

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 457 755**

51 Int. Cl.:

F21V 9/16 (2006.01)
G01J 1/58 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
B32B 5/02 (2006.01)
B32B 27/04 (2006.01)
B32B 27/12 (2006.01)
G01N 15/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2005 E 05786494 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014 EP 1781986**

54 Título: **Un dispositivo de obtención de imágenes de diagnóstico para análisis de células raras circulantes**

30 Prioridad:

17.08.2004 US 602504 P
21.01.2005 US 645683 P
31.01.2005 US 648477 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.04.2014

73 Titular/es:

VERIDEX, LLC (100.0%)
1001 US Highway Route 202
North Raritan NJ 08869, US

72 Inventor/es:

COUMANS, FRANK A. W.;
MARLIN, ARTHUR G.;
MODICA, FRANK P. y
VERRANT, JOHN A.

74 Agente/Representante:

DE PABLOS RIBA, Julio

ES 2 457 755 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

Un dispositivo de obtención de imágenes de diagnóstico para análisis de células raras circulantes.

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere en general al campo de la obtención automatizada de imágenes de una muestra, y más en particular a la citometría de imagen de células raras aisladas a partir de fluidos corporales mediante un dispositivo automatizado para análisis relacionado con el diagnóstico, la monitorización y la gestión de enfermedades específicas, en particular el cáncer.

Técnica anterior

- 10 Las células tumorales están presentes con frecuencia en la sangre de pacientes con carcinoma a frecuencias muy bajas (<10 células por ml). Estos niveles pueden proporcionar información clínicamente útil. Sin embargo, los laboriosos procedimientos requeridos para detectar y cuantificar la presencia de células tumorales circulantes y las estadísticas de números bajos, introducen un alto nivel de variabilidad en los resultados. El sistema de la presente invención mejora los dispositivos de obtención de imágenes usados en los laboratorios clínicos para la detección de células raras en muestras de fluidos tales como muestras de sangre (es decir, células tumorales raras circulantes de origen epitelial).

- 15 En general, estas células raras son objetivadas mediante etiquetado y separación de la sangre con medios magnéticos. Las células capturadas son etiquetadas fluorescentemente para permitir la detección y la diferenciación de las células no etiquetadas y de las células de control. Cell Spotter® es un microscopio de fluorescencia semi-automatizado que enumera y diferencia entre células seleccionadas inmuno-magnéticamente en base a señales de fluorescencia procedentes de células de la muestra de sangre.

- 20 Una muestra de sangre sospechosa de contener las células raras objetivadas, es pre-procesada enriqueciendo las células raras deseadas. El enriquecimiento se obtiene enlazando anticuerpos, específicos para la célula objetivo, a partículas magnéticas. El complejo inmunomagnético se combina con la muestra de sangre en presencia de un campo magnético, proporcionando la captura inmunomagnética de las células objetivo. Tras la obtención de una fracción de sangre enriquecida que contiene la célula objetivo, se añaden reactivos fluorescentes para la posterior formación de imágenes. Las células enriquecidas se colocan en un cartucho de visión que se sitúa a continuación en un dispositivo magnético que dirige células etiquetadas magnéticamente en la muestra a una superficie planar ópticamente clara de la cámara para alineamiento inmunomagnético y análisis de imagen. La nueva cámara de muestra (documentos US 10/074.900 y US 10.303.309) utilizada en la presente invención y el sistema Cell Spotter® están incorporados en las patentes y solicitudes en tramitación siguientes: US 5.186.827, US 5.698.271, US 6.120.856, US 6.551.843, US 09/702.188, US 10/449.335. El dispositivo magnético y la cámara se colocan a continuación en un microscopio de fluorescencia equipado con un selector de filtro controlado por ordenador y una etapa X-Y-Z controlada digitalmente. Las imágenes son adquiridas mediante exploración del cartucho de muestra con 4 conjuntos de filtro fluorescentes diferentes. Las imágenes adquiridas son procesadas mediante análisis de software automatizado para compilar datos que contengan imágenes de las células objetivo. Se ven los fotogramas individuales y se seleccionan manualmente en cuanto a células objetivo. El análisis se completa con una presentación de una galería de imágenes que contienen todas las células objetivo seleccionadas.

- 30 Cuando se incorpora en un laboratorio clínico, el sistema puede ser usado para examinar células raras circulantes asociadas a una enfermedad clínica. Por ejemplo, se pueden establecer fácilmente ensayos clínicos longitudinales, de prospectiva multi-centro, en los que el número de células tumorales circulantes (CTC) está correlacionado con la progresión de la enfermedad en pacientes que tengan cáncer de pecho metastático (documentos US 6.365.362; US 6.645.731; US 10/079.939).

- 35 De ese modo, los conceptos principales de la presente invención provienen de un equipamiento diagnóstico de laboratorio que evalúa la detección y la enumeración de células en muestras biológicas, junto con sistemas de microscopio para observar la microestructura de una célula bajo una amplificación deseada.

- 40 La tecnología de microscopía que emplea fases activadas por motor paso a paso para formar imágenes de áreas más grandes que el campo de visión del microscopio, tiene una utilidad clínica limitada. Por ejemplo, la velocidad alcanzable de adquisición de imágenes en análisis de citometría de imagen y el espacio de la mesa de laboratorio requerida para el Sistema Cell Spotter® limitan su uso clínico práctico. Actualmente, la adquisición de imágenes se realiza moviendo una corredera o un cartucho de muestra a través del campo de visión en un movimiento bustrofedónico paso a paso. Un movimiento bustrofedónico es un movimiento en el que dos líneas consecutivas a lo largo del eje más rápido son exploradas en sentidos opuestos. Se toma una imagen por cada paso. Cuando se obtienen múltiples imágenes fluorescentes de la misma muestra, el cubo de filtro se cambia y el movimiento bustrofedónico se repite tras la terminación de cada paso. Este proceso se repite hasta que se adquiere una imagen para todas las posiciones y todos los colores, completando una exploración de color por color. Tanto el movimiento del cubo de filtro como de la muestra se realizan mediante etapas de motor paso a paso con servo

retroalimentación, que limita considerablemente la velocidad de adquisición. El movimiento de un cubo de filtro hasta el siguiente necesita aproximadamente 2 segundos con 0,5 segundos adicionales para el paso entre dos posiciones consecutivas. De ese modo, el tiempo total de adquisición consiste en el tiempo total de movimiento más el tiempo total de adquisición de imagen, haciendo de la adquisición el tiempo predominante gastado en movimiento en sistemas de formación de imagen como Cellspotter®.

Puesto que la técnica anterior emplea tecnología de motor paso a paso para conducir etapas de microscopio que se limitan a una frecuencia de actuación máxima en los motores paso a paso, existe una necesidad de desarrollar nuevos dispositivos que mejoren el tiempo de adquisición de imagen en un área grande. Además, mover la muestra (o el cartucho) puede provocar que las células se muevan con la inercia del fluido. Cualquier movimiento de una célula podría causar que el software de adquisición malinterprete las imágenes y cuente una célula como dos con una identificación impredecible.

Otro problema relacionado con la técnica anterior consiste en que durante el movimiento de etapa, la muestra está siendo continuamente iluminada. En consecuencia, los tintes fluorescentes utilizados en el etiquetado estarán sometidos a blanqueo. La ficoeritrina (PE) es un tinte utilizado normalmente en el etiquetado de células, pero es muy sensible al blanqueo. La reducción del tiempo invertido en el movimiento reducirá la cantidad de blanqueo de la muestra.

