



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 906**

51 Int. Cl.:  
**G01N 15/02** (2006.01)  
**G01N 21/49** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03720740 .4**  
96 Fecha de presentación : **29.04.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1499871**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.01.2005**

54 Título: **Detección óptica y análisis de partículas.**

30 Prioridad: **29.04.2002 GB 0209666**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.06.2011**

73 Titular/es: **Robert Jeffrey Geddes Carr**  
**Wayside, Thorneydown Road**  
**Winterbourne Gunner, Salisbury SP4 6LN, GB**

72 Inventor/es: **Carr, Robert Jeffrey Geddes**

74 Agente: **Justo Bailey, Mario de**

ES 2 360 906 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**

5 Detección óptica y análisis de partículas

La presente invención se refiere a la detección óptica y al análisis de partículas de dimensiones nanométricas o sub-micrométricas.

10 Existe un gran número de principios y técnicas mediante los que pueden ser analizadas las partículas en cuanto a su número, tamaño, forma, composición y movimiento. Históricamente, la observación y la caracterización de partículas ha estado basada en el campo de la microscopía en el que se generan imágenes de partículas considerablemente aumentadas mediante el uso de sistemas de lentes de alta potencia, y que pueden ser vistas directamente por el ojo o pueden ser capturadas mediante una cámara para su interpretación posterior por parte del operador o por medio de un sistema de análisis de imágenes.

15 Existen muchos tipos de sistemas de microscopio capacitados para caracterizar la partícula en términos de su interacción con la iluminación incidente. Por ejemplo, la partícula puede absorber selectivamente ciertas longitudes de onda de la luz tal como ocurre en absorción diferencial, la técnica más común en la microscopía de transmisión convencional. Existen otras variantes microscópicas que monitorizan selectivamente longitudes de onda específicas generadas por la partícula cuando se ilumina mediante una iluminación incidente, tal como la microscopía fluorescente que es útil para la reducción de la interferencia de fondo y que puede ser utilizada para identificar estructuras específicas mediante el uso de etiquetas fluorescentes. Todavía otras técnicas microscópicas utilizan la manera en la que una partícula induce un cambio de fase en la luz incidente, tal como microscopía de contraste de fase o de interferencia. Otras técnicas microscópicas, tal como la microscopía epiluminiscente, emplean dispersión de luz en grandes ángulos para permitir que las partículas de bajo contraste sean visualizadas contra un fondo sin iluminar. Se utilizan otras versiones similares de esta técnica en microscopía, de las que la más común se conoce como microscopía de campo oscuro. En este caso, la muestra se ilumina mediante una fuente de alta apertura numérica, y la porción central del cono de iluminación se bloquea en cuanto a la entrada del objetivo de detección mediante un tope óptico de modo que la partícula se ilumina solamente según un ángulo oblicuo.

20 Los procedimientos de iluminación varían considerablemente y, en determinadas circunstancias la muestra (típicamente, una suspensión acuosa de partículas) puede ser colocada sobre un substrato óptico transparente (típicamente, de vidrio o sílice), el cual puede ser iluminado mediante un haz óptico adecuadamente definido y colimado, formando un cierto ángulo llamado ángulo crítico, al que la luz incidente es reflejada a lo largo del plano del elemento óptico sobre el que se ha colocado la muestra líquida. Una pequeña porción del haz, denominada onda evanescente, se propaga a una corta distancia en la fase de muestra por encima del substrato óptico, y las partículas que entran en esta región evanescente actúan de modo que dispersan algo de este campo de otro modo no radiativo. La luz acoplada (es decir, esparcida por la partícula por dentro del campo evanescente), puede ser detectada a continuación en el campo lejano, ya sea por medio del ojo o ya sea por medio de un detector adecuado situado normal al, o formando un ángulo grande con el, plano de la superficie. Cuando se emplea en una configuración de microscopio, esta técnica se conoce como microscopía de campo evanescente y se basa en el principio de reflexión interna total incompleta.

25 Existen numerosos procedimientos que no incluyen formación de imágenes, para el análisis óptico de suspensiones de partículas sub- $\mu\text{m}$  o de soluciones de partículas a escala del nm, tales como moléculas biológicas o macromoléculas. Muchas de estas técnicas monitorizan la interacción entre moléculas biológicas y, con el fin de definir una región dentro de tales interacciones, pueden ser detectadas específicamente dentro de una interferencia mínima de otras especies en la masa volúmica de la fase de solución, siendo tales análisis llevados a cabo frecuentemente en la interfaz de un guía ondas óptico con una estructura de fibra óptica sobre cuya superficie se han inmovilizado moléculas biológicas capturadas, tales como anticuerpos, específicas para el analito objetivo. En guía ondas o sistemas de fibra óptica convencionales, se hace uso de los cambios en las propiedades de índice de refracción de la interfaz a continuación de la unión de moléculas biológicas específicas en la región de campo evanescente de la estructura óptica asociada a la superficie. Este campo se extiende, sin embargo, solamente alrededor de 100-200 nm en la fase de solución de masa, y está por consiguiente limitado en cuanto a su capacidad de monitorizar interacciones débiles que incluyan números limitados de interacciones moleculares. Un procedimiento de este tipo se ha divulgado en el documento DE 4307042 (930305), en el que una capa simple o múltiple de moléculas receptoras es depositada sobre un dispositivo sensor evanescente guía ondas, y el cual está capacitado para detectar y cuantificar varias especies químicas y bioquímicas en solución. Un procedimiento similar se ha divulgado en el documento WO 9005295 que reivindica prioridad del documento SE 884075 (881110) en el que se utiliza un prisma en forma de cuña para permitir que la luz reflejada con diferentes ángulos hacia fuera del lado inferior del elemento de sensor óptico, sea representada en imágenes y analizada para cuantificar especies específicas en solución. De forma similar, el documento EP 677735, que reivindica prioridad del documento US 228233 (940415), describe una cavidad resonadora óptica en la que la luz es reflejada a partir de una cavidad reflectora interna total (TIR) que está en contacto con una solución cuyos componentes interactúan con el campo evanescente en el interior de la cavidad TIR, permitiendo la cuantificación de especies en la solución. Estas técnicas están caracterizadas por su fiabilidad respecto al análisis de la luz que es reflejada desde el lado inferior de la

superficie de un elemento de detección.

