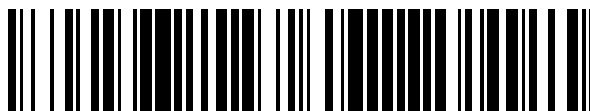


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 647**

51 Int. Cl.:
G01N 21/59 (2006.01)
G01N 15/06 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)
G01P 13/00 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)
B01L 3/02 (2006.01)
G01N 21/03 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01936762 .2**
96 Fecha de presentación: **24.05.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1395810**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.03.2004**

54 Título: **DISPOSITIVO DE TOMA DE MUESTRAS PARA ANALIZAR ÓPTICAMENTE SEMEN.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.11.2011

73 Titular/es:
M.E.S. MEDICAL ELECTRONIC SYSTEMS LTD.
ALON HATAVOR 20, INDUSTRIAL PARK
38900 CAESAREA, IL

72 Inventor/es:
KISLEV, Abe y
RABINOVITCH, Lev

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 368 647 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 de toma de muestras para analizar ópticamente semen

Campo de la invención

Esta invención se refiere a análisis del semen.

5 **Antecedentes de la invención**

De acuerdo con las estadísticas de la OMS, del 8 al 10% de todas las parejas matrimoniales consultan a profesionales médicos después de no conseguir concebir. Más de 40 millones de parejas están actualmente tratándose de esterilidad. Entre estas parejas estériles, se estima que la esterilidad en el 40% de las parejas se debe a causas que tienen su origen en el varón, y el otro 20% se debe a causas que tienen su origen en el varón y en la mujer combinados. El análisis del semen es una técnica principal en evaluar las causas que tienen su origen en el varón.

El protocolo estándar de análisis del semen implica la determinación de al menos tres parámetros de semen principales:

1. concentración total de esperma (TSC);
- 15 2. porcentaje de esperma móvil; y
3. porcentaje de morfologías espermáticas normales.

Para todos los propósitos prácticos, el análisis de semen, un factor clave en medicina de esterilidad masculina humana, no se ha cambiado desde los años 30 y se hace aún hoy por inspección microscópica. En realidad, es uno de los muy pocos análisis de fluidos corporales *in vitro* que quedan que se llevan a cabo aún casi solamente por medio de procedimientos manuales.

Esta metodología manual implica observar cuidadosamente las células espermáticas, contarlas para determinar su concentración, clasificar su motilidad, identificar su morfología, etc.. Este trabajo requiere conocimientos sumamente especializados, es labor muy intensiva y si se hace de acuerdo con procedimientos estándar, lleva al menos una hora por prueba.

25 Las evaluaciones manuales se conocen por ser bastante inseguras debido a numerosas fuentes de error. Las principales fuentes de error son:

- Subjetividad del observador.
- Los criterios variantes usados en los diferentes laboratorios y por diferentes observadores.
- Los grandes errores estadísticos debidos al número limitado de esperma analizado.

30 El manual de la OMS (WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4ª edición, Cambridge University Press, 1999) recomienda observar no menos de 200 espermatozoides y clasificar la morfología y motilidad de cada uno. Esto en sí mismo es un procedimiento que introduce errores debido a la monotonía y a la naturaleza consumidora de tiempo de la tarea. En la práctica, se analizan como máximo de 50 a 100 células espermáticas. Incluso si el observador no introduce errores, el error estadístico solo alcanza decenas de porcentajes.

40 Como resultado de la metodología anterior, se reconoce globalmente que las pruebas de análisis de semen son altamente subjetivas, inseguras y pobremente reproducibles. Las variaciones entre laboratorios y entre técnicos son de tales proporciones que esta cuestión es de fuente de preocupación principal en la medicina de fertilidad masculina y el asunto no resuelto de discusión en la amplia mayoría de los simposios, congresos y convenciones sobre el asunto.

45 Con el fin de superar estas dificultades, las compañías de instrumentación médica han introducido sistemas computerizados dedicados basados en análisis de imágenes (ASAC - Analizadores de Semen Ayudados por Computador). Estos sistemas requieren una imagen de calidad extremadamente alta debido a que todos sus resultados se basan en procesamiento de imágenes. Aunque estos sistemas han intentado reemplazar el análisis manual y establecer estándares aceptados por la industria, no han tenido éxito en ninguno de estos objetivos.

El primer objetivo no pudo lograrse debido a que los resultados del análisis continúan siendo dependientes de ajustes manuales y debido a las diferentes marcas del equipo. Reemplazar el análisis manual de rutina es totalmente impracticable debido a que los sistemas son extremadamente caros, complejos y difíciles de usar. El hecho es que tales sistemas no se encuentran generalmente en análisis de semen de rutina pero han establecido

más su hueco casi únicamente en centros de investigación, hospitales universitarios y ocasionalmente en centros de fertilidad altamente especializados.

Un enfoque adicional para las medidas de semen se describe en las Patentes de los Estados Unidos Números 4,176,953 y 4,197,450, cuyo contenido total se incorpora en el presente documento. Estas patentes describirán un procedimiento para medir motilidad de los espermatozoides utilizando medios electro-ópticos y un analizador de señales analógico. Una suspensión de células espermáticas se examinó continuamente en un campo predeterminado con el fin de detectar variaciones en densidad óptica por el movimiento de los espermatozoides. Una señal eléctrica analógica modulada en su amplitud se genera en respuesta a las variaciones y los picos y valles de esta señal se cuentan durante un periodo de tiempo predeterminado para proporcionar un parámetro abstracto llamado Índice de Motilidad Espermática (IME). Este parámetro está relacionado con la motilidad y da lecturas que son proporcionales al número de células móviles multiplicadas por su velocidad respectiva.

Un analizador del esperma automático llamado el Analizador de Calidad del Esperma (ACE), que proporciona el parámetro IME, ha estado en el mercado durante un cierto número de años. El analizador se usa de la siguiente manera: un espécimen de esperma se lleva por una cámara desechable que tiene un bulbo de caucho en un extremo para aspirar la muestra y un compartimento de medición estrecho en el otro extremo. Después de aspirar la muestra, el compartimento de medición se inserta dentro del ACE y el IME de la muestra se determina automáticamente. El parámetro IME, aunque útil en algunas aplicaciones, no se aceptó significativamente por la comunidad médica como una alternativa viable a las medidas del semen microscópicas convencionales.

Es conocimiento común que en algunos campos del análisis de fertilidad veterinario, la concentración total de esperma (CTE) se evalúa midiendo la turbidez del espécimen. El principio físico detrás de este enfoque es que las células espermáticas son más opacas que el plasma seminal circundante y la absorción de un haz de luz por el espécimen es por lo tanto proporcional a la CTE.

Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N.º 4,632,562 revela un procedimiento de medir densidad espermática midiendo la absorbancia óptica de una muestra que contiene esperma y relacionando la señal de salida de absorbancia con la densidad usando al menos tres canales sumadores. El procedimiento revelado se desea para usar en la inseminación artificial en la industria de cría de ganado y mide la absorbancia óptica en el intervalo de 400-700 nm.

Esta tecnología sin embargo, no se ha adoptado y podría no adoptarse para uso humano por las siguientes razones:

(1) Las concentraciones de espermatozoides humanos en el intervalo normal (e incluso en la mayoría de los casos normales), son más de un orden de magnitud inferiores que en la mayoría de sus homólogos veterinarios -donde se ha adoptado esta tecnología.

(2) Los casos humanos se tratan incluso cuando las concentraciones de espermatozoides están muy por debajo de sus niveles normales. Éste por supuesto no es el caso de los animales. Los animales estériles normalmente se sacrifican selectivamente en cualquier caso, no se tratan de esterilidad.

(3) La CTE en humanos es un parámetro, que en sí mismo, es totalmente insuficiente para investigaciones de fertilidad y el análisis microscópico se requiere en cualquier caso para todos los otros datos en el protocolo de análisis de semen estándar. En un amplio grado, esto también se mantiene para aplicaciones veterinarias. Este hecho hace las medidas de absorción óptica superfluas y no se ha invertido un esfuerzo real en este campo.

Hay por lo tanto una necesidad de una técnica simple, objetiva para medir CTE en semen humano.

De acuerdo con el manual de la OMS, la evaluación de motilidad espermática (considerada por la mayoría el parámetro seminal más importante) se puede llevar a cabo manualmente usando un sistema de cuadrícula bajo el microscopio o, alternativamente, para uso de ASAC.

ASAC proporcionan algunas ventajas sobre procedimientos manuales. Sin embargo, la exactitud y el suministro de datos cuantitativos son totalmente dependientes de las técnicas de preparación de semen precisas y ajustes de instrumentos. Estos factores (conocimientos sumamente especializados y ambiente sofisticado) junto con el coste prohibitivo de instrumentación, descartan para todos los propósitos prácticos su aplicación para análisis de semen de rutina.

La Patente de los Estados Unidos N.º 4,896,966 describe un escáner de movilidad para determinar el movimiento del esperma, las bacterias y las partículas en fluido. El escáner comprende un sistema óptico que incluye una lente alineada de forma exacta, lente condensadora, lente de formación de imágenes y un par de elementos reflectantes, una fuente de iluminación, medios que perciben radiación, medios que procesan señales y medios de exposición. La lente de formación de imágenes tiene una profundidad de campo útil en su plano objetivo de al menos aproximadamente 0,2 mm.