El equipo abarcado en la tecnología CellSpotter® incluye una cámara de muestra (documentos US 10/074.900, US 10/303.309 y US 5.993.665) que está situada en un dispositivo magnético (documento US 5.985.153) que dirige células etiquetadas magnéticamente en la muestra a una superficie planar ópticamente clara de la cámara. El dispositivo magnético y la cámara son colocados a continuación en un microscopio de fluorescencia equipado con un selector de filtro controlado por ordenador y en una etapa X-Y-Z controlada digitalmente.

La presente invención es una mejora del sistema de diagnóstico automatizado CellSpotter® para proporcionar análisis de muestra rápido utilizando múltiples indicadores fluorescentes. El dispositivo de formación de imágenes se ha mejorado además condensando los componentes según una configuración de caja simple para su colocación ventajosa en la mayoría de las mesas de laboratorio clínico. Esto proporciona una configuración práctica en un laboratorio automatizado que carezca de una cantidad sustancial de espacio.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un sistema automatizado de obtención de imágenes para laboratorio clínico, para la detección de células raras conforme a la reivindicación 1, y un método para la adquisición de múltiples imágenes a partir de un cartucho de muestra según la reivindicación 5 o la reivindicación 6. El dispositivo de la presente invención es una unidad compacta y auto-contenida, diseñada para acoplarse encima de una mesa de laboratorio con mínimo espacio según un diseño a modo de caja exterior, simple. La iluminación y la óptica de captación son estructuras previstas para proporcionar a un técnico de laboratorio clínico un acceso y un uso fáciles durante el análisis de miembros grandes de muestras de pacientes.

Además, la tecnología de motor paso a paso utilizada durante el cambio de cubos de filtro y el movimiento de etapa, ha sido sustituida por motores Nanomotion® en un bucle de realimentación cerrado. Estos movimientos son críticos cuando una imagen debe ser desarrollada a partir de múltiples detectores fluorescentes o tintes con los que se requiera más de un cubo de filtro. El tiempo consumido en el movimiento entre dos posiciones consecutivas, se reduce desde 0,5 hasta 0,1 segundos. Puesto que el área que se necesita para la adquisición de imágenes es más grande que el campo de visión del sistema, la adquisición de una imagen completa requiere la adquisición de imágenes en diferentes posiciones. Los motores Nanomotion reducen el período de tiempo requerido para estas funciones y limitan la fracción de la adquisición total de tiempo que se gasta en el movimiento. La mayor parte del tiempo será entonces consumido en la adquisición de la propia imagen, en vez de ser tiempo gastado en mover la muestra y/o los cubos. Además, con el tiempo total de adquisición drásticamente reducido, el blanqueo de la muestra, especialmente con PE, se reduce. La reducción sustancial en el tiempo de adquisición permite una exploración de posición por posición de la imagen completa. Con una exploración de posición por posición, las imágenes son adquiridas por todos los filtros con anterioridad al movimiento hasta la siguiente posición en un movimiento bistrofedónico. Se elimina cualquier movimiento posible de la imagen durante una exploración de color por color.

El dispositivo de obtención de imagen óptica fluorescente automatizada de la presente invención puede proporcionar además una bombilla prealineada y un método para su instalación/uso en la enumeración de células tumorales circulantes (CTC) etiquetadas fluorescentemente que son seleccionadas y alineadas inmuno-magnéticamente. Esta invención puede proporcionar la estandarización de la etapa de alojamiento de lámpara mediante el establecimiento de una unidad de lámpara maestra/etapa. Esta lámpara maestra está asentada en el interior de un collarín de ajuste según se muestra en los dibujos. El collarín de ajuste tiene huecos mecanizados que se utilizan para microalinear el filamento de la bombilla. De ese modo, el collarín se utiliza para asegurar la alineación exacta (para orientación X-Y-Z) de los electrodos con respecto a cualquier unidad instrumental. Una vez alineada, la unidad de collarín-bombilla se inserta en una estructura de bloque en V para su soporte final. Una mejora adicional respecto a cualquier cambio posterior en el alineamiento, consiste en el uso de un alambre trenzado como cable de conexión flexible. Estas

mejoras combinadas permiten que una bombilla prealineada pueda ser usada en cualquier unidad de formación de imágenes correspondiente. Esto reduce los costes de las unidades individuales de alineamiento en sus respectivas posiciones y proporciona una instalación eficiente.

- 5 De ese modo, este dispositivo automatizado de formación de imágenes de células raras mejora la velocidad de análisis de muestra. El diseño compacto del sistema en un laboratorio de diagnóstico clínico permite la enumeración y la identificación de células objetivo para objetivar el estado clínico de enfermedades tales como el cáncer metastático. La estructura de bombilla prealineada proporciona un mantenimiento rápido, conveniente. En conjunto, estos conceptos ayudan a la detección y cuantificación de células objetivo en un espécimen de muestra tal como, aunque sin limitación, cribado y detección de cáncer en fase temprana, monitorización de remisión de enfermedad en respuesta a terapia y selección de regímenes de dosificación más efectivos o terapias alternativas en caso de recaída.

Breve descripción de los dibujos

- Figura 1:** el diseño global del perfil de mesa de trabajo. (A) Vista exterior de la unidad en forma de caja. (B) Vista interna de componentes del sistema.
- 15 **Figura 2:** Etapa modificada para comunicación entre MagNest™ y el Sistema de Obtención de Imágenes.
- Figura 3:** Diagrama que muestra la relación de motor lineal y codificador lineal para proporcionar precisión posicional.
- Figura 4:** Representación esquemática de la dirección axial de movimiento para el cubo de filtro (W), objetivo (Z), y cartucho (X e Y).
- 20 **Figura 5:** Diagrama que muestra la trayectoria de iluminación en los componentes del instrumento.
- Figura 6:** Diagrama de iluminación que muestra la trayectoria de la luz.
- Figura 7:** Diagrama de la estructura prealineada que muestra la lámpara (1) con el collarín de soporte (2). Tornillos de ajuste (3), (4) y (5) están en la porción superior del collarín mientras que el tornillo de ajuste (6) está situado en la superficie lateral y el tornillo de ajuste (7) está en la parte inferior.
- 25 **Figura 8:** Representación esquemática de un accesorio de alineamiento F60040 con lámpara con electrodo en su posición.
- Figura 9:** Diagrama del aparato de soporte completo para la lámpara. El panel A muestra el aparato de soporte con la lámpara. El panel B muestra el aparato con el sistema de encendido de lámpara de etapa. El panel C muestra el aparato con el alojamiento exterior.
- 30 **Figura 10:** Comparación del Cubo APC de CellSpotter con el Cubo APC de la presente invención.
- Figura 11:** Diagrama de trayectoria de obtención de imágenes con dirección de luz en relación con la cámara, la lente, los espejos, los cubos y el objetivo (Panel A). Trayectoria de obtención de imágenes mostrada con el aparato en su posición (Panel B).

Descripción detallada de la invención

- 35 El aparato de la presente invención mejora la tecnología CellSpotter® actual para proporcionar una aplicación más robusta con menos intervención del usuario en un dispositivo que es más propicio para un entorno de laboratorio clínico.

En primer lugar, el diseño general es un diseño de tipo no microscopio para proporcionar un perfil de mesa de trabajo compacta para una gestión eficiente del espacio en el laboratorio (véase la Figura 1). El sistema está encapsulado en una unidad encajonada simple, racionalizada, para evitar el desorden de cables de conexión y para desaconsejar el acceso por parte del personal de laboratorio (Figura 1A). Los componentes internos están diseñados para proporcionar iluminación eficaz y la óptica de captación en un espacio confinado (Figura 1B).