La capacidad para seguir números tan bajos de interacciones o eventos de unión puede verse, no obstante, significativamente incrementada en uno o dos órdenes de magnitud con el empleo de técnicas de Resonancia de Plasmón Superficial, en las que la superficie de una estructura de guía ondas óptico está recubierta con una película delgada de un metal conductor, típicamente oro, plata o aluminio, en la que las ondas electromagnéticas, denominadas Plasmones Superficiales, pueden ser inducidas por un haz de luz incidente sobre la interfaz de vidrio-metal con un ángulo específico denominado ángulo de Resonancia de Plasmón Superficial. La modulación del índice de refracción de la región interfacial entre la solución y la superficie metálica a continuación de la unión de las macromoléculas capturadas, provoca un cambio en el ángulo SPR que, o bien puede ser medido directamente, o bien provoca que la cantidad de luz reflejada desde el lado inferior de la superficie metálica cambie. Tales cambios pueden estar relacionados directamente con la masa y con otras propiedades ópticas de las moléculas que se unen a la superficie del dispositivo SPR. Se han divulgado diversos sistemas biosensores basados en tales principios. Así, el documento WO 9005305 que reivindica prioridad del documento SE884974 (881110), describe el uso de una película metálica depositada sobre un lado de una unidad de bloque de instrumentación óptica, de la que un lado multi-funcionalizado está en contacto con una solución de reactivos o muestras que han de ser medidas, estando el otro lado iluminado por medio de un haz óptico en el interior de la unidad de bloque de instrumentación óptica de modo que causa la reflexión hacia fuera de la superficie metálica con un ángulo tal que la reflectancia se modifica mediante la unión selectiva de ligandos sobre la superficie funcionalizada. La medición del haz reflejado puede estar correlacionada con concentraciones de especies específicas que se unen a la superficie detectora funcionalizada.

De manera similar, el documento EP 341927, que reivindica prioridad del documento GB881154 (880510), describe un sensor de prueba biológica o bioquímica, que comprende un sensor de resonancia de plasmón superficial (SPR) y una superficie de anticuerpo de muestra dispuesta de manera que influye en las características de resonancia. El sensor SPR comprende un portaobjetos de vidrio metalizado sobre cuya interfaz de vidrio-metal se dirige un haz de luz con un ángulo al que se induce que los plasmones superficiales resuenen en la película metálica. Los cambios en el ángulo de resonancia sobre la unión de analito, se determinan midiendo la intensidad o el ángulo de la luz reflejada internamente desde la interfaz de metal-vidrio. Tales técnicas de reflectancia sin formación de imagen, monitorizan únicamente la unión de números relativamente grandes de macromoléculas mediante la medición de cambios en la cantidad o la posición de la luz reflejada.

Al igual que con las técnicas evanescentes descritas en lo que antecede, estas técnicas están caracterizadas por su fiabilidad respecto a la medición de la intensidad de luz reflejada desde la superficie o a los cambios en el ángulo de resonancia sobre la unión de componentes de muestra específicos.

Se ha descrito una modificación de tales dispositivos SPR que puede ser utilizada para localizar, visualizar, detectar o contar la presencia de macromoléculas individuales o de partículas muy sub- $\mu\text{m}$ , en la que el efecto óptico de la interacción de estructuras individuales a escala nm o muy sub- $\mu\text{m}$  con el campo de resonancia de plasmón superficial evanescente, provoca que la luz sea dispersada desde tales estructuras hacia el campo lejano con ángulos grandes. Así, el documento WO 98/57148 y el documento US 09/308049 que reivindica prioridad del documento PCT/GB98/01591, describen un procedimiento y un aparato para la detección de partículas simples de estructuras sub-micrométricas tales como las moléculas biológicas y los virus, utilizando un sustrato ópticamente transparente recubierto con una película delgada de un metal, el cual se ilumina con un haz óptico incidente con el ángulo de resonancia de plasmón superficial, en el que las partículas sub-micrométricas contenidas en la muestra dispuesta en contacto con la película metálica dispersan luz que puede ser detectada en el campo lejano por medio de sistemas de fotodetección convencionales. El aparato puede estar configurado en forma de microscopio óptico o de flujo citométrico.

De manera similar, el documento WO 98/22808 y el documento WO 0142768 describen un aparato de resonancia de plasmón superficial para detectar un analito soluble (por ejemplo, una proteína) o un analito particulado (por ejemplo, una célula), comprendiendo el aparato un bloque de sensor adaptado para recibir un sensor, siendo dicho sensor, por ejemplo, un portaobjetos para sensor que tiene una superficie de sensor capacitada para vincular el analito; una fuente de luz capacitada para generar una onda de resonancia de plasmón superficial evanescente en la superficie de sensor de un portaobjetos para sensor en el bloque de sensor; un primer detector capacitado para detectar la luz procedente de la fuente luminosa que se refleja internamente desde la superficie de sensor; y un segundo detector (por ejemplo, una cámara de video) capacitado para detectar la luz esparcida o emitida desde un analito vinculado al mismo. Opcionalmente, el aparato comprende además una segunda fuente luminosa para incrementar la intensidad de la luz esparcida o emitida desde un analito vinculado a la superficie de sensor, estando la misma con preferencia ubicada de modo que minimiza la cantidad de luz transmitida desde la misma y que es detectada por el primer detector. También se han divulgado sensores adaptados para su uso en el aparato, y procedimientos de detección de analitos en muestras que comprenden la exposición de muestra a la superficie de sensor del aparato.

En ambos casos mencionados en lo que antecede, que emplean el fenómeno de resonancia de plasmón superficial, es necesario que el haz de iluminación sea incidente sobre el lado inferior de la película metálica en contacto con el sustrato subyacente ópticamente transparente, con el fin de inducir plasmones superficiales en la superficie

metálica, siendo entonces la energía procedente del campo evanescente asociado esparcida en el campo lejano por medio de los particulados objetivo del interior del campo evanescente. Además, el ángulo con el que la iluminación incidente debe golpear el lado inferior de la película metálica con el fin de excitar los plasmones superficiales en la superficie de película metálica, es muy estrecho y requiere un alineamiento cuidadoso de los elementos ópticos componentes. Finalmente, la cantidad de energía acoplada a través del metal desde el haz de iluminación incidente hasta el campo de plasmón superficial evanescente, es con frecuencia insuficiente para que las partículas interactúen con dicho campo, para esparcir energía suficiente para que los detectores permitan que las partículas muy pequeñas, por ejemplo de menos de 200 nm, sean visualizadas. De ese modo, el documento WO 142768 se limita a describir la visualización de células bacterianas mediante esta técnica a título de ejemplo, siendo tales partículas de diámetro superior a 500 nm.

Si no se requiere la generación de imágenes de partículas individuales, por ejemplo cuando es necesario determinar solamente la presencia de partículas y/o estimar su tamaño, distribución por tamaño, número, etc., entonces se pueden utilizar otros principios en los que predominen los fenómenos de esparcimiento luminoso. Tales procedimientos se basan en la medición de la amplitud de la señal óptica generada por la interacción de partículas con haces adecuadamente intensos y enfocados (típicamente, a partir de fuentes láser), pasando cada partícula a través de la zona de medición óptica por la que se provoca que pase el haz interrogante, siendo las señales generadas por la interacción de la partícula con el haz óptico, detectada mediante dispositivos fotosensibles adecuados tales como tubos fotomultiplicadores, fotodiodos, CCDs y similares.