La Memoria de Patente de los Estados Unidos N.º US-A-4,330,206 revela una cubeta o construcción de celda que está especialmente adaptada para permitir la medida de fotómetro o similar de fluidos de muestra admitida a la

cámara de medición de la celda. La construcción es aplicable a análisis de fluido bien según la condición de un fluido continuo de fluido de espécimen, o bien según la condición de que una muestra pequeña individual se ha inducido al vacío dentro de la cámara de medición.

- 5 La Memoria de Patente Alemana de N.º DE 34 23 471 A revela un fotómetro para análisis continuo de un medio (gas o líquido) constituido por una pluralidad de componentes, en la que en el fotómetro, la luz de dos longitudes de onda se genera por dos lámparas que tienen filtros de interferencia anteriormente en el procedimiento, un espejo inclinado semirreflector, un lente de alineación exacta y una parada que detiene la apertura. Los elementos están unidos para formar una unidad compacta.

Sumario de la invención

- 10 Es un objetivo de la presente invención proporcionar un dispositivo de toma de muestras para usar en la determinación de los parámetros seminales.

De acuerdo con la invención se proporciona un dispositivo de toma de muestras como se especifica en la reivindicación 1.

Se describe adicionalmente un sistema para la determinación de parámetros seminales.

- 15 Se describe adicionalmente en el presente documento un procedimiento para medir la concentración total de espermatozoides (CTE) en una muestra. El procedimiento comprende (i) colocar la muestra en un recipiente transparente entre una fuente de luz sincrónicamente pulsada y un fotodetector; y (ii) medir la absorbancia óptica de la muestra en el intervalo de 800-1000 nm, siendo el TSC de la muestra proporcional a la absorbancia.

- 20 El procedimiento proporciona en el presente documento una medida objetivo de CTE que no es dependiente de análisis de imagen y que puede medir CTE humana. Sin embargo, el procedimiento puede utilizarse también para medir CTE de animales.

- 25 El dispositivo de toma de muestras de la invención es para usar en analizar ópticamente un fluido biológico, que es semen, más preferentemente semen humano. El dispositivo sirve tanto como un recogedor de muestras como como una cámara de prueba dual, permitiendo la realización de pruebas simultáneas de CTE y de CEM. No se requiere dilución para cualquiera de las medidas. Esto no sólo ahorra trabajo sino que también elimina una fuente significativa de errores -a saber, inexactitud de dilución.

El dispositivo también permite (cuando se requieran) visualizaciones incorporadas del espécimen sin transferirlo a una cámara de visualización separada. La cámara gruesa se refiere también como un densitómetro óptico.

- 30 También se describe en el presente documento un procedimiento para medir concentración de espermatozoides móviles (CEM) en una muestra de semen que comprende:

(i) colocar la muestra en un contenedor transparente entre una fuente de luz y un fotodetector, en el que el movimiento de los espermatozoides en la muestra modula la luz transmitida a través, generando por lo tanto una señal;

(ii) tomar muestras de la señal tal como para producir una diversidad de muestras de señal;

- 35 (iii) seleccionar señales aceptables;

(iv) calcular un valor absoluto para cada una de las muestras de señal aceptables;

(v) calcular un promedio a de los valores absolutos; y

(vi) calcular la CEM en base a un promedio a.

- 40 Se ha descubierto ahora que el análisis de las formas de onda de las señales análogas derivadas de un haz de luz que atraviesa una muestra de semen pueden proporcionar una indicación de la CEM. Usando apropiadamente los criterios seleccionados, se encuentra que existe correlación excelente entre el área promediada cubierta por la forma de onda y la CEM. La CEM de una muestra de esperma se obtiene analizando las propiedades ópticas de la muestra, que varían a lo largo del tiempo debido a la motilidad del esperma. Esto es, de hecho, la amplitud de señal inicial en las partes relevantes de la longitud de onda como se describirá en más detalle a continuación.

- 45 Se describe en el presente documento adicionalmente un procedimiento de determinar la velocidad promedio (VP) de las células espermáticas que comprende:

(i) obtener un Índice de Motilidad Espermática (IME) de las células espermáticas en la Patente de los Estados Unidos N.º 4,176,953;

(ii) obtener la CEM; y

(iii) calcular VP usando una expresión algebraica que implica la relación IME/CEM.

Se hace referencia aquí a la Patente de los Estados Unidos N.º 4,176,953 publicada el 4 de diciembre de 1979 y que se implementó en diversas versiones de Analizadores de Calidad Espermática producidos por Medical Electronic Systems, Israel. Esta patente, cuando se aplica a análisis de semen, proporciona un parámetro llamado IME (Insuficiencia de Motilidad del Esperma). Como se describe en la patente anterior y se demuestra en numerosos estudios que dan respaldo, el IME es una función tanto de la concentración de células móviles (que se refiere como CEM) como de su velocidad promedio (VP). Por motivos de simplificación, podemos decir que el IME es una función de CEM x VP, o la VP es una función de IME/CEM. La velocidad promedio de una muestra de esperma puede proporcionar una indicación de la calidad de la motilidad del esperma.

Sin oponerse a lo que se ha establecido anteriormente, el IME como una función de CEM y VP es más compleja que una multiplicación directa. Después de observar, analizar y medir en un centenar de muestras de semen, se ha desarrollado la interrelación correcta (fórmula) entre ellas. En términos generales, la fórmula para extraer la velocidad promedio se puede definir como: $VP = f(IME/CEM)$, siendo "f", un polinomio del tercer grado. Trabajar con $f(x) = 1/1000x^3 + 1/10x^2 + 0,89x$, proporcionó un factor de correlación de $r = 0,82$.

Se debería tener en cuenta que la mayoría de los protocolos de análisis de semen requieren datos sobre el porcentaje de esperma que tiene motilidad progresiva más que sobre su velocidad promedio. Motilidad progresiva se define como aquellos espermatozoides que tienen una velocidad promedio de 5 micrómetros/segundo o más. Este parámetro también, puede extraerse fácilmente de la velocidad promedio si se asume una dispersión normal de velocidades alrededor del promedio. Incluso en casos donde la dispersión de velocidades no es normal, el error en calcular el porcentaje de espermatozoides móviles progresivamente no se ve afectado significativamente. Además, cuando diferentes velocidades mínimas se definen como progresivamente móviles, este umbral que varía se introduce fácilmente en el cálculo, dando por lo tanto flexibilidad extra en proporcionar este parámetro. Esto es importante cuando se trabaja en diferentes medios de dilución, temperaturas ambiente o de hecho en diferentes especies en medidas veterinarias.

También se describe en el presente documento un sistema para analizar viabilidad espermática que comprende:

- (i) medios para medir CET;
- (ii) medios para medir CEM; y
- (iii) un sistema de visualización en vídeo.

El sistema en el presente documento combina la medida de los dos parámetros de espermatozoides principales CET y CEM, con la visualización tradicional del esperma, permitiendo adquirir así el tercer parámetro -morfología del esperma. El sistema puede comprender adicionalmente el dispositivo de toma de muestras de la invención.

Se debería resaltar que hay una diferencia básica entre el sistema de visualización de vídeo usado en el sistema en el presente documento y otros sistemas de visualización de esperma (tales como ASAC). Los otros sistemas requieren imágenes de calidad extremadamente alta debido a que sus resultados se construyen en procesamiento de imágenes. En el sistema en el presente documento, por otro lado, la visualización se usa sólo como un instrumento complementario para ver casos atípicos o sospechosos, para identificar patologías específicas y para permitir evaluación de morfología espermática manual, cuando se requiera.

Con el fin de cumplir estas tareas, el sistema de visualización de vídeo usado en el presente documento se diseña como un subsistema compacto, económico, que aunque de uso limitado como un sistema independiente, cumple con precisión un papel complementario en el sistema de la invención. Una ventaja importante adicional del sistema de visualización como se compara con los procedimientos microscópicos, es que el pipeteo, la preparación de portaobjetos, las diluciones y la carga de hemocitómetros son innecesarios. El uso, conjuntamente con el sistema de visualización de vídeo, del dispositivo de la invención, que duplica según una cámara de prueba completa, obvia todo lo anterior. Estas características, en efecto permiten y hacen posible el uso del sistema en el presente documento en cualquier clínica pequeña o incluso en cualquier ambiente de oficina.

El sistema de visualización en vídeo permite a alguien obtener información suplementaria con respecto a la muestra probada:

1. Medida de concentraciones de espermatozoides muy bajas

Medir CET a concentraciones muy bajas (por debajo de 5 millones de espermatozoides/ml) está inherentemente limitado en exactitud. Esto es debido al hecho de que la absorción de la luz por factores distintos de las células espermáticas, puede llegar a ser relativamente significativo a estos niveles bajos. La absorción de la luz se puede deber a la variabilidad de plasma seminal o a la presencia de células diferentes del espermatozoide. Las últimas incluyen GBS (glóbulos blancos de la sangre que indican infecciones) y otras células inmaduras o no espermáticas de diversas fuentes, etc. Dado que de acuerdo con la invención CET se mide por absorción óptica, sin visualización habría una posibilidad de ambigüedad en los intervalos más bajos debido a las consideraciones anteriormente

mencionadas. Cuando CET se considera importante en los intervalos bajos, la visualización permite diferenciación entre las células diferentes contribuyendo a la absorción de la luz. Dado que la CEM se mide independientemente de la absorción de la luz, el porcentaje de motilidad (CEM/CET) se puede calcular usando el parámetro de CET determinado visualmente.