En segundo lugar, las mejoras en los componentes individuales proporcionan más versatilidad. La unidad puede explorar una muestra individual para múltiples análisis. Además, la unidad es expansible para incluir múltiples reactivos específicos de analito (ASR) y los algoritmos de software asociados. MagNest™, el dispositivo magnético, comunica con la etapa a través de una interfaz de botón de datos (véase la Figura 2). La etapa está mejorada tanto en exactitud (véase la Figura 3) como en precisión. El movimiento de la plataforma funciona a través de un controlador de movimiento (Galil), un motor piezoeléctrico (Nanomotion), y codificadores de posición (Renishaw). Esto proporciona una resolución de 0,2 micrones en el plano X, Y, Z, y con los filtros (W), según se muestra en la Figura 4. Los componentes ópticos incluyen un Conjunto de Lámpara Oriol con una lente Nikon integrada que es ajustable por el operador. El sistema de lente tiene muy pocos componentes para reducir la cantidad de pérdida de luz en reflexiones superficiales y la propuesta de iluminación es más eficiente que la iluminación Kohler

habitualmente utilizada. El objetivo 10X y la lámpara de arco de mercurio de 100 W como fuente de luz, son similares al diseño de la técnica anterior.

Un aspecto crítico para el diseño compacto es la trayectoria de iluminación única, junto con la colocación de etapa permitida a la estructura de microscopio anterior para adaptarse a la nueva configuración (Figura 5). La trayectoria de iluminación resultante permite un fácil acceso a la lente, los filtros y la fuente de luz asociados (Figura 6). El sistema de iluminación tiene un rango de excitación de fluorescencia capacitado para longitudes de onda de 350 a 1000 nanómetros. La intensidad y la uniformidad son aproximadamente equivalentes a CellSpotter®, incluso aunque el alojamiento de lámpara no tenga un reflector trasero.

La lámpara de mercurio es equivalente a CellSpotter® con un número de botones de ajuste reducido a 3 (no a 6 como antes). Esto facilita la sustitución de la lámpara por el usuario.

La presente aplicación incorpora también el uso opcional de un sistema de lámpara pre-alineada. La Figura 7 representa el collarín (2) en relación con la lámpara (1) con tornillos de ajuste (3), (4), (5), (6) y (7) localizados óptimamente en la superficie del collarín. Según se muestra en la Figura 8, se utiliza el accesorio de alineamiento F60040 sobre un comparador óptico (es decir, una lente de 50X) de puesta a cero en la dimensión 0.000 y ajuste de posición de electrodo superior en $2,510 \pm 0,001$ usando el tornillo (7) de ajuste. Se utilizan tornillos de ajuste, 3-4-5 para alinear el electrodo (1) con la línea horizontal central en el comparador óptico con tolerancia horizontal que no sea más amplia que el espesor del electrodo inferior. Estas etapas continúan hasta que el electrodo superior se alinea con la línea horizontal central en el comparador óptico. La lámpara es una bombilla de mercurio de 100 W. La Figura 9 muestra el aparato de soporte completo para la lámpara. El panel A está con la lámpara y como soporte sólo. El panel B está con el sistema de encendido de la lámpara de etapa asociada y el panel C está con el alojamiento exterior en su lugar.

Los cubos de filtro son similares a CellSpotter®, pero el número de cubos de filtro se ha ampliado de cuatro (4) a seis (6). El cubo DIO/PE no se ha cambiado. El cubo APC se ha modificado ahora para reducir el número de dobles positivos mientras conserva la sensibilidad. El cubo DAPI se ha mejorado para reducir la autofluorescencia y la pérdida del cubo. El cubo APC se ha mejorado también para reducir el sangrado (50%) apareciendo CTC menos brillante en el canal de APC, mientras conserva la sensibilidad de APC. La eficacia de detección de APC es idéntica a la de CellSpotter®. Etiquetas ASR adicionales que pueden estar soportadas en la presente invención incluyen ARQdot con 1 ASR (Ex = 350 nm y Em = 800 nm), lantánidos con 2 ASRs (ex = 350 nm, Em = 615 nm (Eu) y 550 nm (Tb), y UPT con 2 ASRs (Ex = 980 nm, Em aproximadamente 490 y 560 nm). Otras mejoras incluyen un látex con código de barras y compensación espectral. Estos factores mejoran el cubo APC con sangrado de PE reducido (50%) con CTC menos brillante en el canal APC (Figura 10). Además, la eficacia de APC es idéntica sin ninguna pérdida en el porcentaje de células de glóbulos blancos detectadas.

Existe una mejora adicional en el presente dispositivo respecto al diseño de la iluminación de fondo. La iluminación de fondo se utiliza para hallar los bordes del cartucho, el alineamiento inicial del instrumento y la formación de imágenes de campo brillante opcional. Se utiliza un LED como fuente de luz. La uniformidad es buena (CV de 2,5%).

El sistema de detección se ha mejorado respecto a CellSpotter® con mejor resolución, sensibilidad, ruido oscuro, rango dinámico y planeidad de campo. Se pueden detectar longitudes de onda de 400 a 800 nm, con la opción de ampliar a 400-1100 nm con un coste de una pequeña fracción de la MTF (función de transferencia de modulación).

La trayectoria de obtención de imágenes ha sido mostrada en la Figura 11. El Panel A representa la trayectoria luminosa mientras que el Panel B muestra el aparato.

La anchura de chip es un 3% más pequeña, lo que da como resultado un número elevado de exploraciones con 175 fotogramas (es decir, 1 fila extra) por filtro. La anchura de la cámara de muestra se reduce en un 5%, lo que restablece la exploración en 4 filas (140 fotogramas) con una certidumbre de 3 sigma, y reduce el volumen de la cámara en 15 microlitros.

El presente dispositivo tiene un chip CCD enfriado por TE de 2 etapas. El enfriamiento reduce la corriente de oscuridad. El presente dispositivo considera también un enfriamiento por TE de una etapa, lo que es suficiente para cumplir la especificación de corriente de oscuridad (con una temperatura de sistema interno menor de 40 °C), ofreciendo una opción de detector más barata.

La presente invención considera también el uso de una lente de objetivo 40X sola o en combinación con la lente actual de objetivo 10X usada en la adquisición de imágenes.

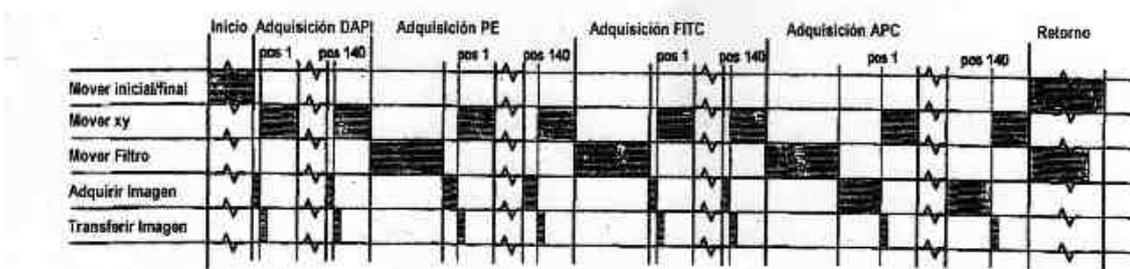
El tiempo total para adquisición de la imagen comprende 5 componentes. Éstas incluyen el tiempo invertido en el sistema/movimiento hasta la posición de expulsión, para mover la muestra en la dirección x-y, para mover el cubo de filtro, para adquirir una imagen (tiempo de integración) y para transferir la imagen.