Tales instrumentos se conocen como detectores de partículas o contadores de partículas, y se utilizan ampliamente en una diversidad de aplicaciones científicas e industriales. Una de estas técnicas, conocida como citometría de flujo, permite que las partículas en suspensión concentrada, sean direccionadas sobre una base individual mediante dilución de la muestra adicionándola lentamente a una vaina hidrodinámica de líquido sustancialmente libre de partículas que fluye rápidamente, cuya salida está dirigida por medio de una boquilla ajustada finamente de modo que circula de forma precisa a través de un haz láser interrogante enfocado finamente, que constituye un volumen de medición. Midiendo la intensidad de luz esparcida y cuando sea aplicable, la longitud de onda de fluorescencia generada por la interacción de la partícula con la fuente óptica adecuadamente intensa y enfocada, partículas tan pequeñas como de 0,2  $\mu\text{m}$  pueden ser cuantificadas, y se pueden determinar diversos parámetros ópticos relacionados con su tamaño y absorción diferencial o con características de fluorescencia.

Por debajo de un cierto límite de tamaño de partícula, la señal generada por la interacción de la partícula con el haz de luz interrogante es insuficiente para que la misma sea distinguida del fondo inherente a tales configuraciones de instrumento óptico de dispersión de luz. El incremento de la intensidad del haz óptico interrogante actúa simplemente de modo que incrementa la intensidad de fondo así como de la señal generada por la partícula. Para determinar la presencia de tales partículas sub-micrométricas, es normalmente habitual emplear técnicas no ópticas de resolución más alta, tales como microscopía electrónica, pero éstas adolecen de una complejidad y unos costes significativamente más elevados.

Existe por tanto una necesidad de un sistema de detección de partículas ópticas que sea simple, robusto y de bajo coste, que sea capaz de detectar la presencia de partículas muy pequeñas (tales como, por ejemplo, sustancialmente por debajo de 1/4 de la longitud de onda de la radiación de iluminación), sobre una base individual sin necesidad de fuentes ópticas caras, de potencia elevada y peligrosas, que no se base en el fenómeno de esparcimiento del campo evanescente asociado a plasmones superficiales resonantes. Con preferencia, tal aparato debería ser compatible con los microscopios ópticos y con los aparatos de detección de partículas existentes, simple de usar y de operar, y que sea capaz de proporcionar información tal como tamaño de partícula, distribución por tamaño, número, y otros parámetros ópticos sobre suspensiones de partículas de características mixtas en un fondo frecuentemente complejo.

## Sumario de la Invención

La presente invención está basada, al menos en parte, en el hallazgo inesperado de que cuando un volumen pequeño de una suspensión de particulados sub-micrométricos, ejemplificados mediante partículas de virus, se sitúa sobre la superficie de un elemento óptico que comprende, por ejemplo, un substrato ópticamente transparente (típicamente, vidrio o sílice), del que una parte se ha recubierto con una delgada película de metal (por ejemplo, de 10's nm), por ejemplo de cromo, plata u oro, que es al menos parcialmente opaca, de tal modo que una región adyacente adicional del substrato ópticamente transparente se deja sin recubrir con la película metálica y cuya región recubierta no metálica se ilumina mediante un haz de luz que se hace incidir sobre la misma, o en relación de proximidad con la misma, en un punto que es cercano (es decir, dentro de los 5 mm, con preferencia dentro de 1 mm, más preferentemente dentro de 0,5 mm) a la región recubierta de película metálica (pero no coincidente con la misma) y formando un ángulo tal que se provoca que el haz óptico se propague, por refracción, a través de la muestra sustancialmente en paralelo con, y a una pequeña distancia por encima de, la película metálica adyacente, se ha encontrado que las partículas sub-micrométricas individuales que están dentro de la trayectoria del haz que pasa a través de la muestra, por encima de la película metálica, esparcen cantidades suficientes de luz como para ser individualmente discernibles a través de un objetivo/ combinación de lentes de un microscopio convencional, por medio del ojo o mediante un fotodetector adecuado tal como un tubo multiplicador fotónico, un fotodiodo de estado

5 sólido, una cámara CCD u otro dispositivo fotosensible situado en un plano de imagen en el campo lejano y normal al, o formando un ángulo grande con el, plano de la superficie metalizada no radiativa. Las partículas susceptibles de ser así detectadas individualmente, son de una dimensión tal que las mismas no podrían haberse detectado en otro caso mediante transmisión óptica convencional, campo oscuro, contraste de fase, campo evanescente o técnicas microscópicas de resonancia de plasmón superficial tales como las descritas en lo que antecede.

10 La muestra comprenderá típicamente, aunque no necesariamente, un líquido que comprende una suspensión u otra dispersión de partículas. Las partículas pueden ser sólidas o pueden ser, de un modo plausible, líquidas (por ejemplo, finas gotitas en emulsión). Una muestra de líquido será normalmente, aunque no inevitablemente, un líquido acuoso.

15 En términos generales, la presente invención proporciona también un aparato para la detección y/o el análisis de partículas sub-micrométricas individuales de una muestra, siendo el aparato tal y como se define en la reivindicación 16 de las reivindicaciones anexas a la presente memoria.

Componentes generalmente adecuados para su uso en el aparato de la invención se han divulgado, *inter alia*, en el documento US 6.280.960.

20 El experto en la materia comprenderá que, mientras el sustrato es preferentemente, en *sí mismo*, totalmente o sustancialmente transparente para el haz de radiación electromagnética, el recubrimiento opaco es suficiente para hacer que sea sustancialmente o totalmente opaca aquella porción del sustrato cuya superficie se recubra con el mismo.

25 Típicamente, se provoca que el haz óptico sea incidente sobre la superficie del sustrato opuesta a la que está parcialmente recubierta con el recubrimiento opaco, siendo entonces el haz propagado a lo largo de la trayectoria deseada, a través de la muestra, por refracción a través del sustrato, siendo por lo tanto un requisito en esa realización que el sustrato sea totalmente o sustancialmente transparente a la radiación electromagnética, y que al menos una porción de la superficie del sustrato no esté cubierta con el recubrimiento opaco.

30 Resulta al menos imaginable, sin embargo, que en otras realizaciones el haz de radiación electromagnética pueda ser directamente incidente sobre la muestra sin tener que pasar primero a través del sustrato, por ejemplo haciendo pasar el haz en relación de proximidad cercana con el sustrato, directamente en paralelo con la superficie recubierta del sustrato o formando un ligero ángulo de incidencia con el mismo, o en otra realización, se hace que la radiación electromagnética pase a través de la muestra por reflexión desde la superficie superior del sustrato (es decir, que el haz sea incidente sobre el mismo lado del sustrato que el que está al menos parcialmente recubierto con el recubrimiento opaco). En estas realizaciones, no existe ningún requisito en el sentido de que el sustrato tenga que ser total o parcialmente transparente, y ningún requisito de que al menos una porción de la superficie del sustrato esté libre de recubrimiento.

40 La radiación electromagnética será ventajosamente un haz enfocado de luz visible, y el aparato comprenderá ventajosamente lentes adecuadas u otros medios de enfoque. Una fuente adecuada de radiación electromagnética es un láser.