5 2. Identificar células extrañas en el semen

El sistema es útil en identificar la presencia de otras células que pueden tener un efecto en la calidad del semen y/o ayudar en diagnosticar dolencia del paciente. Por ejemplo, los leucocitos indican infección, las células inmaduras indican un problema en espermatogénesis, la aglutinación se puede deber a una serie de causas, etc.

3. Valoración de la morfología de espermatozoides manual

10 Aunque el sistema en el presente documento evalúa en el presente documento el porcentaje de espermatozoides con morfologías normales, se hace de acuerdo con criterios dados (por ejemplo, los criterios de la OMS). Tristemente estos criterios no están universalmente aceptados. Tales criterios universalmente aceptados no existen aún y son frecuentemente un factor de aplicación. Por ejemplo, los criterios de morfología para FIV y solicitudes ICSI son normalmente más estrictos que en casos normales. Otros estándares internacionales (tales como criterios estrictos o de Krueger) se aplican también ampliamente. La visualización permite al práctico médico de fertilidad seleccionar sus propios criterios así como identificar los defectos específicos presentes (deformidad de la cabeza, problema de la cola, etc.).

4. Validación de la vasectomía y diagnosis de azoospermia

20 Con el fin de validar totalmente el resultado de la vasectomía o para obtener un diagnóstico concluyente de azoospermia, es necesario determinar que no existe absolutamente ningún espermatozoide en el semen después de la evaluación. Este generalmente no es posible con la tecnología de absorción de la luz, debido a que las concentraciones que se miden pueden ser muy bajas. En este caso, la visualización manual es necesaria con el fin de explorar cuidadosamente grandes campos de visión en busca de células espermáticas duales. El sistema de visualización de espermatozoides usados en el sistema en el presente documento está específicamente hecho a medida para dirigir estas aplicaciones de forma óptima.

5. Copia dura

30 El sistema de visualización de vídeo permite "congelar" una vista seleccionada dada (o pocas vistas seleccionadas dadas) que pueden imprimirse y adjuntarse al Comunicado de Análisis Seminal. Esto es de gran valor para consultas y para validación de eficacia de tratamiento. Un subproducto de la opción de congelación es visionar la muestra de semen según condiciones estáticas. Esto facilita fuertemente el análisis y el conteo. En las evaluaciones microscópicas, esto sólo puede hacerse desmovilizando (matando) el espermatozoide antes de visionarlo. Incluso entonces, todo el esperma muerto terminará en una capa, una condición que normalmente complica el análisis debido a la alta concentración y al solapamiento de espermatozoides en la citada capa.

Breve descripción de los dibujos

35 Con el fin de entender la invención y para ver cómo puede llevarse a cabo en la práctica, las realizaciones preferidas se describirán ahora, a modo de ejemplos no limitantes sólo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

Fig. 1 es diagrama de bloques que ilustra un procedimiento de medir la CET;

Fig. 2 es una vista superior en perspectiva de una realización de un dispositivo de muestra de acuerdo con la invención; **Fig. 3** es una vista en sección lateral del dispositivo de la Fig. 2;

40 **Fig. 4** es una vista en sección lateral de la válvula separadora rotada 90° a partir de la vista de la Fig. 3;

Fig. 5 es una ilustración esquemática de un sistema para análisis de semen;

Fig. 6 es un diagrama de flujo que ilustra un algoritmo para calcular el CEM;

Fig. 7 es un diagrama de flujo que ilustra un algoritmo para determinar la velocidad promedio;

Fig. 8 ilustra una señal análoga típica de esperma móvil como una función del tiempo;

45 **Fig. 9** es una curva de correlación de la CEM con señal analógica promedio; y

Fig. 10 es un diagrama de bloques que ilustra un sistema de visualización de vídeo.

Descripción detallada de la invención**Ejemplo 1(Ejemplo de Referencia)**

Como se estableció anteriormente, la medición óptica automática de CET en muestras de semen humano a diferencia de las muestras animales ha estado entorpecida en el pasado debido a la baja concentración de células espermáticas. Esto, conjuntamente con el alto ruido electrónico y óptico de fondo debido por ejemplo a la variabilidad del plasma seminal ha impedido la aplicación de procedimientos usados rutinariamente en análisis de fertilidad veterinaria. El procedimiento en el presente documento viene a superar estos obstáculos combinando las siguientes características:

(i) la muestra se sitúa en un recipiente transparente entre una fuente de luz pulsada sincrónicamente y un fotodetector habilitado sincrónicamente. El uso de una fuente de luz que emite pulsos sincrónicamente y de fotodetector permite la distinción de células espermáticas a concentraciones bajas por encima de los niveles de ruido electrónico.

(ii) medir la absorbancia óptica de la muestra en el intervalo de 800-1000 nm. Se ha hallado que medir la absorbancia en la región del infrarrojo próximo proporciona las condiciones óptimas para obtener absorción fuerte por células espermáticas y absorción baja por plasma seminal. Preferentemente el intervalo medido es 850-950 nm. Lo más preferentemente, el intervalo es 880-900 nm.

Usando el procedimiento del presente documento la CET de una muestra puede determinarse como una función de la absorbancia. Aunque el procedimiento en el presente documento se usa preferentemente con muestras de semen humano o esperma humano, puede usarse también con semen de animal y con esperma de animal, preferentemente después de dilución apropiada.

Un ejemplo de un sistema óptico usando el procedimiento del presente documento se ilustra en la Fig. 1. El sistema, indicado generalmente por el número **2**, comprende una fuente de luz **4**, un fotodetector **6** y un soporte de muestra **8** interpuesto entre ellos. Una fuente de luz preferida puede ser un diodo de emisión de luz (LED) emitida a pulsos sincrónicamente de conmutación rápida que emite luz en la región del infrarrojo cercano. La fuente de luz puede controlarse por un controlador de intensidad lumínica **10** que a su vez está regulado por un modulador **12**. El fotodetector es capaz de detectar luz emitida a pulsos sincrónicamente. El fotodetector transmite las señales analógicas medidas a un desmodulador **14**, que también está regulado por el modulador **12** y de ahí a la salida **16** de la señal en forma digital.

El camino del haz a través de la muestra es preferentemente vertical. La longitud del camino del haz a través de la muestra está generalmente entre 5 y 15 mm, preferentemente 10 mm. El soporte de muestra debe ser totalmente transparente a las ondas lumínicas en la región del infrarrojo cercano de entre 800 y 1000 nm. El material de plástico del que está hecho el soporte de muestra debe ser totalmente no tóxico para células espermáticas. Un material preferido es un poliestireno PG-79. El soporte de muestra debería diseñarse preferentemente para evitar totalmente penetración y formación de burbujas de aire en la muestra, que interfieran con la medida óptica.

Usando el procedimiento del presente documento, los niveles de detección de CET bajan hasta que aproximadamente se han alcanzado 2 millones de células/ml. Este nivel ya indica patología seminal extrema.

Ejemplo 2

La Fig. 2 ilustra una realización de un dispositivo de toma de muestras **20** de acuerdo con la invención, para usar en medir semen. El dispositivo comprende una sección de contemplación óptica anterior **22**, una sección de aspiración posterior **24** y una sección de exclusión de aire intermedia **26**.

La sección de contemplación óptica **22** comprende una cámara de medición fina **28** y una cámara de medición gruesa **30**. La cámara fina se usa midiendo la CEM y/o para visualización, mientras que la cámara gruesa se usa midiendo la CET. De este modo, los parámetros múltiples pueden medirse simultáneamente usando el mismo dispositivo de toma de muestras y la misma etapa de toma de muestras.

La sección de aspiración **24** comprende un cilindro **32** y un émbolo **34** insertado de forma deslizante en él. Estas partes se emparejan entre sí y funcionan como en una jeringuilla estándar. Esta sección sirve para la aspiración de la muestra de semen dentro de las cámaras de medición.

La sección de exclusión de aire **26** comprende una válvula separadora **36** para la separación de las cámaras de medición del volumen del cilindro después de cargar. El aspirador, la cámara de medición fina, la cámara de medición gruesa y la sección de exclusión de aire están todas en comunicación fluida.

Un adaptador **38** en forma de un carril rectangular se extiende a lo largo de una cara del dispositivo **20** y sirve para el deslizamiento correcto en y para el alineamiento del dispositivo después de la inserción en un instrumento óptico por el que la muestra se evalúa. Ello también proporciona el soporte mecánico y la estabilidad requerida para medidas con precisión electro-óptica.

Las partes del dispositivo pueden observarse más claramente en la Fig. 3. La cámara de medición fina **28** es una cavidad externa que tiene una pared transparente paralela superior **40** y una inferior **42** a través de la que puede pasar el haz de luz óptica. La distancia entre las paredes está en el intervalo de los 100-500 micrómetros, preferentemente 250-350 micrómetros, lo más preferentemente aproximadamente 300 micrómetros. En el último caso, el volumen de líquido en la cámara es aproximadamente 25 µl. El extremo anterior **44** de la cámara tiene una abertura a través de la que la muestra puede arrastrarse dentro del dispositivo. En la representación ilustrada, la cámara es de aproximadamente 4 mm de ancho.