El tiempo total de adquisición es para una alternativa de color por color, en la que en primer lugar se crea una imagen del cartucho completo con el primer cubo, y a continuación mediante el siguiente cubo. Esto se compara con la alternativa de posición por posición, en la que se obtienen para cada posición las imágenes adquiridas para todos

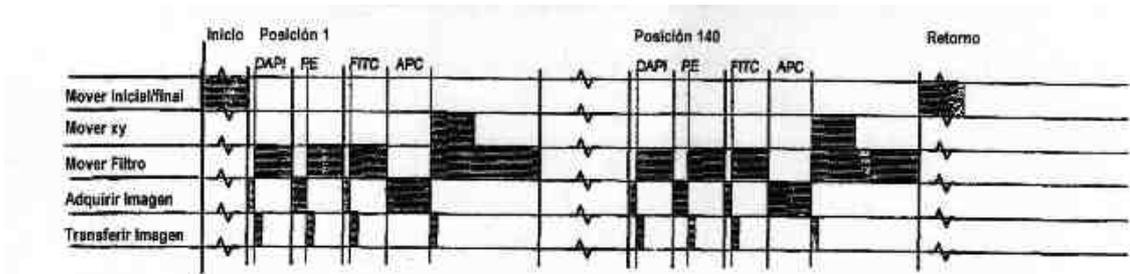
los colores con anterioridad a desplazarse a la siguiente posición. Una representación esquemática de los tiempos de adquisición ha sido mostrada en la tabla que sigue (Tabla 1). DAPI, PE, FITC y APC, que utilizan CellSpotter®, han sido mostrados a título de ejemplo ilustrativo, y no están limitados a la realización de la presente invención.

Tabla 1

5 Todas las posiciones de un color antes de moverse al siguiente color



Una posición de todos los colores antes de moverse a la siguiente posición



10 El tiempo empleado en la adquisición de imágenes individuales es el mismo en ambos métodos, pero es diferente para diferentes tintes: 0,11 s para DAPI, 0,22 s para PE, 0,11 s para FITC, y 0,66 s para APC. La comparación del método de color por color con el método de posición por posición muestra que la diferencia principal consiste en que el tiempo total empleado está afectado por el tiempo necesario para mover la muestra en la dirección x-y.

15 El tiempo total de color por color está regulado por la siguiente ecuación:

$$T_{\text{color por color}} = T_{\text{inicio}} + 140 \times T_{\text{adquisición}} + 560 \times (T_{\text{movimiento xy}} // T_{\text{transferencia}}) + 4 \times T_{\text{mover filtro}} + T_{\text{final}} \quad (1)$$

Para la posición por posición, el modelo viene dado por lo siguiente:

$$T_{\text{posición por posición}} = T_{\text{inicio}} + 140 \times T_{\text{adquisición}} + 140 \times (T_{\text{movimiento xy}} // T_{\text{transferencia}} // T_{\text{mover filtro 4-1}}) + 420 \times (T_{\text{mover filtro 1-2/2-3/3-3/3-4}} // T_{\text{transferencia}}) + T_{\text{final}} \quad (2)$$

20 donde (A // B) significa A si (A > B) y B (si A ≤ B).

Suponiendo los valores que siguen para el sistema CellSpotter®: $T_{\text{inicio}} + T_{\text{final}} = 60$ segundos; $T_{\text{adquisición}} = 1,1$ segundos; $T_{\text{transferencia}} = 0,11$ segundos, $T_{\text{movimiento xy}} = 0,5$ segundos, $T_{\text{mover filtro}} = 2$ segundos, $T_{\text{mover filtro 4-1}} = 6$ segundos, el tiempo total de adquisición resultante es de 500 segundos (8 minutos, 20 segundos) para la alternativa de color por color y de 1900 segundos (31 minutos, 40 segundos) para la alternativa de posición por posición.

25 En la presente invención, estos tiempos son los siguientes: $T_{\text{adquisición}} = 0,6$ segundos, $T_{\text{transferencia}} = 0,11$ segundos, $T_{\text{mover xy}} = 0,1$ segundos, $T_{\text{mover filtro}} = 0,2$ segundos, $T_{\text{mover filtro 4-1}} = 0,5$ segundos.

30 El QE más alto del chip ICX285 reduce el tiempo $T_{\text{adquisición}}$, mientras que la reducción de tiempo para $T_{\text{mover xy}}$ y $T_{\text{mover filtro}}$ se debe a las etapas de nanomovimiento y al cambiador de filtro, respectivamente. Los tiempos reducidos dan como resultado tiempos totales de 200 segundos (3 minutos, 20 segundos) y 300 segundos (5 minutos) para las alternativas de color por color y de posición por posición, respectivamente. Los tiempos totales de adquisición para ambas alternativas se reducen sustancialmente. De ese modo, aunque el color por color es aún más rápido, la diferencia es suficientemente pequeña para hacer que la posición por posición sea más práctica. De hecho, el tiempo de adquisición reducido permite la formación de imágenes con PE sin interferencia significativa del blanqueo.

Una ventaja adicional de la alternativa de posición por posición es que las células permanecen alineadas.

Finalmente, el presente dispositivo ha sido diseñado para proporcionar unidades fácilmente reemplazables en el campo, que permitan servo amplificadores (4), cámara CCD, conjunto de obtención de imágenes y de óptica de iluminación, objetivo, cubos de filtro, lámpara y alojamiento, ordenador y periféricos, conjunto de obturado/filtro ND, filtros de aire, placa de circuito principal y cables, rápidos y de bajo coste.

5 Las provisiones de seguridad incluyen un obturador de sistema de cierre por enclavamiento de recinto. El enclavamiento de alojamiento de lámpara inhabilita la alimentación de la lámpara. Los vidrios de seguridad del filtro de UV se suministran con el instrumento. Este instrumento puede operar en Estados Unidos, Europa y Japón sin tener que cambiar ninguno de los componentes.

10 Debe entenderse y apreciarse que estas mejoras son solamente ilustrativas de las muchas aplicaciones potenciales del aparato y el método que pueden ser previstas por un experto en la materia, y por lo tanto no se pretende que sean limitativas en modo alguno del alcance de la invención.