45 Típicamente, el sustrato comprenderá vidrio o sílice, y será ópticamente transparente a longitudes de onda visibles para el ojo humano.

50 En algunas realizaciones se prefiere que el recubrimiento opaco sea reflectante. El inventor ha encontrado, no obstante, que un recubrimiento metálico opaco resulta particularmente adecuado. El espesor del recubrimiento opaco es, con preferencia, menor de 500 nm, más preferentemente menor de 250 nm, y más preferiblemente menor de 100 nm.

55 El borde del haz de radiación electromagnética, definido por su punto 1/e, se hace que se propague con preferencia menos de 2  $\mu\text{m}$  por encima de la superficie recubierta del sustrato, más preferentemente menos de 1  $\mu\text{m}$ , y más preferiblemente menos de 500 nm. Además, se hace que el haz se propague sustancialmente en paralelo con la superficie recubierta del sustrato, es decir, formando un ángulo con el plano de la superficie que sea menor de 5°, con preferencia menor de 2°, más preferiblemente menor de 1°, y más preferiblemente menor de 0,5°, y el término "ligero ángulo" debe ser entendido adecuadamente a los efectos de la presente descripción.

60 La invención proporciona también un procedimiento que se ha definido en la reivindicación 1 de las reivindicaciones anexas a la presente memoria.

65 En una realización preferida conforme a la presente invención, se proporciona un procedimiento y un aparato para la detección óptica individual y/o la caracterización de pequeñas partículas (en relación con la longitud de onda de la luz que se utiliza para su iluminación), suspendidas en un medio líquido o gaseoso transparente (por ejemplo, a los efectos de determinación de características de partícula tales como el tamaño, la distribución por tamaño, la concentración numérica, la forma u otras características ópticas tales como fluorescencia, polarización, propiedades

de modulación de fase, etc.), en el que una muestra que contiene partículas suspendidas se sitúa sobre la superficie de un elemento óptico que comprende un substrato ópticamente transparente (por ejemplo, vidrio o sílice), una parte de cuya superficie se ha recubierto con una delgada película (10's nm) de un metal, por ejemplo cromo, plata u oro, que es al menos parcialmente opaco ópticamente, de tal modo que una región adicional adyacente de la superficie del substrato ópticamente transparente se deja sin recubrir con la película metálica, y cuya región superficial sin recubrimiento metálico se ilumina mediante un haz de luz que se hace que incida sobre la misma en un punto que está cerca del (pero no coincidente con el) recubrimiento de película metálica adyacente, y formando un ángulo tal que se provoca que el haz óptico se propague, por refracción, a través de la muestra sustancialmente en paralelo (según se ha definido en lo que antecede) con el plano de la película metálica, y a una pequeña distancia por encima de la película metálica, de tal modo que las partículas sub-micrométricas individuales del interior de la trayectoria del haz óptico que pasa a través de la muestra por encima de la película metálica, dispersen cantidades suficientes de luz como para ser individualmente discernibles a través de una combinación de objetivo/ lente de microscopio convencional, por el ojo o mediante un fotodetector adecuado tal como un tubo multiplicador fotónico, un fotodiodo de estado sólido, una cámara CCD u otro dispositivo fotosensible situado en un plano de imagen en el campo lejano y normal al, o formando un gran ángulo con el, plano de la superficie recubierta. Las partículas capacitadas para ser así detectadas individualmente, son de un tamaño tal que las mismas no podrían haberse detectado en otro caso mediante transmisión óptica convencional, campo oscuro, contraste de fase, campo evanescente o técnicas microscópicas de resonancia de plasmón superficial.

Ventajosamente, la presencia de la película opaca por debajo de la trayectoria que describe el haz óptico, actúa de modo que aumenta la visibilidad de las partículas residentes en la misma, esparciendo tales partículas, cuando están por debajo de una cierta dimensión, una luz insuficiente para ser visibles cuando no existe película metálica. En consecuencia, la presencia de una película opaca (o sustancialmente opaca), sobre al menos parte de la superficie del substrato, es una característica esencial de la invención.

La fluorescencia emitida por, o la luz esparcida desde, las partículas, se ve mediante el ojo o mediante detectores adecuados, a modo de un punto de luz que se eleva desde cada partícula en la región de medición, pudiendo la amplitud de la señal procedente de cada una ser indicativa de diversas propiedades ópticas de las partículas, así como indicativa de su presencia, tamaño, movimiento, número, concentración, fluorescencia, etc., pudiendo ser todos esos parámetros cuantificados, si se desea, mediante un procesamiento adecuado de la señal o con instrumentación de análisis de imágenes.

De acuerdo con la invención, la óptica y la instrumentación de los microscopios pueden ser utilizadas para permitir que partículas que son tan pequeñas que serían indetectables en otro caso con técnicas de microscopía óptica convencional, sean detectadas individualmente a los efectos de determinación de presencia de partícula, tamaño, distribución por tamaño de partícula, concentración, número, atributos fluorescentes (cuando sean inherentes o mediante la adición de etiquetas fluorescentes), para la medición de parámetros específicos asociados a la composición de la partícula, las propiedades de modificación de polarización, las propiedades de modulación de fase, o cualquier otro parámetro normalmente direccionable mediante métodos ópticos de análisis.

En el caso particular de que el presente procedimiento y el aparato asociado puedan ser utilizados junto con una aplicación no microscópica, tal como en el caso de un aparato contador de partículas, a los efectos de, por ejemplo, determinar el conteo de partículas como una función de la clase de tamaño, se puede hacer que la suspensión de partículas circule por encima de la superficie del elemento óptico de tal modo que las suspensiones de partículas que en otro caso se diluirían como contenedoras de demasiado pocas partículas dentro del volumen de medición como para llevar a cabo una estimación estadísticamente segura de la presencia de partículas o de la concentración numérica o de la distribución por tamaño, se puede hacer que fluya un volumen incrementado de medio contenedor de partículas por encima de la región de detección, incrementando con ello el número de partículas susceptibles de ser detectadas y analizadas de forma segura. Para el conteo y análisis de partículas en tales volúmenes más grandes, se puede emplear el presente procedimiento en un sistema de medición y análisis óptico de partículas, ejemplificado mediante los instrumentos que se conocen como citómetros de flujo, en los que se hace que una suspensión de partículas pase a través de una región de medición óptica, introduciendo, a través de una boquilla, la muestra portadora del particulado en una corriente de fluido sustancialmente libre de partículas que se mueve a una velocidad más alta, conocida como vaina hidrodinámica, de tal modo que la muestra portadora de partículas se diluye hasta el punto de que las partículas pasan a través de la región de medición óptica sobre una base individual, y la dirección del flujo de la muestra portadora de partículas puede ser ajustada finamente para que se alinee óptimamente con la región de medición óptica. Un tipo de citómetro de flujo emplea lo que se conoce como configuración de chorro-sobre-una-superficie-abierta (JOOS), en la que el flujo de la vaina hidrodinámica portadora de la muestra se manipula sobre una superficie plana, ópticamente transparente, de tal modo que la corriente de muestra puede ser ajustada finamente mediante ajuste de la posición de la boquilla y de la velocidad de flujo para ser colocada de manera más precisa en la parte central del haz óptico interrogante. De acuerdo con la invención, el uso de una superficie óptica metalizada, según se ha descrito en la presente memoria, permite ventajosamente que partículas más pequeñas de lo que en otro caso podrían ser ópticamente detectables, sean visualizadas en un sistema de ese tipo en virtud del aumento de visibilidad proporcionado por la presencia de la película metálica según se ha descrito en lo que antecede.