La cámara de medición fina sirve para la evaluación de la motilidad de los espermatozoides y puede situarse entre una fuente de luz por ejemplo enfrente de la pared inferior **42** y un fotodetector por ejemplo enfrente de la pared superior **40**. Se entenderá que la fuente de luz y el fotodetector pueden situarse también en los lados opuestos de la cámara. Se transmite un haz de luz a través de la cámara que contiene una muestra de semen. El detector en la otra cara del cuarto registra variaciones de densidad óptica causadas por las células espermáticas en movimiento. Las variaciones de densidad óptica se traducen en una señal eléctrica por el fotodetector que se envía a los circuitos electrónicos filtrándose, digitalizándose y procesándose de tal forma que indique la CEM. La cámara de medición estrecha se puede usar también con un sistema de visualización en vídeo, como se explicará más adelante.

La cámara de medición gruesa **30** tiene una pared superior **46** y una pared inferior **48** transparentes a través de las que puede pasar un haz óptico. La distancia entre las paredes está en el intervalo de 0,5-3 cm, preferentemente 0,8-1,2 cm, lo más preferentemente aproximadamente 1 cm. El volumen aproximado mantenido por el compartimento grueso en el último caso sería aproximadamente 0,5 ml.

Esta cámara sirve para medidas de absorción electro-óptica de concentración de espermatozoides. Un haz de luz, que puede ser el mismo o diferente de aquel de la cámara fina **28**, se transmite a través de las paredes superior e inferior de la cámara y se detecta por un fotodetector. El volumen de la cámara se rellenaría completamente con una muestra de esperma con el fin de evitar inexactitudes debidas a burbujas de aire. La atenuación del haz de luz según se hace pasar a través de la cámara es proporcional a la concentración de espermatozoides. La intensidad del haz de luz se mide después de pasar a través de la cámara y de traducir a unidades de CET por medios electrónicos. El orden de las cámaras en el dispositivo de toma de muestras se puede intercambiar.

El cilindro **32** está en comunicación fluidica con las dos cámaras de medición **28** y **30**, de tal manera que tirando del émbolo **34**, el fluido se extrae de las cámaras. Este procedimiento de aspiración permite que se aspiren grandes volúmenes de muestra dentro del dispositivo. Con el fin de evitar que queden burbujas de aire en las cámaras de medición, se interpone una válvula separadora **36** entre el cilindro y las cámaras de medición y está en comunicación fluida con ellas. La válvula se muestra en detalle en la Fig. 4 y comprende un pistón **50** mantenido de forma deslizante en un alojamiento de válvula **52**. Un taladro de conexión **54** que realiza conexión entre la cámara de medición **30** y el cilindro **32** pasa a través del pistón **50**.

Cuando la válvula está en la posición superior, hay una conexión entre las cámaras de medición y el cilindro que aspira. Presionar la válvula hacia abajo rompe la conexión y asegura que no queda aire en las cámaras de medición donde las muestras se miden y donde no tiene lugar escape incluso cuando hay una variación de temperatura. Esta técnica es equivalente a desplazamiento positivo dado que el aire se excluye de los volúmenes de fluido medidos (salvo en el extremo anterior **44**). Este diseño permita trabajar con muestras de virtualmente todas las viscosidades, mientras que al mismo tiempo evita escape y la penetración de burbujas de aire dentro de los volúmenes de especímenes a analizarse.

Aunque los medios para excluir aire de las cámaras de medición se han ejemplificado por una válvula separadora, se pueden usar otros medios, tales como una pipeta de desplazamiento positivo.

Todas las partes del dispositivo se pueden elaborar a partir de un material que no es tóxico para las células medidas. Preferentemente, el material es relativamente barato, tal como materiales plásticos, de modo que el dispositivo puede estar disponible. Un ejemplo de un polímero que puede usarse para producir el dispositivo es poliestireno PG79. La válvula separadora, el cilindro y el pistón se pueden fabricar de polipropileno. El compartimento de medición es por ahora la parte más sensible del dispositivo debido al área más alta para la proporción de volumen del líquido seminal en esa sección.

Con el fin de aspirar una muestra dentro del dispositivo **20**, la punta **44** del compartimento de medición fino **28** se mete aproximadamente 5 mm de profundidad en la muestra de semen, que se aspira después dentro del dispositivo pasada la válvula separadora **36**. Sólo se requieren aproximadamente 0,6 cc para una carga completa del dispositivo. La válvula separadora se empuja hacia abajo después y el dispositivo se puede insertar dentro de un aparato medidor óptico.

Ejemplo 3 (Ejemplo de Referencia)

Como se menciona anteriormente, la determinación de la CEM requiere la generación de una señal de voltaje que es proporcional a la CEM. La Fig. 5 muestra una realización de un sistema para análisis de semen capaz de generar una señal tal.

Un capilar óptico **100** que tiene una sección transversal rectangular se usa sosteniendo una muestra de semen **102**. El capilar **100** se ilumina con un haz de luz **105** producido por una fuente de luz **110**. El capilar **100** tiene un trayecto óptico de 300 µm a través del que pasa el haz de luz **105**. Después de pasar a través del capilar, el haz dispersado **106** está alineado exactamente por una abertura redonda **108** que tiene un diámetro de 70 µm. El haz alineado exactamente **107** incide sobre un fotodetector **115**. El fotodetector **115** produce una señal de voltaje analógica **120** proporcional a la intensidad del haz **107**. La señal analógica varía en el tiempo debido a la motilidad del esperma en la muestra de semen **102**, como se muestra por ejemplo en la Fig. 8. La señal analógica **120** se introduce a un conversor analógico a digital **125** que muestrea la señal analógica **120** a una velocidad de por ejemplo 8000 Hz y genera una señal de salida digital **128**. La señal de salida digital puede almacenarse en una memoria **130**. El movimiento del esperma en la muestra **102** conduce a una modulación en la intensidad del haz **107**, que a su vez afecta a la señal analógica **120** y a la señal digital **128**.

Se configura un procesador **135** para llevar a cabo un análisis de los datos almacenados en la memoria **130** con el fin de producir un análisis de la muestra de semen **102**. Los resultados del análisis pueden presentarse en cualquier dispositivo de presentación tal como una pantalla de rayos catódicos **140** de un ordenador personal **145**, o en una pantalla de cristal líquido **148** del dispositivo medidor.

La Fig. 6 muestra un diagrama de flujo para un algoritmo para calcular la CEM como se lleva a cabo por ejemplo por el procesador **135** de la Fig. 5, de conformidad con la invención.

En la etapa **200**, la señal digital **128** de la Fig. 5 se filtra digitalmente con el fin de eliminar las frecuencias altas y bajas que no son adecuadas para la frecuencia dominante de la señal, que se determina por las características de motilidad de la muestra de semen **102**. Esto se hace con el fin de optimizar la señal a la proporción de ruido. El componente DC de la señal **128** también se elimina. Para muestras de esperma humano, la velocidad de frecuencia relevante óptima que encontró que está entre 5 y 30 Hz. En la etapa **205**, se excluyen las muestras digitales que tienen un valor absoluto por debajo de un primer umbral predeterminado, que se puede determinar empíricamente. En la etapa **210** el mismo valor umbral se sustrae de todas las muestras que quedan.

En la etapa **215**, se lleva a cabo un procedimiento de selección en forma de onda descartando todas las formas de onda debidas a artefactos tales como de células no relevantes, etc. Una selección de forma de onda preferida con el esperma humano es eliminar todas las formas de onda que no satisfacen los siguientes criterios:

altura mínima - 10 milivoltios.

anchura mínima - 37,5 milisegundos.

anchura máxima - 500 milisegundos.

tiempo mínimo de aumento/caída - 2,5 milisegundos.

La definición correcta (y la detección correcta) del principio y del final de las formas de onda asociadas a espermatozoides son aquellas donde tienen lugar cambios definitivos en la dirección de la longitud de onda. La diferencia de tiempo entre dos puntos tales define la amplitud temporal de una onda dada. La forma de selección puede entenderse a modo de ejemplo con referencia a la Fig. 8 (no dibujada a escala), que muestra la amplitud de la señal análoga (**120** en Fig. 5) como una función del tiempo. El umbral **302** se determina empíricamente proporcionando linealidad óptima entre la señal de salida y la CEM medida microscópicamente. Las formas de longitud de onda que se usan para el cálculo de la CEM se marcan **304**, **305**, **306** y **307**. Las otras longitudes de onda se han rechazado por diversas razones: **308** debido a que su pico es menos que el umbral; **310** debido a que es demasiado ancha; y **312** debido a que es demasiado estrecha.