15

20

25

30

35

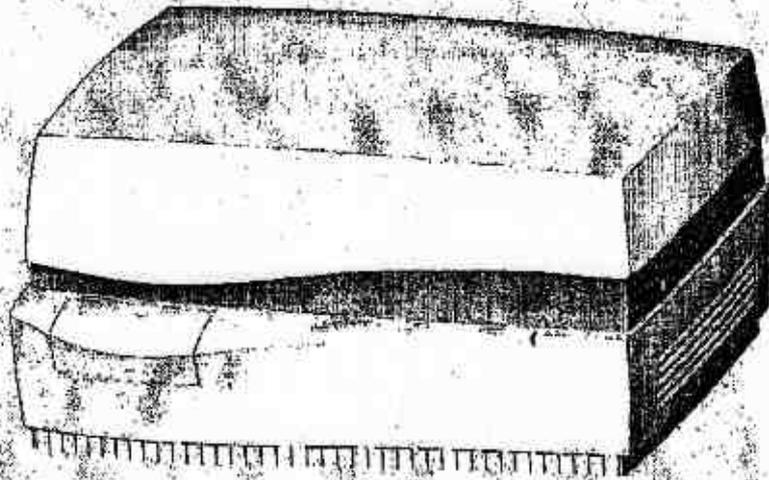
40

REIVINDICACIONES

- 1.- Un sistema automatizado de obtención de imágenes para laboratorio clínico para detectar células raras a partir de una muestra biológica, que comprende:
- 5 a. un sistema de iluminación que comprende una cámara CCD, un conjunto de óptica de iluminación, objetivo, cubos de filtro, lámpara con alojamiento, y un conjunto de obturador/filtro ND;
- b. un conjunto de etapa X-Y-Z movido por medio de un controlador de movimiento, un motor piezoeléctrico y codificadores de posición capacitados para proporcionar una resolución de 0,2 micrones y que tienen una plataforma para posicionar un dispositivo magnético y un cartucho de muestra para la obtención de imágenes;
- 10 c. un sistema de detección fluorescente que tiene una pluralidad de cubos de filtro movidos por medio de un controlador de movimiento, un motor piezoeléctrico y codificadores de posición capacitados para proporcionar una resolución de 0,2 micrones, y
- d. un ordenador con periféricos relacionados en el que a, b, c y d del sistema forman una estructura compacta y autocontenida.
- 15 2.- El sistema de iluminación de la reivindicación 1, en el que dicha lámpara está prealineada.
- 3.- El sistema de iluminación de la reivindicación 1, con capacidad para producir longitudes de onda de excitación de fluorescencia de entre 350 y 1000 nanómetros.
- 4.- El sistema de iluminación de la reivindicación 1, en el que dicho sistema de detección contiene una estructura de iluminación de fondo para alineamiento de dicho cartucho de muestra.
- 20 5.- Un método para adquirir múltiples imágenes a partir de un cartucho de muestra mediante una alternativa de color por color, que comprende:
- a. disponer el sistema en posición de imagen;
- b. mover el cartucho de muestra en la dirección x-y correspondiente a dicha posición, con un controlador de movimiento, un motor piezoeléctrico y codificadores de posición capaces de proporcionar una resolución de 0,2 micrones;
- 25 c. posicionar un cubo de filtro con un controlador de movimiento, un motor piezoeléctrico y codificadores de posición capaces de proporcionar una resolución de 0,2 micrones;
- d. adquirir dicha imagen;
- 30 e. transferir dicha imagen, y
- f. repetir los elementos c a e para una posición x-y en la que dicha repetición se realiza para cubo de filtro.
- 6.- Un método para adquirir múltiples imágenes a partir de un cartucho de muestra mediante una alternativa de posición por posición, que comprende:
- 35 a. posicionar un primer cubo de filtro con un controlador de movimiento, un motor piezoeléctrico y codificadores de posición capaces de proporcionar una resolución de 0,2 micrones;
- b. disponer el sistema en una posición de imagen;
- c. mover el cartucho de muestra en la dirección x-y correspondiente a dicha posición, con un controlador de movimiento, un motor piezoeléctrico y codificadores de posición capacitados para proporcionar una resolución de 0,2 micrones;
- 40 d. adquirir dicha imagen;
- e. transferir dicha imagen;
- f. repetir los elementos b a e para cada posición x-y, y
- g. posicionar otro cubo de filtro para completar los elementos b a f, en el que dichos elementos se repiten para cada cubo.
- 45