El proceso de la invención puede ser así utilizado para determinar la presencia de partículas, el tamaño, la distribución por tamaño de partícula, la concentración, el número, los atributos fluorescentes (si son inherentes o mediante la adición de etiquetas fluorescentes), para la medición de parámetros específicos asociados a la composición de la partícula, las propiedades de modificación de polarización, las propiedades de modulación de fase, o cualquier otro parámetro direccionable normalmente mediante procedimientos ópticos de análisis, pero que es particularmente útil para llevar a cabo tales análisis sobre partículas que son tan pequeñas que en otro caso son indetectables sobre una base individual mediante sistemas ópticos que incorporan voluminosas configuraciones de lentes tales como los microscopios convencionales, los citómetros de flujo u otros instrumentos de medición óptica de partículas.

A este respecto, se ha encontrado que la presente invención permite que partículas sub-micrométricas, tales como virus sin etiquetar, en solución o en suspensión, sean visualizadas directamente y contadas sobre una base individual mediante el uso de fuentes ópticas de potencia moderada, tal como dispositivos láser de estado sólido de una salida del orden de mW.

La presente invención, en virtud de su sensibilidad a la detección de eventos asociados a partículas cercanas a una superficie, permite además que la interacción de partículas sub-micrométricas con recubrimientos superficiales y capas funcionalizadas sea monitorizada individualmente en el tiempo. Tales eventos pueden incluir la interacción de partículas de virus discretos con un recubrimiento sobre el elemento óptico, específicamente diseñado para reproducir sustancialmente las propiedades mostradas por una superficie celular a los efectos de investigación de eventos de infección de virus-envolvente celular.

De manera similar, de acuerdo con la invención, la adhesión de regiones sub-micrométricas de membranas o paredes celulares y de regiones de las mismas con superficies, modificadas química o bioquímicamente o de otro modo, puede ser monitorizada a resoluciones y sensibilidades que exceden de las presentadas por las técnicas microscópicas ópticas convencionales. Ventajosamente, tales eventos pueden ser monitorizados en tiempo real y en un entorno acuoso a diferencia con las condiciones liofilizadas necesarias para la visualización de tales interacciones mediante microscopía electrónica.

El rango de tipos de partículas que pueden ser vistos individualmente mediante el proceso de la invención, es también variado y amplio. El uso del elemento óptico descrito en la presente memoria, en virtud de su capacidad para facilitar la generación de señales ópticas detectables a partir de particulados sub-micrométricos, permite que el proceso de la invención sea aplicado a la estimación de niveles contaminantes en procesos o fluidos y líquidos industriales que se desea que estén libres de contaminantes, y a la detección de partículas de virus y otras entidades biológicas sub-micrométricas en muestras biológicas, medioambientales, biotecnológicas, alimenticias y clínicas, tales como la sangre y la orina y otros fluidos corporales, medios de purificación, preparaciones farmacéuticas, alimentos y similares. Partículas muy por debajo del micrómetro, diseñadas para que actúen como etiquetas fluorescentes, tales como las que se conocen como puntos cuánticos, son igualmente tratables en cuanto a detección y análisis. Otros particulados en solución o suspendidos en una fase fluida que pueden ser detectados, contados y caracterizados individualmente de acuerdo con la invención, incluyen las partículas orgánicas e inorgánicas contaminantes en fluidos libres de partículas de otro tipo, el humo u otras partículas producto de combustión en gases, contaminantes en aceites, gotitas de micro-emulsión (aceite en agua o agua en aceite), liposomas y vesículas, células sub-microscópicas tales como micoplasmas, coloides de origen natural o industrial, o cualquier suspensión, fluido coloidal o preparación en la que existan centros de dispersión de la luz y que sean demasiado pequeños para ser analizados mediante instrumentación óptica convencional. Se apreciará, por supuesto, que el proceso de la invención permite que cualquier particulado capacitado para dispersar o modificar la radiación incidente sobre el mismo, y que pueda ser distinguido del fondo mediante un detector adecuado, pueda ser detectado y analizado individualmente.

Adicionalmente se apreciará que el proceso de la invención es aplicable al análisis de macromoléculas y de estructuras macromoleculares individuales, mediante etiquetado, con un amplificador óptico adecuado o con una etiqueta fluorescente capacitada para permitir que puedan ser distinguidas del fondo si se precisa, que en otro caso no podrían ser detectables sobre una base individual utilizando instrumentación ópticamente convencional basada en caracterización de partícula. De igual modo, la invención puede ser aplicable en situaciones en las que las partículas detectables formen parte de una estructura supramolecular más grande, tal como una célula o un componente celular, un biofilm, una capa polimérica o similar.

El uso del elemento óptico parcialmente metalizado, iluminado con una fuente óptica adecuada según se describe en la presente memoria, es particularmente ventajoso debido a que las fuentes de luz fácilmente disponibles de potencia modesta tales como los láseres de gas, de diodo o de estado sólido, de bajo coste, pueden ser utilizadas junto con dispositivos fotosensibles ópticos y electrónicos de detección convencionales para detectar partículas que normalmente solo serían susceptibles de ser visualizadas individualmente mediante técnicas mucho más sofisticadas y complejas, tal como mediante microscopía electrónica.

Se debe apreciar que la invención no está limitada al caso de que las muestras estén en solución. Cuando lo estén, sin embargo, el solvente no necesita ser agua o incluso líquido, sino que la solución puede adoptar cualquier forma

conocida por la química física en la que las partículas puedan ser ópticamente diferenciadas del entorno circundante a efectos analíticos. Además, debe quedar claro que el proceso de la invención puede ser aplicado a situaciones en las que los particulados que han de ser detectados y visualizados individualmente, están accionados sobre o mediante otras fuerzas físicas, tales como campos eléctricos o acústicos, con el fin de, por ejemplo, inducir un movimiento o una separación física de otros componentes de la muestra.

Además de las realizaciones del procedimiento y del aparato que se han descrito en lo que antecede, la invención puede ser utilizada en una diversidad de configuraciones diferentes y para una diversidad de propósitos distintos. Así, además de la incorporación de la invención en una configuración citométrica de flujo de tipo JOOS, la misma podría ser incorporada en cualquier otro aparato de detección óptica en el que se mida la interacción de partículas muy pequeñas con un campo óptico. Por ejemplo, la invención podría ser incorporada en un microscopio de sonda de exploración, tal como un microscopio de campo cercano de exploración, como medio de visualización de una superficie y de características de localización deseables o interesantes sobre esa superficie, con el fin de ayudar a una eficiente exploración y obtención de imágenes de alta resolución de la superficie mediante la punta de la sonda de exploración.