En la etapa **220** de la Fig. 6 el valor absoluto de todas las muestras seleccionadas se calcula y en la etapa **225**, se calcula el promedio a de los valores absolutos. En la etapa **230**, la CEM de la muestra **102** se calcula en base al promedio a. Por ejemplo, se ha encontrado que la dependencia de CEM de a puede describirse por una ecuación lineal de la forma:

$$CEM = \alpha a$$

donde a es una constante derivada empíricamente. Preferentemente, la dependencia de CEM de a puede describirse por una ecuación cuadrática de la forma:

$$CEM = Aa^2 + Ba$$

Con referencia a la Fig. 9, una muestra del esperma humano específica se analizó según se describe en el presente documento. Se ha encontrado que la dependencia de CEM de a puede describirse por la siguiente expresión algebraica:

$$CEM = 0,0047a^2 + 0,869 \quad (I)$$

Se encontró que existe una buena correlación lineal para valores pequeños de a . Usando fórmula (I), el factor de correlación (r) para el espermatozoides fresco sobre el intervalo completo fue $> 0,98$.

Se llevó a cabo el análisis de las muestras de semen tratadas con viscosidad que varía usando muestras descongeladas, espermatozoides lavados, muestras diluidas (tanto en Citrato Sódico al 3% o en tampón de Test Yolk) así como con muestras conteniendo hasta glicerol al 20% que tienen viscosidad elevada artificialmente. Se ha observado que la viscosidad de muestras variante (y por lo tanto la velocidad de espermatozoides variante), no afectó significativamente la correlación entre CEM y señal promedio (" r " en todos los casos permaneció por encima de 0,96).

Usando técnicas de enriquecimiento centrífugo, se midió un muy amplio intervalo de concentraciones de espermatozoides humanos móviles (hasta 250 M/ml). No se encontró saturación significativa. La no linealidad ligera en los intervalos más amplios se corrige fácilmente por una corrección polinómica de segundo grado -dada anteriormente.

Se llevó a cabo también análisis de semen bovino y los factores de correlación entre CEM bovino y señales promediadas idénticamente (misma metodología que para seres humanos) proporcionó resultados excelentes. Se debe destacar sin embargo, que el semen bovino tiene que diluirse antes de las medidas. Esto es debido a su CEM que está típicamente un orden de magnitud por encima de la del ser humano.

Ejemplo 4 (Ejemplo de Referencia)

Como se explica anteriormente, la velocidad promedio es una función de IME y de CEM. Con referencia a la Fig. 7, el IME se calcula en la etapa 235. Esto puede hacerse, por ejemplo, como se describe en la Patente de los EE.UU. 4,176,953, o usando un analizador ACE. En la etapa 240 el CEM se calcula por cualquier procedimiento conocido. Preferentemente, la CEM se calcula por el algoritmo en el Ejemplo 3 anteriormente. En la etapa 245 la velocidad promedio VP se calcula usando una expresión algebraica que implica la proporción IME/CEM. VP se puede calcular usando la expresión algebraica:

$$VP = 0,001 \left(\frac{IME}{CEM} \right)^3 + 0,1 \left(\frac{IME}{CEM} \right)^2 + 0,89 \left(\frac{IME}{CEM} \right)$$

En la etapa 250 los resultados se presentan en el dispositivo de presentación 145 ó 148 (Fig. 5).

Ejemplo 5 (Ejemplo de Referencia)

Un subsistema de visualización de vídeo (SVV) que se puede usar con el sistema analizador en el presente documento está ilustrado en la Fig. 10. Una muestra de semen 300 se sitúa antes de un iluminador de fase contrastada, difuso, 305. La muestra puede mantenerse en un portaobjetos o frotis de laboratorio estándar, o puede mantenerse en un dispositivo de toma de muestras de acuerdo con la invención. La luz desde el iluminador 305 pasa a través de la muestra 300 y a través de un sistema de lentes dual cambiabile 310, preferentemente con ampliaciones de 20 y 40. La luz amplificada se lleva entonces a una cámara de vídeo CCD en miniatura 315. La imagen resultante puede presentarse en una pantalla de visualización interna incorporada 320 o en medios de presentación externos 325 tales como PC, pantallas, dispositivos de impresión, etc.

Preferentemente, el SVV se construye alrededor del dispositivo de toma de muestras de la invención y en particular del compartimento de medición fino. El objeto de esta característica es que no sean necesarias preparaciones extra incorporando esta función al procedimiento de realización de pruebas normal. Alguien simplemente toma el dispositivo cargado de semen en el que el ensayo automatizado se lleva a cabo y lo inserta -como tal, en el puerto de visualización. Sin embargo, el SVV no está limitado a uso con el dispositivo de toma de muestras de esta invención y se puede usar con portaobjetos o frotis estándar de laboratorio.

El extremo delantero del SVV es similar a aquel del microscopio. Se seleccionan dos lentes de objetivo optimizando el aumento y el campo de visión, de acuerdo con la solicitud ($\times 20$ o $\times 40$). Sin embargo, en lugar de los oculares del microscopio, la imagen desde el objetivo se transporta a una videocámara CCD en miniatura. El tamaño del CCD (diagonal) es 6 mm. La pantalla de visualización es una pantalla de cristal líquido de 100 mm. Esto proporciona una ampliación de vídeo de aproximadamente 17. Esto en efecto da una ampliación general de potencial de 340 ó 680. Aunque se requieren factores de ampliación de sólo 200 y 400, se selecciona este montaje de tal forma que la ampliación anterior se podría alcanzar en una construcción mucho más pequeña. Esto es deseable por ejemplo para una unidad compacta y resistente de ordenador de mesa (disminuyendo la distancia de imagen especificada disminuye la ampliación que se requiere).

Las lentes y su sistema de aumento pueden seleccionarse de manera que la "Distancia de Trabajo" (desde el objetivo a las lentes) se pueda variar permitiendo escanear por toda la profundidad total del compartimento de

medición fino (por ejemplo 300 micrómetros). Esto se opone a la visualización microscópica normal que no requiere tal escaneo, debido a que el objeto está normalmente encerrado en un portaobjetos que está justo a 20 micrómetros de profundidad y la profundidad total puede visualizarse sin escaneo o reenfoque.

- 5 Como se menciona anteriormente, se puede seleccionar un factor de amplificación general de 200 ó 400. Una amplificación de 400 será la elección cuando sea necesario identificando células no espermáticas (células sanguíneas blancas, células redondas, etc.), así como investigando y evaluando distintas patologías morfológicas de las células espermáticas (aglutinaciones, células inmaduras, defectos en la cabeza o la cola de los espermatozoides, etc.). Será preferible una amplificación de 200 para el conteo de las células -independientemente de si son espermatozoides u otras. La amplificación menor proporciona un campo de visión más grande (4 veces más grande) y por lo tanto estadísticas de conteo incrementadas. La posibilidad de congelar imágenes potencia ampliamente ambas aplicaciones.

- 10 Con el fin de facilitar conteos de células y de adquirir un resultado verdaderamente cuantitativo usando el SVV, se puede hacer el seguimiento de una cuadrícula calibrada *directamente* sobre la pantalla de visualización de cristal líquido. La cuadrícula comprende 2 cm cuadrados que son equivalentes a un tamaño de preamplificación de 0,1 mm en el compartimento de medición de carga de semen (factor de amplificación de 200). Esta aproximación descarta la muy difícil tarea de realizar un seguimiento de una cuadrícula diminuta en el compartimento de medición en sí mismo. La solución cara última se incorpora en la Cámara de Conteo de Mackler así como algunos otros hemacitómetros -descartando su uso según estén disponibles. Como se revela en el presente documento, esto es innecesario y el SVV permite a la cuadrícula ser una parte de la pantalla de visualización.

- 15 El SVV puede ser útil en las siguientes aplicaciones:

- (a) Medir concentraciones de espermatozoides muy bajas.
- (b) Identificar células extrañas en el semen (distintas de las células espermáticas).
- (c) Análisis de morfología manual de acuerdo con cualesquiera criterios seleccionados.
- (d) Validación de eficacia de la vasectomía.
- 20 (e) Diagnosticar azoospermia.
- (f) En la comparación puntual de resultados computerizados con análisis visual.
- (g) Proporcionar "imágenes instantáneas" de imágenes inmovilizadas de diversas capas de semen. La inmovilización se logró por congelación electrónica de las imágenes.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de toma de muestras (20) para usar en analizar ópticamente semen que comprende:
 - (i) un aspirador (24) o una jeringa para aspirar semen dentro del dispositivo;
 - (ii) una cámara de medición fina (28) que tiene una pared transparente superior e inferior, estando la distancia entre dichas paredes en el intervalo de 100-500 micrómetros;
 - (iii) una cámara de medición gruesa (30) que tiene una pared transparente superior e inferior, estando la distancia entre dichas paredes en el intervalo de 0,5-3 cm;
 - (iv) medios para excluir aire (26) de dichas cámaras de medición (28, 30); y
 - (v) un adaptador (38) para alinear el dispositivo (20) en un instrumento óptico, estando dicho adaptador (38) está en la forma de al menos un carril que se extiende a lo largo de una cara del dispositivo de toma de muestras (20) para alinear el dispositivo de toma de muestras con el instrumento óptico; yen el que dicho aspirador (24), cámara de medición fina (28) y cámara de medición gruesa (30) están en comunicación fluídica.
2. Un dispositivo de toma de muestras (20) de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la distancia de dicha cámara de medición fina (28) está en el intervalo de 250-350 micrómetros.
3. Un dispositivo de toma de muestras (20) de acuerdo con la reivindicación 1 o con la reivindicación 2 en el que la distancia de dicha cámara de medición gruesa (30) está en el intervalo de 0,8-1,2 cm.
4. Un dispositivo de toma de muestras (20) de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que dicho aspirador comprende un cilindro (32) y un émbolo (34).
5. Un dispositivo de toma de muestras (20) de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que dichos medios para excluir aire (26) comprenden una válvula situada entre dichas cámaras de medición (28, 30) y dicho aspirador (24).
6. Un dispositivo de toma de muestras (20) de acuerdo con cualquier reivindicación precedente que es desechable.