Figura 1

Panel-A



Panel-B

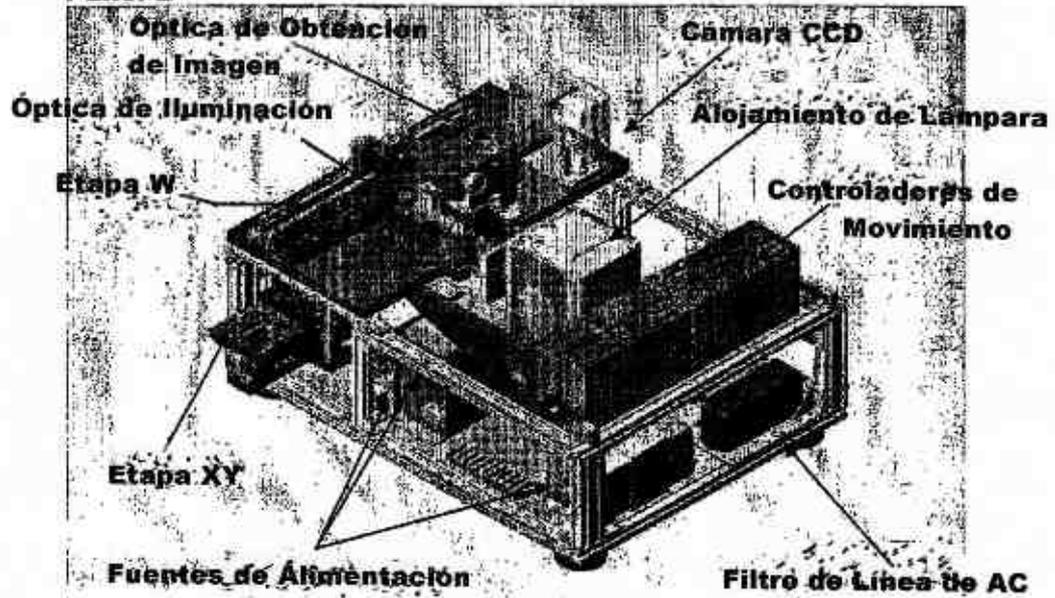


Figura 2

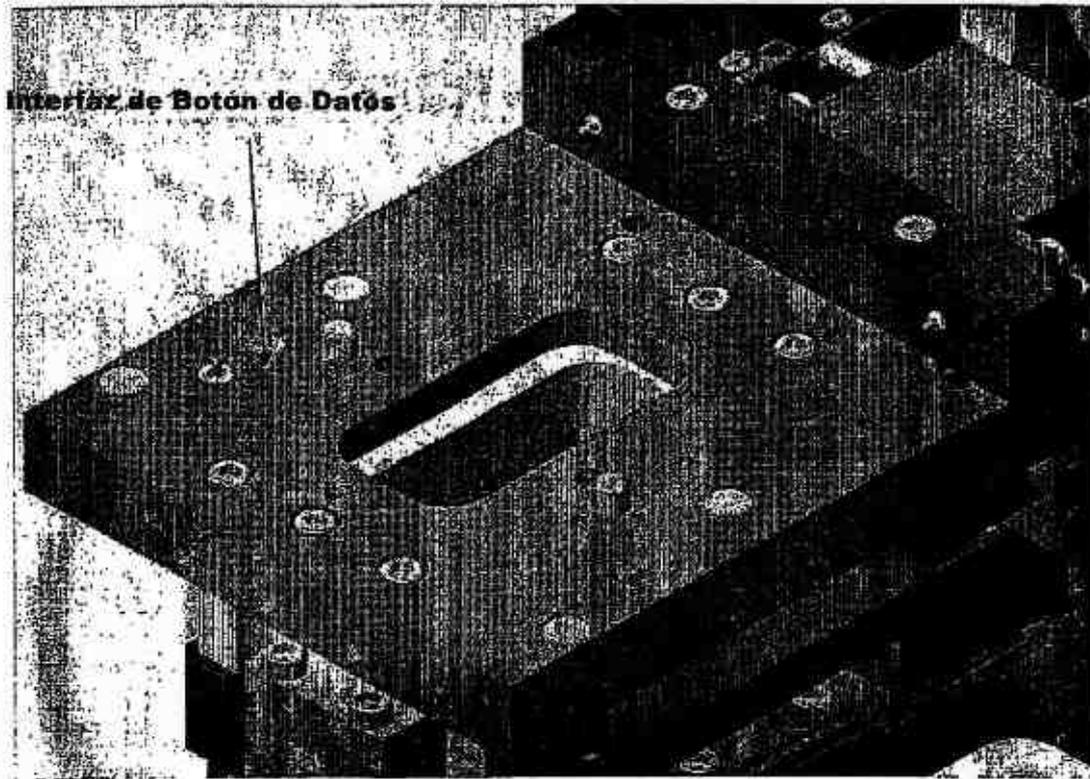


Figura 3

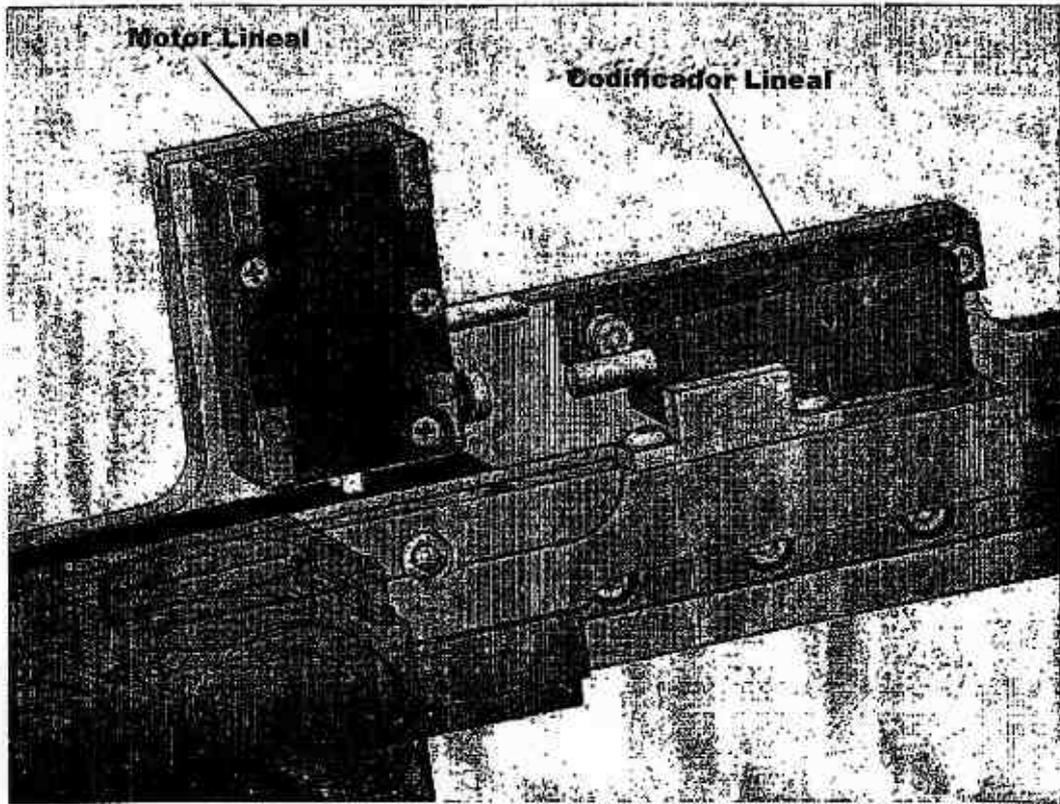


Figura 4

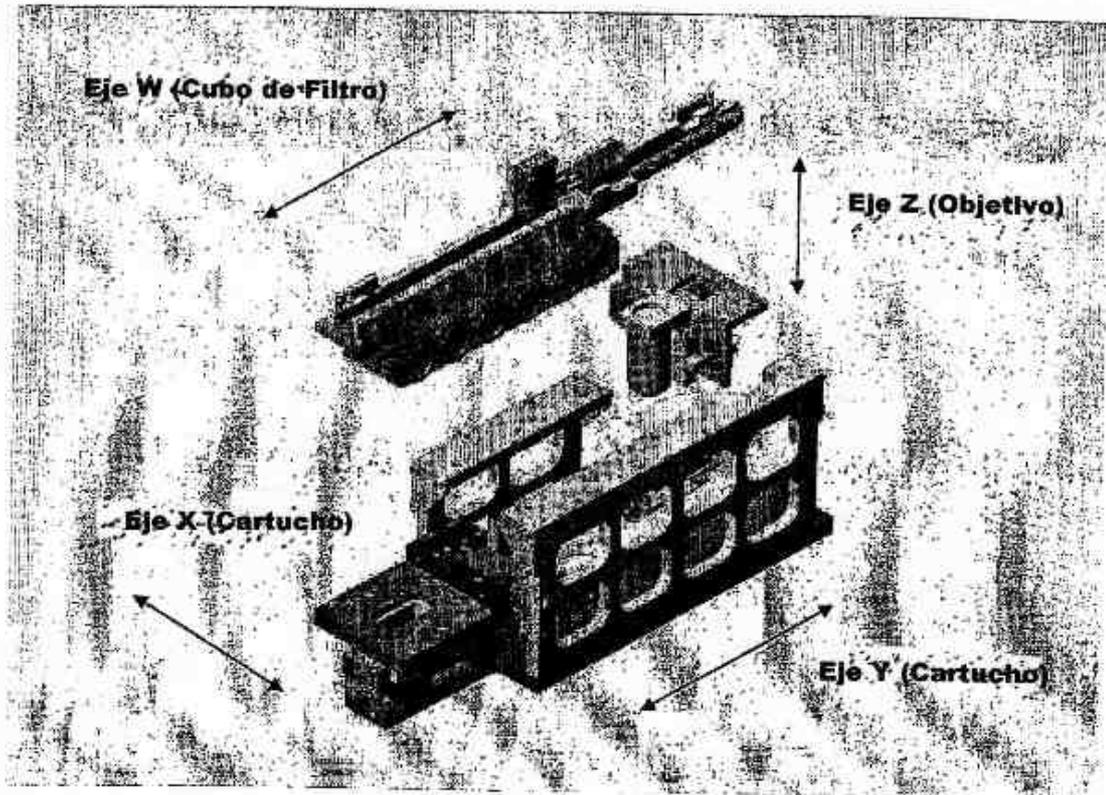


Figura 5

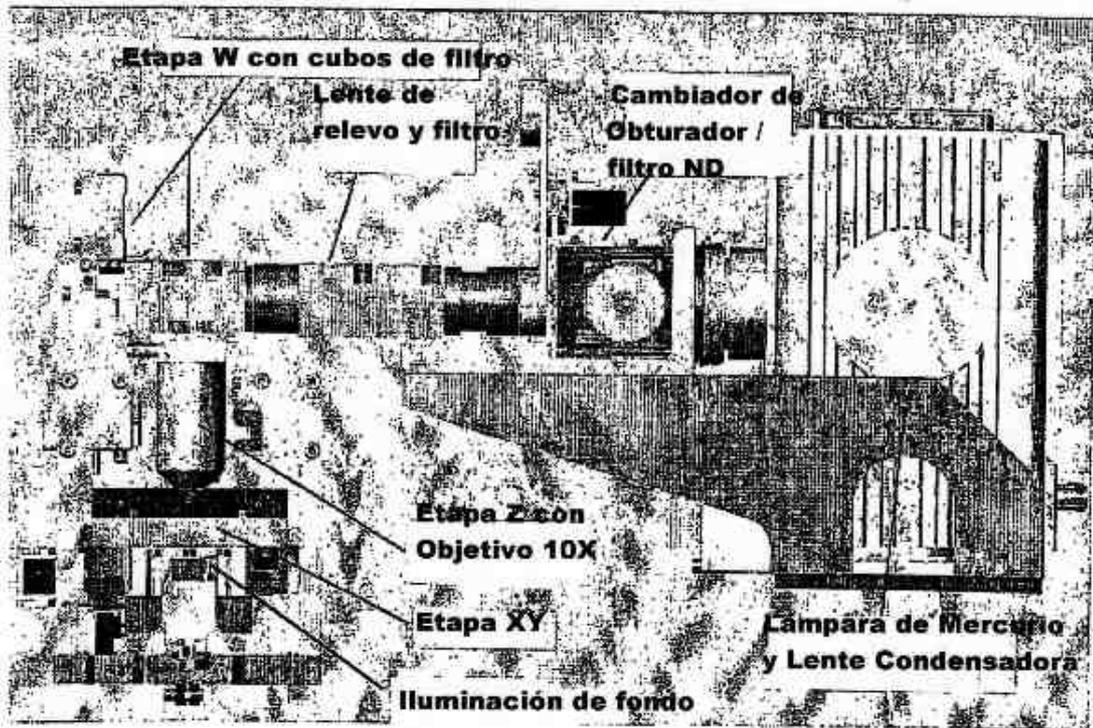


