fluorescente 6 se encuentra el foto detector 2. Sobre el lado de la cubeta de paso 8, que está colocado opuesto al foto detector 2, la ventana de la cubeta está provista con una capa de espejo 7. De esta manera se eleva el rendimiento de la luz acumulada.

De acuerdo con la figura 2, en otro ejemplo de realización, sobre los dos lados de la cubeta de paso 8, respectivamente, está dispuesta una instalación de medición independiente, que están configuradas ambas según la figura 1: presentan de manera correspondiente dos cilindros huecos 4 azogados en el interior, filtros de luz fluorescente 6 y foto detectores 2. De esta manera, a través de la utilización de dos filtros de luz fluorescente 6 diferentes se pueden detectar diferentes longitudes de ondas de luz en una única pasada de medición.

De acuerdo con la figura 3, en otro ejemplo de realización está previsto que la superficie de reflexión cilíndrica no esté formada por un cilindro hueco azogado en el interior, sino por un cilindro macizo 9 en forma de una barra de vidrio, que está azogada en el exterior y cuyo diámetro exterior corresponde al diámetro interior del cilindro hueco 4 de la figura 1. La capa de espejo 5 colocada en este caso en el exterior forma la superficie de reflexión cilíndrica y puede estar provista con una capa de protección no representada por razones de simplicidad, por ejemplo una laca de protección, que protege la capa de espejo contra las influencias del medio ambiente. De manera similar al ejemplo de realización de la figura 2, también en el dispositivo según la figura 3 puede estar prevista la disposición de dos instalaciones de medición, que contienen en este caso, respectivamente, un cilindro macizo 9.

En todo el dispositivo está previsto, respectivamente, proteger las instalaciones de medición y en particular los cilindros 4 y 9 por medio de una carcasa no visible a partir de los dibujos contra las influencias mecánicas.

En la figura 1 se indica un ángulo espacial 14 de la luz fluorescente a detectar. Esencialmente, este ángulo espacial 14 se determina a través del ángulo de reflexión total en las superficies límites del líquido y la pared de vidrio en el canal interior 1 y la ventana 3. De esta manera, la distancia de la partícula a medir desde el cilindro hueco receptor

de la luz 4 no es crítica. El cilindro hueco receptos de la luz azogado tiene un diámetro comparativamente grande. De esta manera, la posición de la partícula a medir en ángulo recto a la dirección de observación es de la misma manera no crítica. Independientemente de la posición de la partícula, la luz llega siempre desde el mismo ángulo espacial 14 de la luz fluorescente hasta el cilindro hueco 4.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Dispositivo para la medición de la luz emitida desde partículas o células (12) de tamaño microscópico, con una cubeta de paso (8), a través de la cual se conducen las partículas o células luminosas (12), en el que la cubeta de paso (8) presenta una ventana transparente a la luz, y con un foto detector (2), que detecta la luz emitida desde las partículas o células luminosas (12), y con un elemento óptico, que conduce la luz que sale desde la ventana (3) hacia el foto detector (2), en el que el elemento óptico está configurado como cilindro (4, 9) con una superficie de reflexión cilíndrica, en el que la cubeta de paso (8) está dispuesta fuera del cilindro (4, 9), de tal manera que el cilindro (4, 9) está dispuesta entre la cubeta de paso (8) y el foto detector (2), en el que la cubeta de paso (8) está dispuesta con su eje longitudinal perpendicularmente al eje longitudinal del cilindro (4, 9), y en el que el dispositivo está configurado para la medición de la luz fluorescente que procede desde partículas o células (12) de tamaño microscópico, en el que entre la cubeta de paso (8) y el foto detector (2) se encuentra un filtro de luz fluorescente (6) que deja pasar luz fluorescente, el dispositivo está libre de lentes, y el cilindro (4, 9) tiene una abertura numérica grande, donde el diámetro de la superficie de reflexión cilíndrica es al menos 50 veces mayor que la distancia mínima entre la partícula emisora de luz y la abertura de entrada de la luz del cilindro (4, 9), donde la superficie de reflexión cilíndrica está formada mediante un revestimiento del cilindro (4, 9).
- 2.- Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el cilindro está configurado como cilindro hueco (4), cuya superficie interior forma la superficie de reflexión cilíndrica.
- 3.- Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el cilindro está configurado como cilindro macizo (9) transparente a la luz, cuya superficie exterior forma la superficie de reflexión cilíndrica.
- 4.- Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque sobre dos lados de la cubeta de paso (8) se encuentra, respectivamente, una disposición de medición de la luz independiente, que está configurada con diferentes filtros que dejan pasar solamente la luz fluorescente.
- 5.- Dispositivo de acuerdo con las reivindicaciones 3 y 4, caracterizado porque sobre los dos lados de la cubeta de paso (8) están dispuestos filtros de luz fluorescente (6), en el que los dos filtros de luz fluorescente (6) son transparentes para diferentes longitudes de ondas de luz.
- 6.- Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones, caracterizado porque la superficie de reflexión cilíndrica del cilindro (4, 9) presenta una sección transversal redonda circular. El cilindro (4, 9) tiene una abertura numérica grande. La superficie de reflexión cilíndrica está formada mediante un revestimiento del cilindro (4, 9).
- 7.- Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones, caracterizado porque el rayo de luz (L) dirigido sobre las partículas o células (12) se extiende perpendicularmente al eje longitudinal del cilindro (4, 9) y perpendicularmente al eje longitudinal de la cubeta de paso (8).