De manera similar, la invención podría ser utilizada para monitorizar y analizar el movimiento Browniano dinámico de las partículas así visualizadas, información que, mediante técnicas analíticas adecuadas tales como espectroscopia de fluctuación numérica y espectroscopia de correlación de fluorescencia o equipo de análisis de imagen por rastreo de punto, puede ser utilizada para deducir una gama de características de partículas tales como el tamaño y la distribución por tamaño, el número, la concentración y la naturaleza y la dinámica de las interacciones de partícula-partícula o las interacciones de las partículas con una capa funcionalizada, en caso de que esté presente.

De manera similar, la invención podría ser utilizada para aumentar la realización, y extraer más información, de otras técnicas analíticas tales como un aparato de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR), que permita que las superficies de un dispositivo SPR sean analizadas simultáneamente en cuanto a particulados presentes en cualquier muestra dada que esté bajo análisis.

Se debe apreciar también que las pequeñas partículas que interactúan con el campo óptico presente en, o cerca de, la superficie del elemento óptico descrito en la presente memoria, pueden estar sujetas a fuerzas físicas motrices de la propia luz, un fenómeno conocido como fotoforesis. Esta capacidad de modificar el movimiento físico de las partículas, por ejemplo atraparlas de forma efectiva en una cierta posición mediante la presión de la luz solamente, podría ser utilizada con ventaja en el análisis y la manipulación de partículas de acuerdo con la invención.

Los beneficios particulares que se obtienen de la invención, incluyen la capacidad de visualizar de forma directa e individual partículas sub-microscópicas tales como virus y otras partículas con un diámetro comprendido en la gama de 5-500 nm que no hayan tenido que ser necesariamente amplificadas ópticamente con el uso de fluoróforo o de etiquetas dispersoras de luz, y que en otro caso no se habrían detectado con la instrumentación de un microscopio convencional. La resolución analítica se ve considerablemente mejorada con la capacidad proporcionada por la invención para caracterizar y analizar, sobre una base de partícula-por-partícula, una población de partículas que pueden ser diversas en cuanto a tamaño y propiedades ópticas y, si se desea, para determinar la distribución espacial de dichas partículas. Además, la capacidad de monitorizar el comportamiento dinámico de partículas suspendidas en un líquido mediante técnicas analíticas sofisticadas tales como una correlación digital u óptica de las señales que emanan de las partículas, es evaluable en cuanto a la determinación de otras propiedades y características físicas de partículas sub-micrométricas que en otro caso no podrían ser obtenibles mediante otras técnicas. Los componentes físicos con los que el aparato puede ser montado, no son complejos ni caros, y pueden ser utilizados por usuarios no expertos. El aparato se presta en sí mismo a ser acoplado retrospectivamente a una gama de instrumentos analíticos ópticos existentes y de diseños de instrumentación para mejorar la resolución y el rendimiento.

La invención va a ser descrita ahora con mayor detalle a título de ejemplo con referencia particular a los dibujos esquemáticos que se acompañan, en los que:

La Figura 1 ilustra un aparato de acuerdo con la invención, para la detección de partículas sub-micrométricas tales como virus suspendidos en un fluido acuoso;

La Figura 2 ilustra una utilización de la invención para su aplicación en una configuración citométrica de flujo;

La Figura 3 ilustra el uso del aparato para estudiar la interacción de partículas con una capa funcional depositada sobre el elemento óptico.

### Ejemplos

Con referencia a la Figura 1, el aparato conforme a la invención comprende un elemento 100 de instrumento, que tiene un substrato ópticamente transparente 1, típicamente un prisma de vidrio o de sílice, o que es plano, sobre una parte del cual se ha depositado una película delgada de metal 2, típicamente de un espesor de 30-80 nm de, por

ejemplo, oro, plata, aluminio o cromo, depositada por medio de sublimación catódica, fase de vapor, electromecánica u otros medios de deposición adecuados. El substrato óptico está cubierto solamente de forma parcial por la película metálica 2, habiéndose dejado sin recubrir una porción 3 de la superficie. Un haz de luz de colimación, intensidad, polarización y longitud de onda adecuadas, o de un rango 4 de longitud de onda, es enfocado por la lente 5 de modo que sea incidente sobre el elemento óptico de tal modo que el haz golpea la superficie del elemento óptico en la región 3 que no está cubierta con la película metálica 2, pero que es adyacente a la región metalizada formando un ángulo tal que, cuando se coloca una muestra de líquido 6 que contiene una suspensión de partículas 7 sobre la superficie del elemento óptico 100, se provoca que el haz, por refracción, se propague a través de la muestra de forma sustancialmente paralela a, y a una pequeña distancia por encima de, la película metálica. Estas partículas 7, presentes en el interior del haz, actúan individualmente para dispersar luz que puede ser detectada en el campo lejano mediante una disposición de lente 8 alineada y enfocada adecuadamente, tal como un objetivo de un microscopio, que podría ser una lente de inmersión y lentes asociadas, para ser observada posteriormente por el ojo o analizada utilizando un dispositivo fotosensible e instrumentación adecuada de procesamiento de señal o de análisis de imágenes. Alternativamente, las partículas podrían ser vistas a través de una ventana planar transparente ópticamente adecuada en, por ejemplo, una disposición de célula de flujo o a través de un cubreobjetos de microscopio o equivalente.

Se comprenderá, por supuesto, que además de la simple observación de la luz esparcida por las partículas 7, se pueden observar y analizar otras consecuencias ópticas derivadas del hecho de ser iluminadas por el haz 4 cuando se propaga cerca de la película metálica 2. Así, si la población de partículas 7 comprende completamente o parcialmente partículas que son inherentemente fluorescentes o que se han etiquetado específicamente mediante el uso de etiquetas fluorescentes seleccionadas, de modo que estas partículas que fluorescen al llegar a la proximidad cercana con la región 2 del substrato recubierta con metal e iluminada mediante el haz 4, pueden ser específicamente observadas a través del conjunto de lente 8 si la imagen es filtrada en primer lugar mediante un conjunto de filtro 9 de fluorescencia adecuada.

Se comprenderá que el uso de varios filtros de fluorescencia diferentes permitirá que se puedan analizar múltiples longitudes de onda por separado, extendiéndose la información que pueda ser obtenida en torno a una suspensión de partículas múltiplemente manchadas bajo visión.