Figura 6

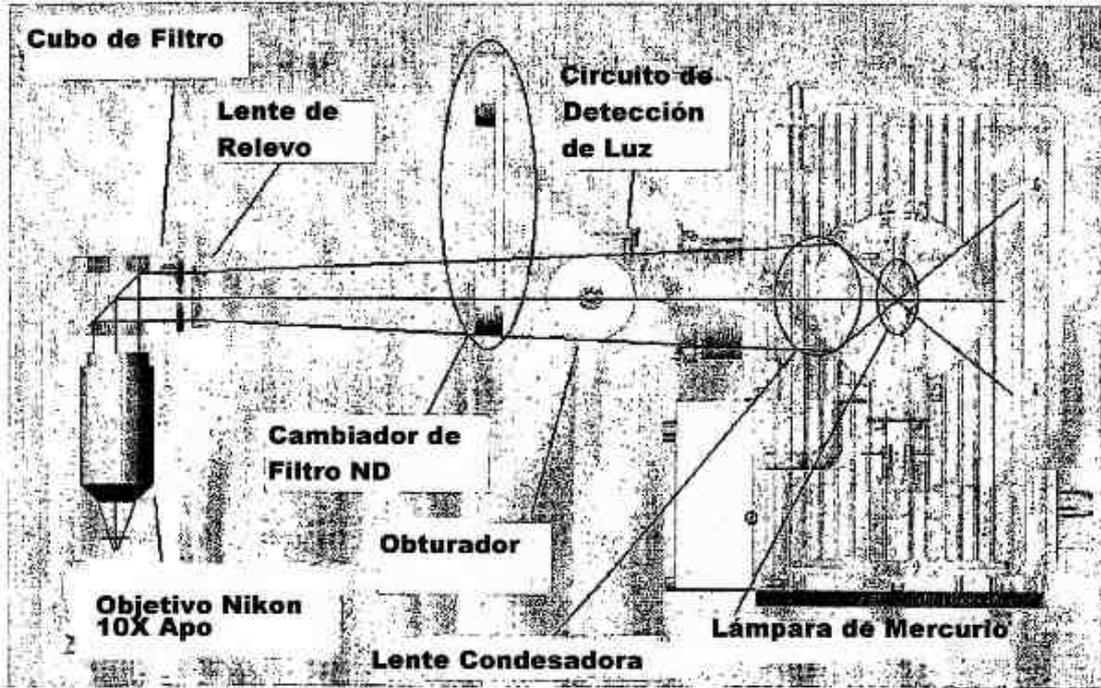


Figura 7

ETAPA #1

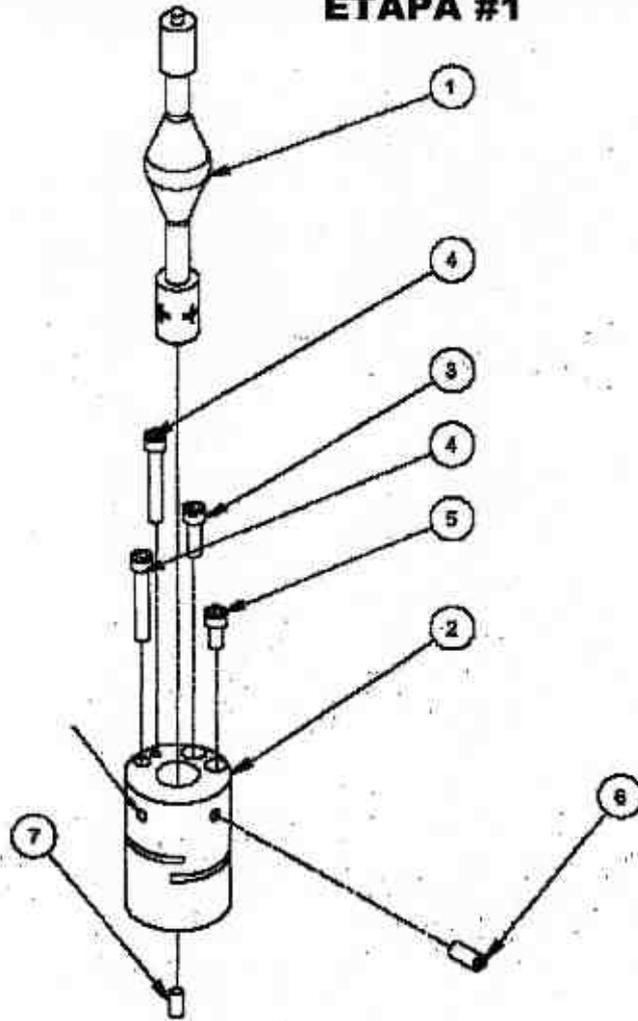


Figura 8

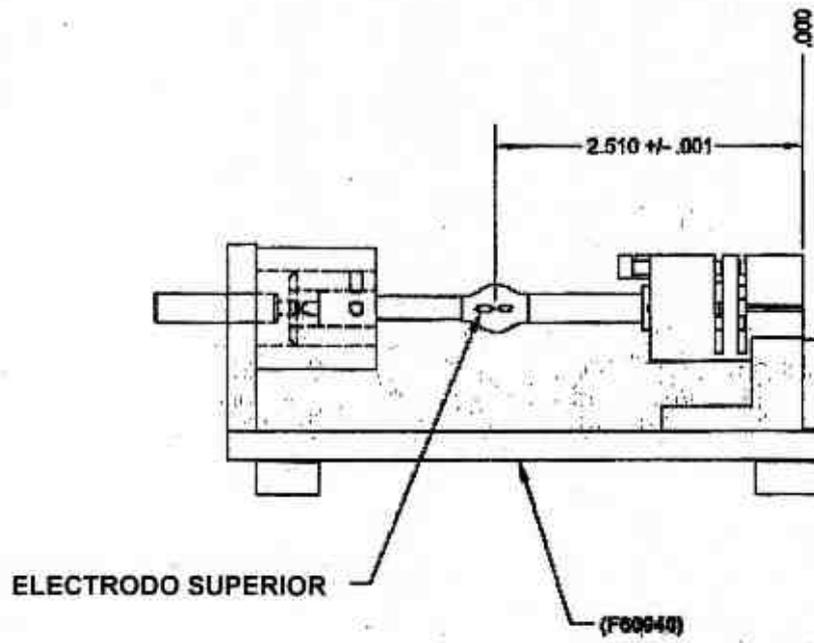
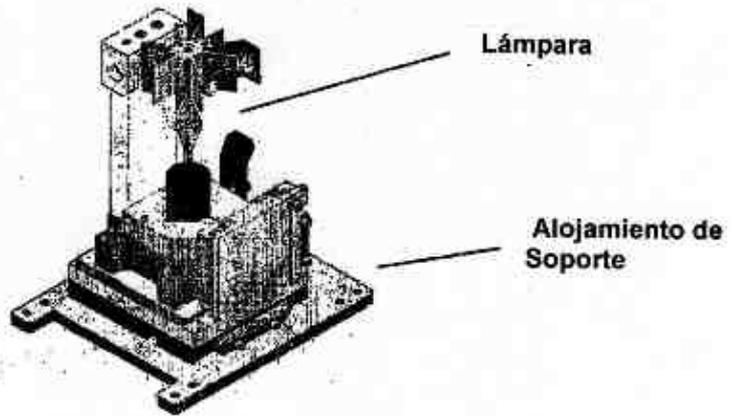
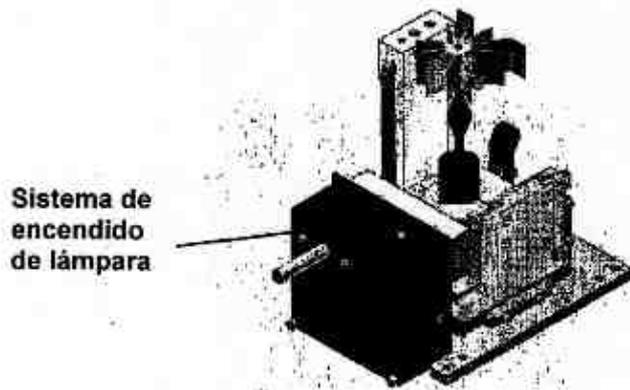