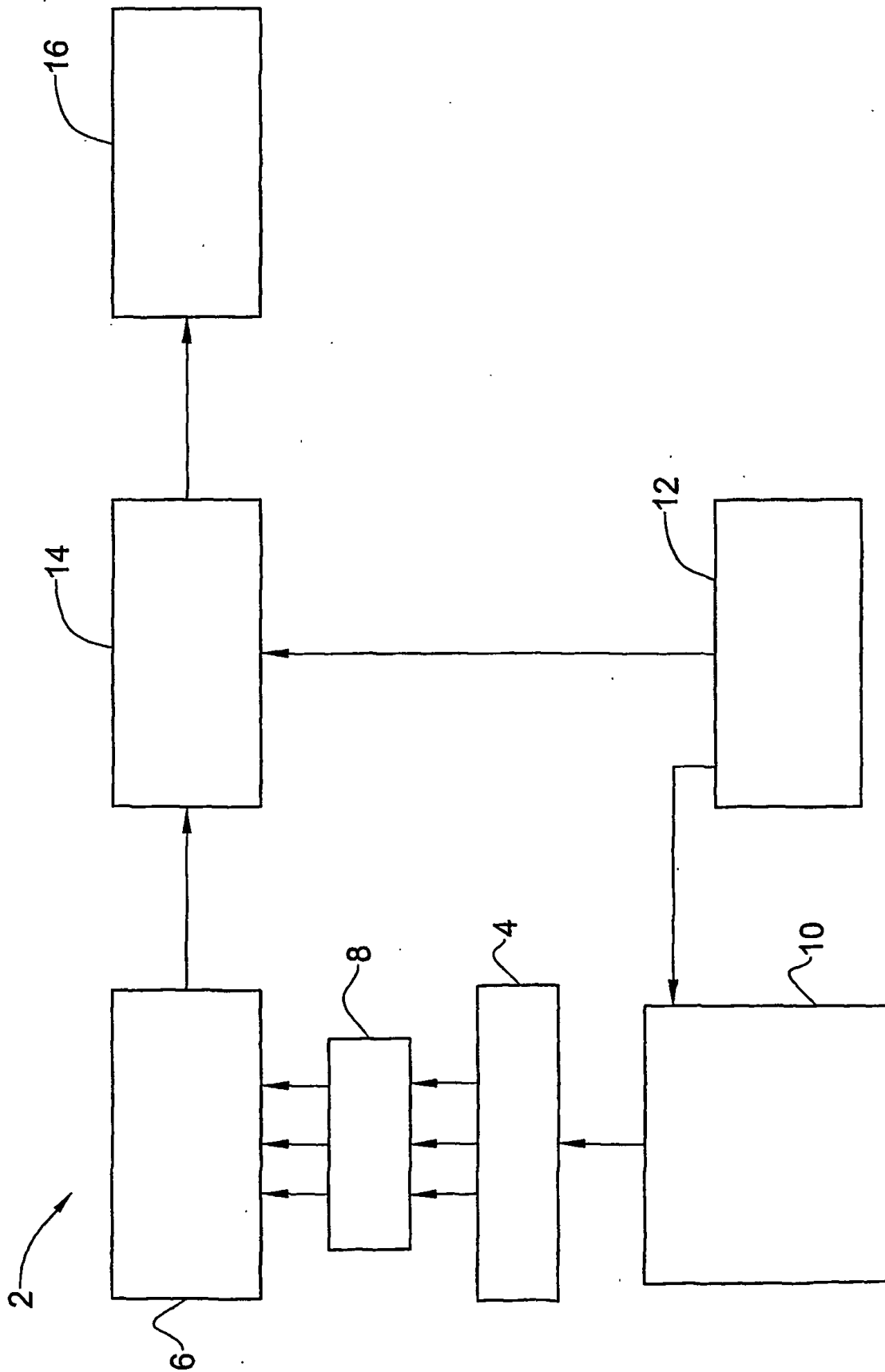


FIG. 1

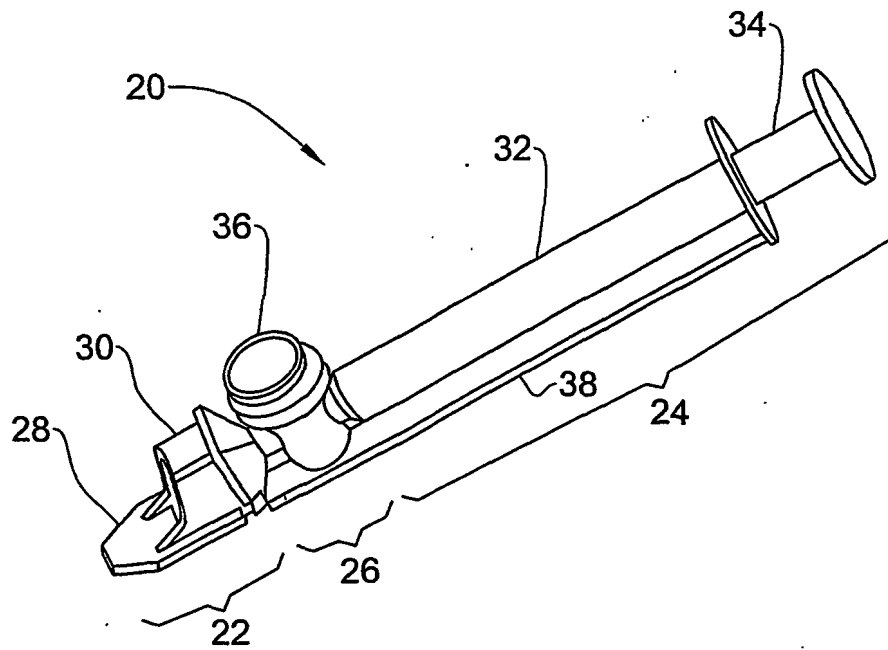


FIG. 2

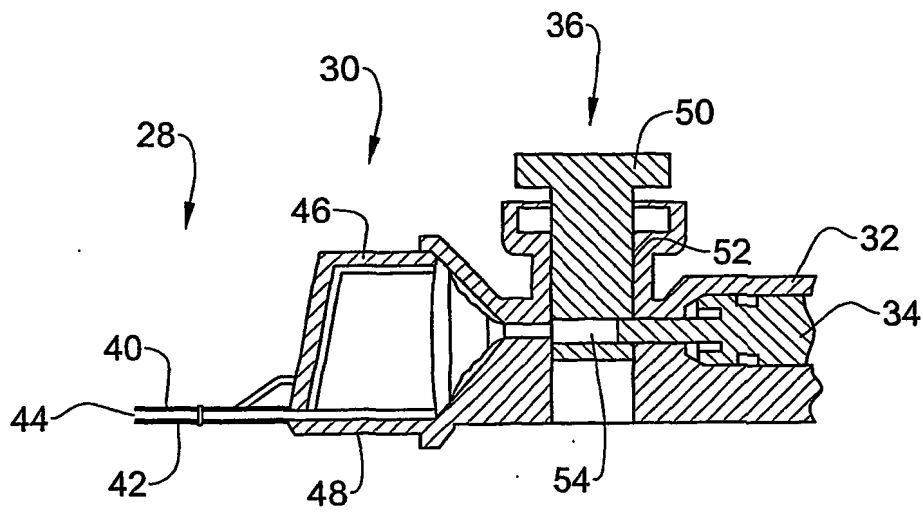


FIG. 3