FIG.1

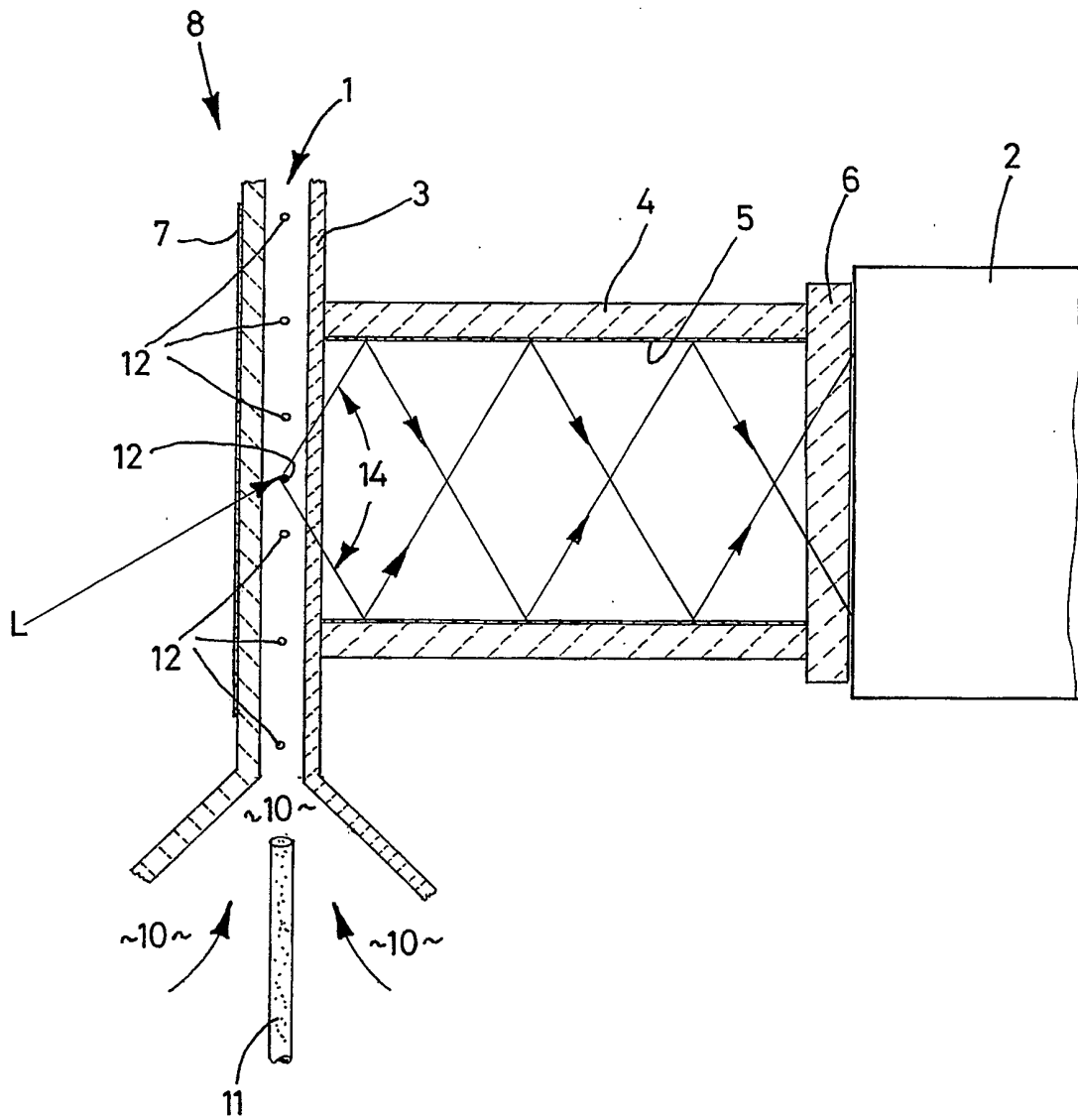