Figura 9

Panel A:



Panel B:



Panel B:

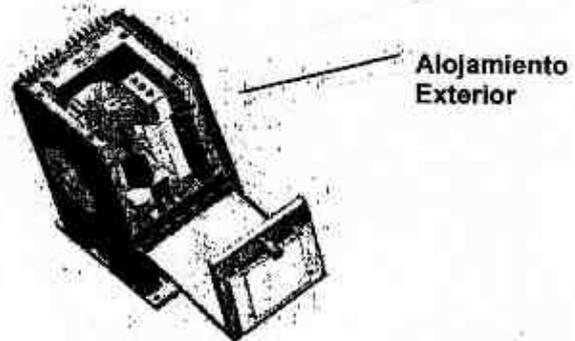
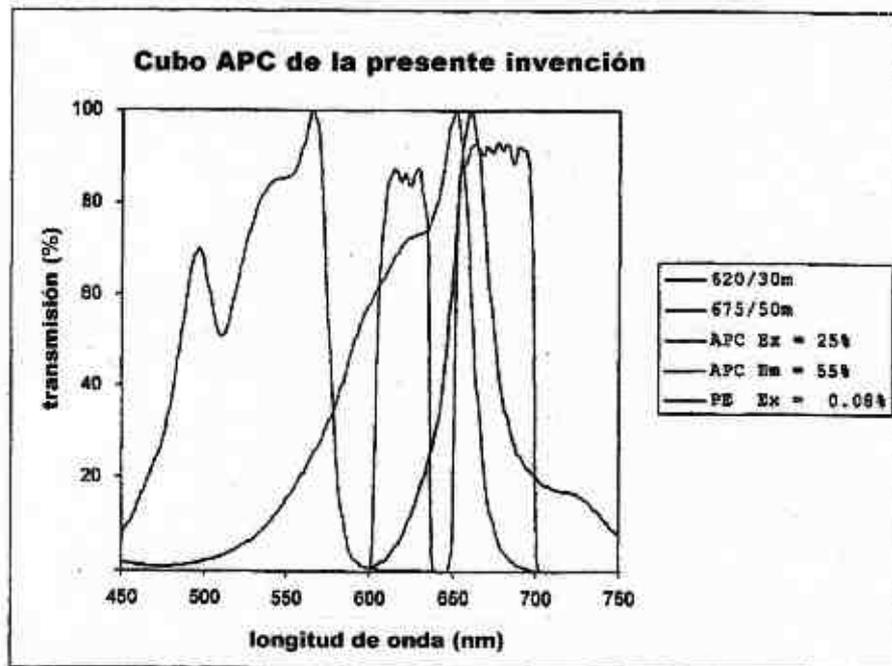
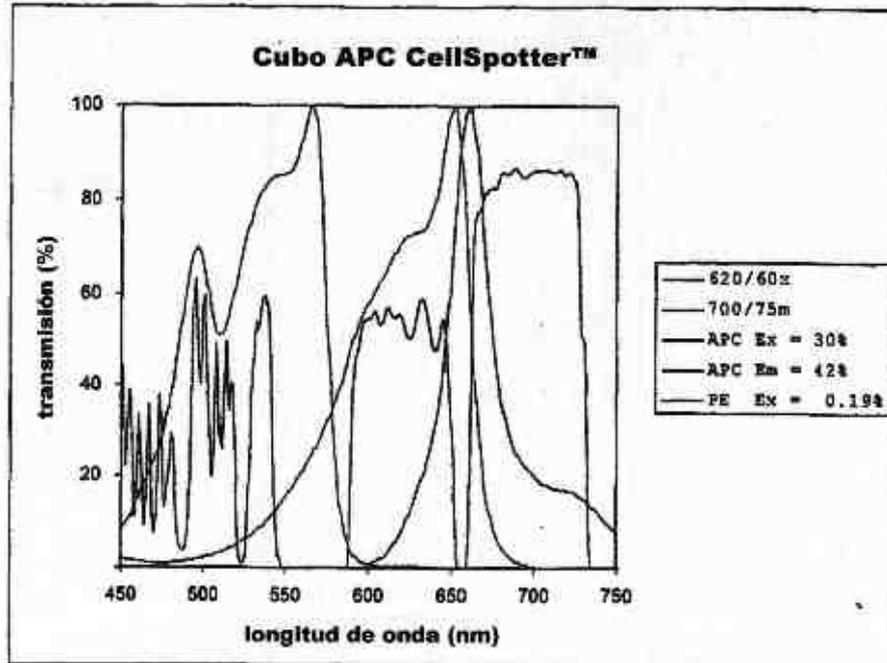
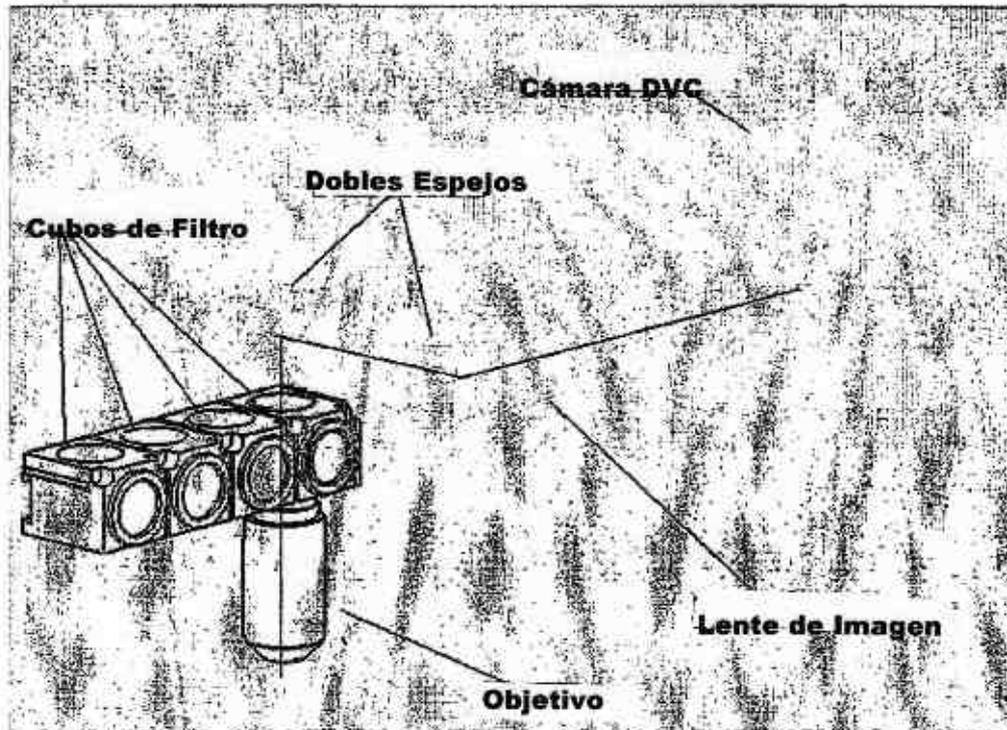


Figura 10



Panel A

Figura 11



Panel B