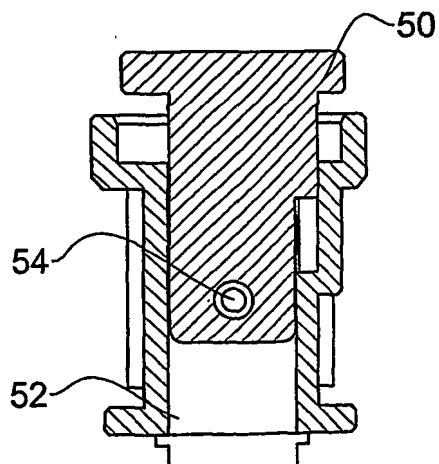


FIG. 4

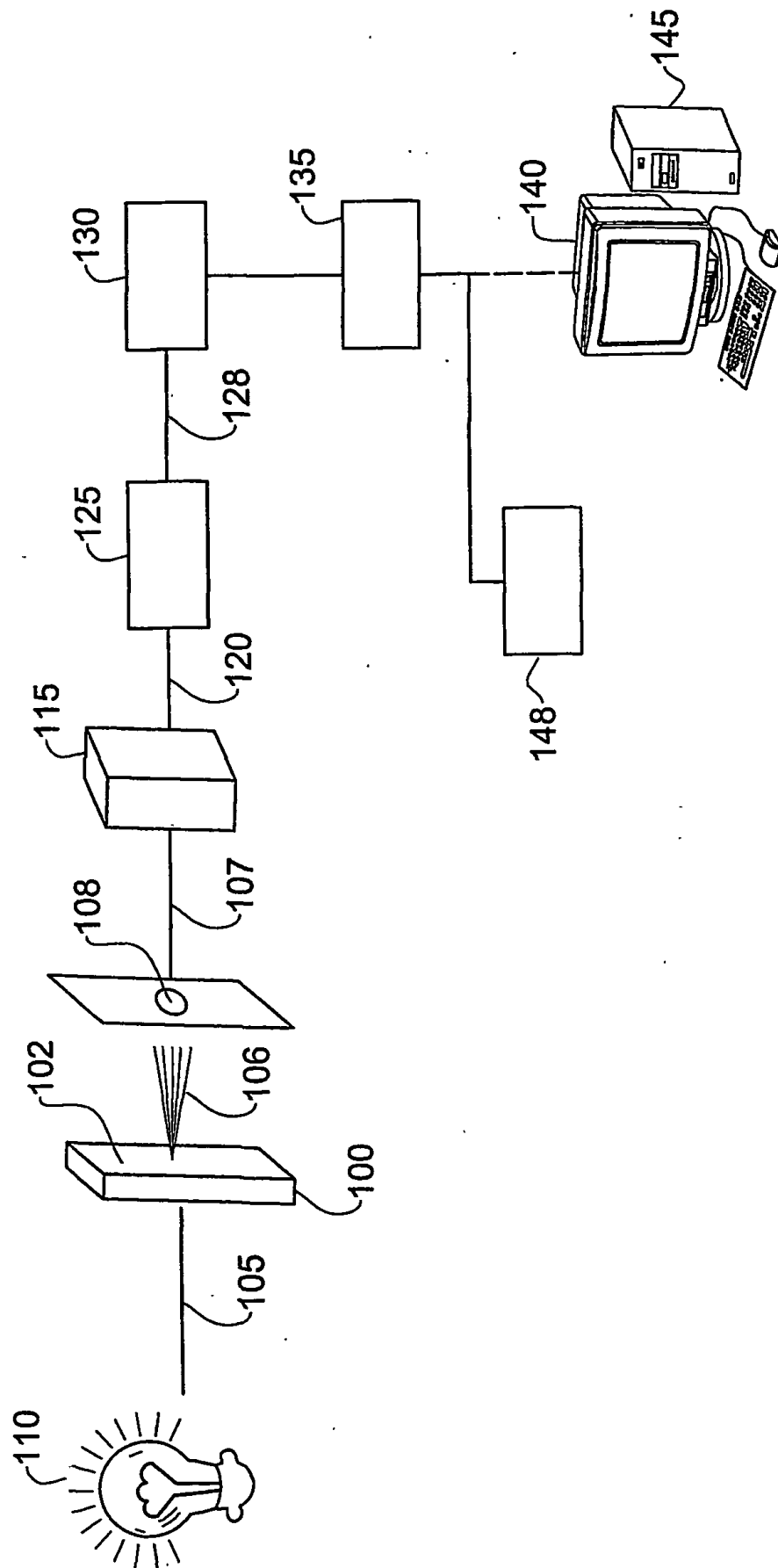


FIG. 5

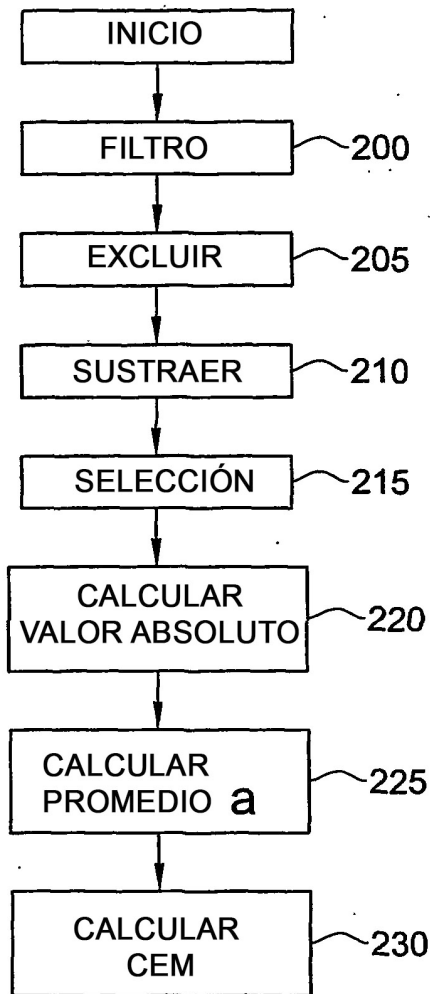


FIG. 6

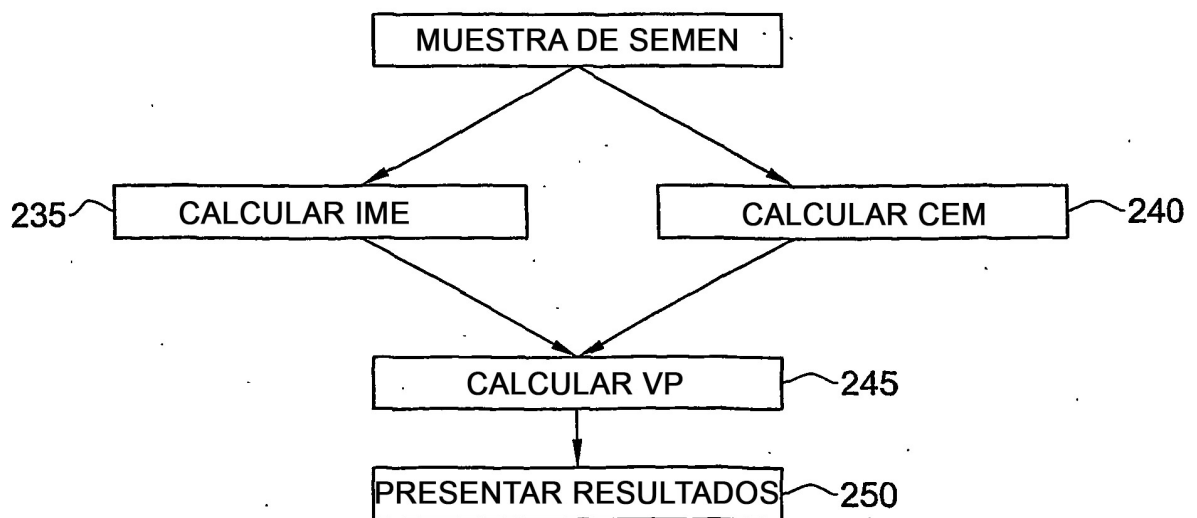