FIG. 2

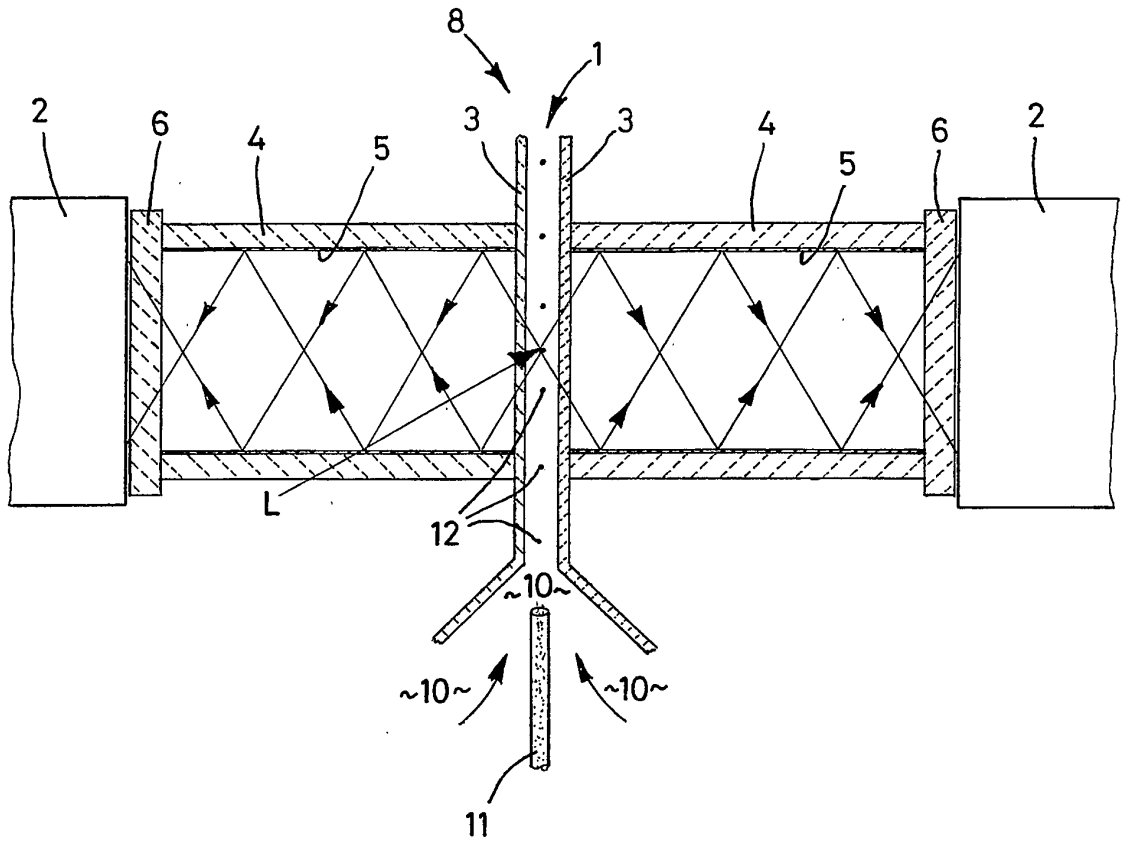


FIG.3