En la Figura 2 se ha mostrado un aparato alternativo para su uso en una configuración citométrica de flujo del tipo de chorro-sobre-superficie-abierta. El elemento óptico mostrado en la Figura 1 puede estar montado de tal modo que un caudal de muestra portadora de partículas pueda hacerse fluir a través de su superficie. Cuando una corriente de fluido 13 enfocada hidrodinámicamente (una "vaina hidrodinámica") que emana desde una boquilla 14 y que contiene una corriente de partículas 15 introducida en el fluido de vaina hidrodinámica por medio del tubo 16, se hace pasar a través de la región en la que se propaga el haz óptico por encima de la región metalizada del elemento óptico 100, las partículas dirigidas mediante el ajuste fino de la boquilla 14, de modo que fluyan en relación de proximidad cercana a esta región, o bien dispersarán la luz o bien serán inducidas a fluorescencia, cuya radiación óptica es detectada, con el uso de un sistema 17 de lentes que contiene un conjunto 18 de filtro fluorescente, si se requiere, mediante un detector fotosensible adecuado y la electrónica de procesamiento de señal asociada capacitada para medir la señal óptica generada por las partículas separadas a una velocidad que permite que las partículas sean analizadas individualmente y secuencialmente a altas velocidades, típicamente de cientos o miles por segundo. El conjunto de lente 17 puede estar diseñado y construido de tal modo que uno o más de una diversidad de ángulos de luz dispersada puedan ser seleccionados a partir de la radiación dispersada o de la fluorescencia que emana de la partícula.

En la Figura 3 se ha mostrado una configuración alternativa para la detección de la interacción de partículas con una superficie funcional que comprende un elemento 100 de instrumento según se ha mostrado en la Figura 1, recubierta con una capa funcional 30 que puede comprender un material polimérico o biológico que replique sustancialmente las propiedades mostradas por una membrana o superficie de pared de una célula natural, y a partir del cual se pueda obtener información de la interacción de partículas 31 en una muestra de líquido 32, que pueden ser, por ejemplo, partículas de un virus infeccioso, acerca de la velocidad, el número y el comportamiento de eventos de unión entre las partículas y la superficie funcional. Alternativamente, la capa funcional puede comprender una capa que se ha modificado química o bioquímicamente, sobre la que se han fijado porciones moleculares químicas o biológicas tales como anticuerpos u otras estructuras selectivas de unión de ligandos que muestren una afinidad específica respecto a estructuras objetivo 31 moleculares o particuladas, cuya presencia y número, u otra propiedad, se requiere que sea establecida en relación con la muestra 32.

Al igual que en otras realizaciones descritas en lo que antecede, resulta por supuesto obvio que además de la simple observación de cambios en la luz dispersada por las partículas 31, se pueden observar y analizar otras consecuencias ópticas de su llegada a una proximidad cercana con la región de la interfaz de metal/ vidrio iluminada por el haz óptico. De ese modo, si la población de partículas 31 comprende total o parcialmente partículas que son inherentemente fluorescentes o que se han etiquetado específicamente con el uso de etiquetas fluorescentes seleccionadas, aquellas partículas que fluorescen al llegar a la proximidad cercana con la interfaz de metal/ vidrio iluminada por el haz óptico pueden ser observadas específicamente a través de la lente y del conjunto de detección si la imagen se filtra en primer lugar por medio de un filtro de fluorescencia adecuada. De forma similar, la rotación

de la polarización del haz incidente por parte de las partículas puede ser medida en esta invención.

5 Se comprenderá además que el uso de varios filtros de diferente fluorescencia permitirá que múltiples longitudes de onda sean analizadas por separado, extendiéndose la información que pueda ser obtenida en torno a una suspensión de partículas múltiplemente manchadas bajo observación.

10 En la realización preferida, el elemento óptico es un substrato planar de cuarzo silíceo, sobre el que se ha depositado mediante un procedimiento de sublimación catódica, una capa de cromo de aproximadamente 50-80 nm de espesor. El elemento óptico se ilumina con un ángulo incidente adecuado por medio de un haz láser de modesta potencia, por ejemplo de 40 mW y de una longitud de onda adecuada, por ejemplo 488 nm. Una gota de una muestra biológica, tal como una muestra de origen clínico o biológico, diluida en solución salina reguladora de fosfato que contenga una población de partículas de virus refractivas sin etiquetar de significación clínica o biotecnológica (tal como los adenovirus), se coloca sobre la superficie del elemento óptico y la luz que las partículas de virus difunden según se mueven bajo movimiento Browniano dentro del haz óptico que se propaga a través de la muestra en relación de proximidad cercana con la región metalizada del elemento óptico, es observada por el ojo con un microscopio convencional equipado con un objetivo de inmersión de x40. Las imágenes de los virus pueden ser capturadas, por supuesto, sobre una película o en grabación de video mediante instrumentos adecuados para su posterior visualización y análisis. La presencia y la concentración numérica de partículas de virus en la muestra pueden ser determinados a partir de la intensidad de la luz que las mismas dispersan (siendo la magnitud de la dispersión de luz en esta región una función importante, por ejemplo el radio, de su tamaño), o a partir del conteo del número de puntos de luz de intensidad asociada al tamaño de la partícula por unidad de volumen en la muestra para cualquier intensidad de iluminación dada.

25 Se comprenderá que, aunque esta invención se ha descrito mediante varios ejemplos, es posible realizar una diversidad de modificaciones sin apartarse por ello del alcance de las reivindicaciones anexas.

## REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un procedimiento para la detección óptica y/o el análisis de particulados sub-micrométricos, que comprende las etapas de:
- 10 i. iluminar, con un haz óptico enfocado, un sustrato (1), parte de una superficie de cuyo sustrato se ha recubierto con una película (2) que comprende un metal ópticamente opaco, y parte (3) de cuya superficie se ha dejado sin recubrir, de tal modo que la superficie tiene una porción recubierta y una porción adyacente sin recubrir, siendo el haz óptico enfocado incidente sobre el sustrato en un punto de la porción sin recubrimiento de la superficie recubierta que es adyacente a, o que cae dentro de 5 mm de, pero que no es coincidente con, la porción de la superficie recubierta con película metálica, y formando un ángulo tal que se provoca que al menos una porción del haz óptico se propague por encima de, pero paralelo o formando un ángulo menor de 5° con, la superficie de la película metálica;
- 15 ii. colocar sobre la superficie el sustrato una muestra (6) que contiene una partícula o una población de partículas (7) de dimensiones sub-micrométricas, de tal modo que las partículas entran en una región iluminada por el haz óptico que se propaga por encima de la película metálica, y
- 20 iii. detectar, mediante una lente y una disposición detectora (8) adecuadas, situadas en el campo lejano en posición normal al, o formando un ángulo grande con el, plano de la película metálica, la radiación óptica esparcida individualmente por, o que de otro modo se provoca que sea emanada desde, las partículas en virtud de su interacción con el haz óptico.
- 25 2.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que: el sustrato comprende, o está formado a partir, un material que es total o sustancialmente transparente ópticamente.
- 30 3.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que el haz óptico enfocado que es incidente sobre una superficie del sustrato, es refractado durante su paso a través del sustrato, y emerge por la superficie opuesta paralelo a, o formando un ángulo menor de 5° con, la porción recubierta de película metálica de dicha superficie.
- 35 4.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas partículas son analizadas en términos de su número, concentración, tamaño, distribución por tamaño, forma o movimiento.
- 40 5.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas partículas son analizadas en términos de la intensidad y/o longitud de onda de la radiación fluorescente u otra radiación no esparcida que las mismas emiten o que se provoca que emitan en virtud de su interacción con la radiación de iluminación.
- 45 6.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas partículas son analizadas en términos de sus propiedades de polarización o de modulación de fase.
- 50 7.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se provoca que dichas partículas entren en el volumen iluminado por el haz óptico sobre una base individual.
- 55 8.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una pluralidad de partículas están presentes simultáneamente en el haz óptico, y la señal óptica procedente de cada una de la pluralidad de partículas es diferenciada con el fin de permitir que las citadas partículas sean caracterizadas individualmente.
- 60 9.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las partículas de la muestra son etiquetadas con moléculas fluorescentes para permitir que las mismas sean distinguidas de otras partículas y/o del ruido de fondo.
- 65 10.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que al menos parte de la superficie del sustrato que va a estar en contacto con la muestra, está diversificada con una o más especies moleculares.
- 11.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la una o más especies moleculares se unen específicamente a partículas de la muestra.
- 12.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que la una o más especies moleculares comprenden moléculas de captura biológica tales como anticuerpos que se vinculan tipos específicos de partículas como una función de sus características estructurales moleculares.
- 13.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el movimiento Browniano dinámico o el comportamiento asociado a interacciones entre partículas en la muestra, se detecta y se