FIGURA 7

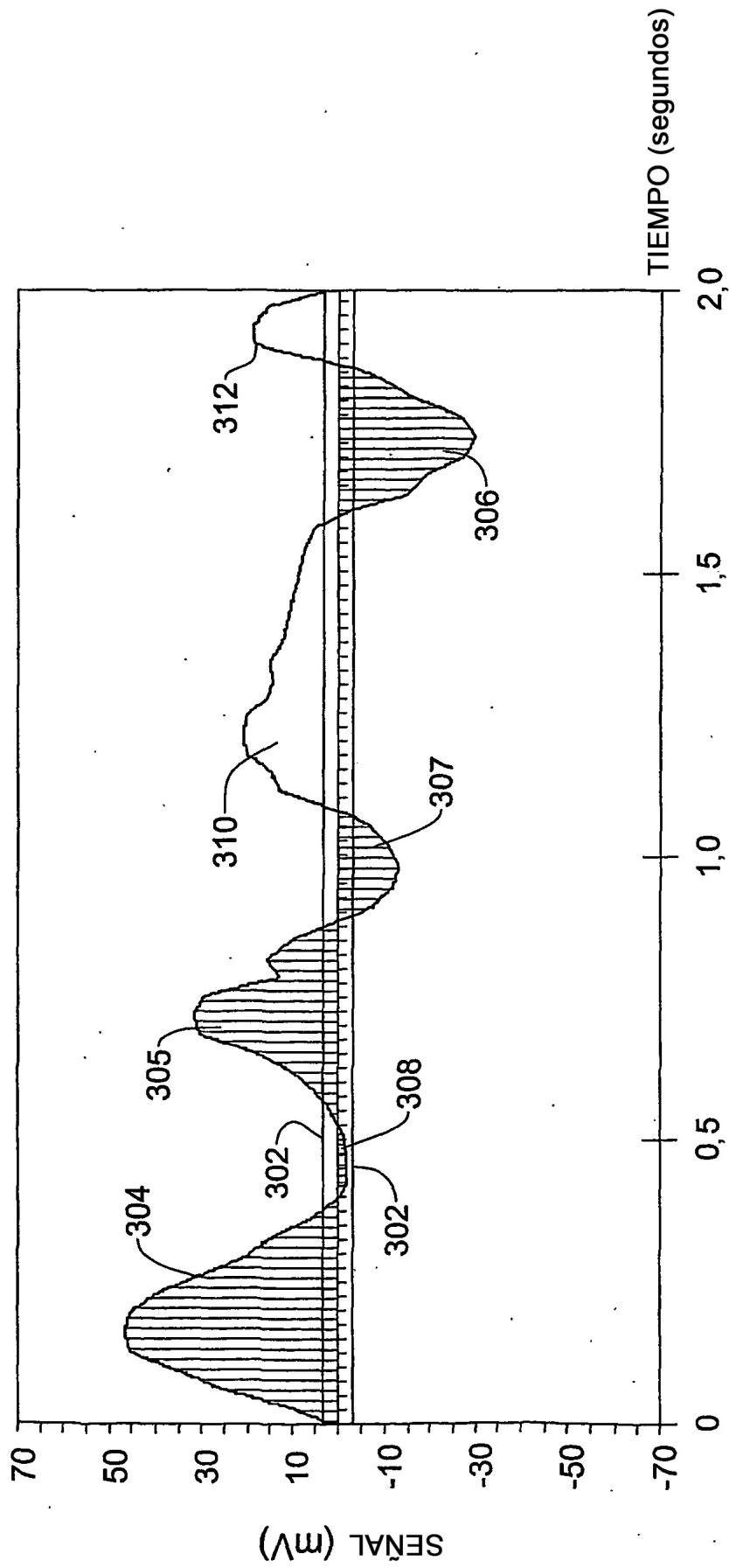


FIG. 8

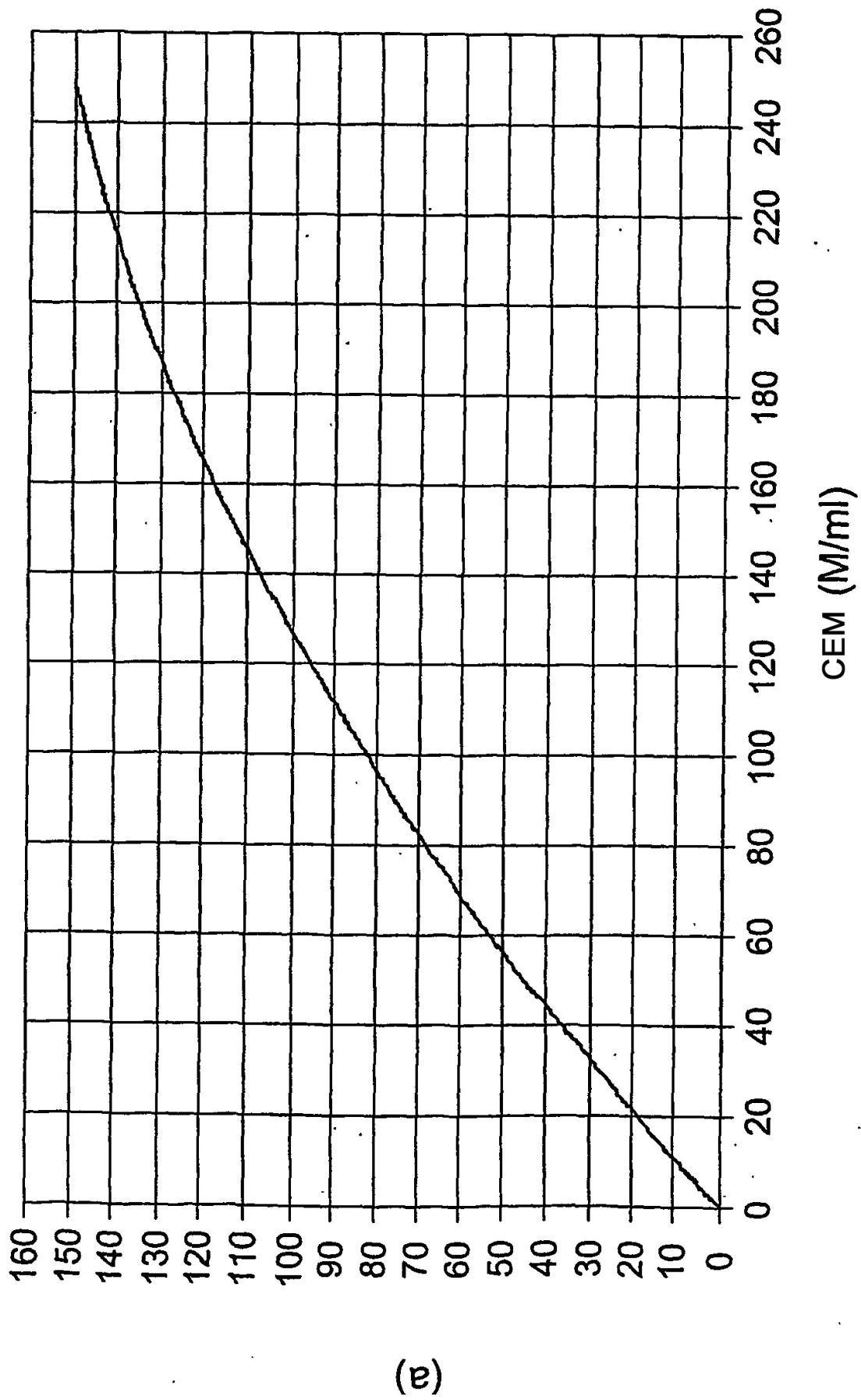


FIG. 9

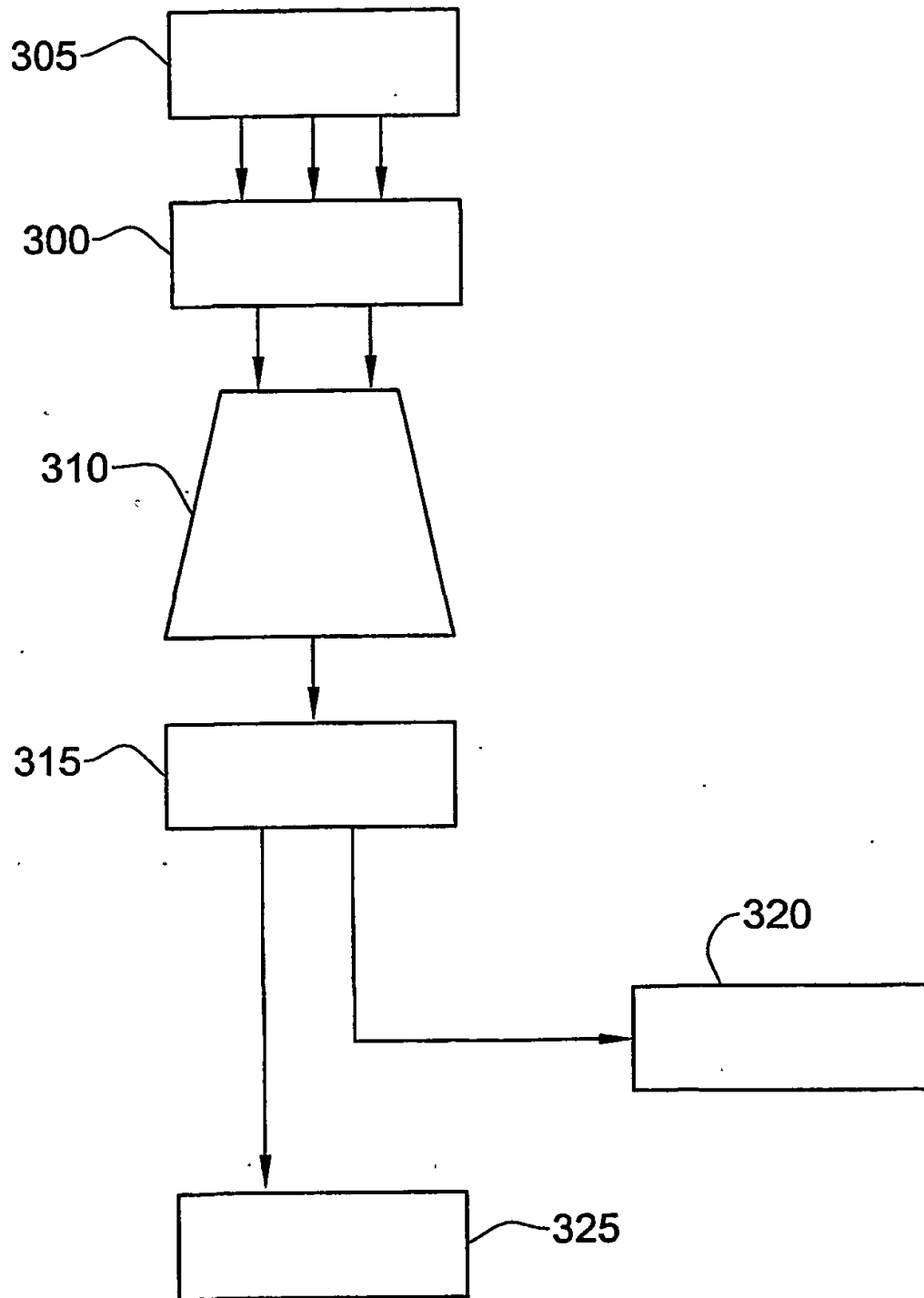


FIGURA 10