analiza mediante técnicas analíticas adecuadas tales como espectroscopia de fluctuación numérica, espectroscopia de correlación de fluorescencia, o mediante procedimientos de análisis de imagen para movimiento de rastreo de fuentes de señal específicas.

5 14.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las partículas detectables son parte de una estructura supramolecular más grande.

10 15.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicha estructura supramolecular es una célula o un componente celular, un biofilm, o una capa polimérica.

15 16.- Aparato para llevar a cabo el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende: un sustrato (1), del que una parte de una superficie está recubierta con una película (2) que comprende un metal ópticamente opaco, y una parte (3) de cuya superficie se ha dejado sin recubrir, de tal modo que la superficie tiene una porción recubierta y una porción adyacente sin recubrir; medios (4, 5) para iluminar dicho sustrato con un haz óptico enfocado, comprendiendo dichos medios una fuente de iluminación óptica, de tal modo que el haz óptico es incidente sobre el sustrato en un punto sobre la porción sin recubrimiento de la superficie recubierta que es adyacente a, o que cae dentro de 5 mm de, pero no es coincidente con, la porción recubierta de película metálica de la superficie, y que forma un ángulo tal que se provoca que el haz óptico se propague por encima de, pero paralelo o formando un ángulo menor de 5° con, la superficie de la película metálica; y un detector (8) situado en el campo lejano para detectar la radiación óptica esparcida por, o que se provoca de otro modo que emane desde, la partícula a través de su interacción con el haz óptico.

20 17.- Aparato de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la fuente es un láser.

25 18.- Aparato de acuerdo con la reivindicación 16 ó 17, en el que el detector comprende un microscopio convencional.

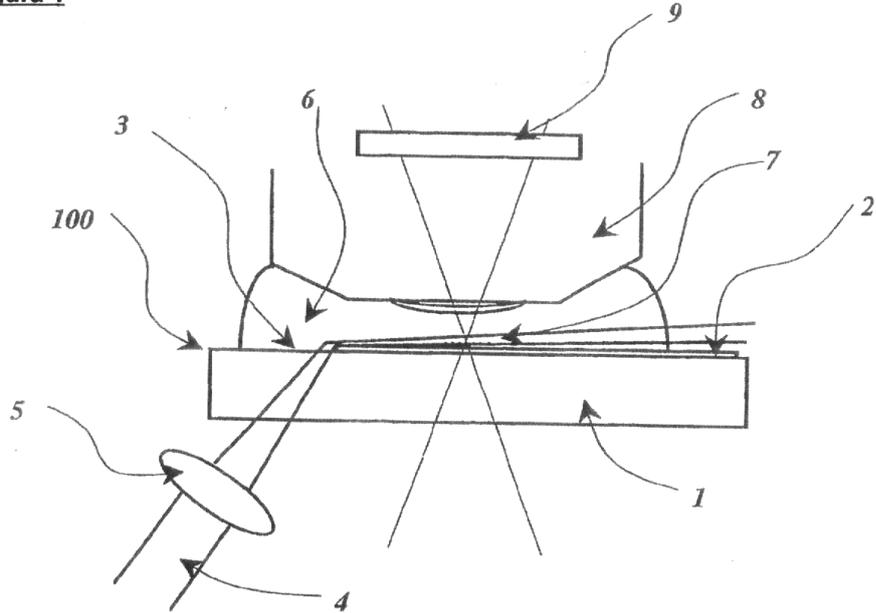
19.- Aparato de acuerdo con la reivindicación 16 ó 17, en combinación con un instrumento citómetro de flujo.

30 20.- Aparato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que el sustrato comprende, o está formado a partir de, un material total o sustancialmente transparente.

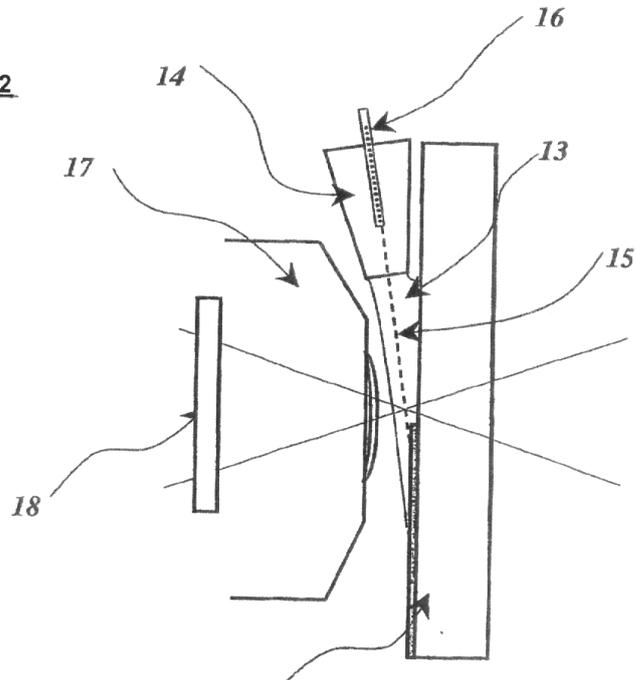
35 21.- Aparato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16-20, en el que el haz óptico enfocado que es incidente sobre una superficie del sustrato, es refractado durante su paso a través del sustrato, y emerge por la superficie opuesta paralelo a, o formando un ángulo menor de 5° con, la porción de dicha superficie recubierta con película metálica.

40 22.- Un microscopio o un citómetro de flujo que comprende un aparato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16-21.

**Figura 1**



**Figura 2**



**Figura 3**

