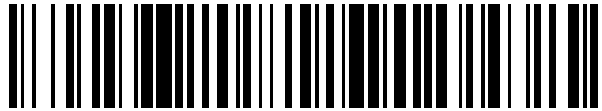


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 504 241**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

G02B 21/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2006 E 10176272 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2270573**

54 Título: **Cubierta para una cámara de recuento, determinación de viabilidad, análisis y manipulación**

30 Prioridad:

02.06.2005 US 142929

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

08.10.2014

73 Titular/es:

**MOFA GROUP LLC (100.0%)
117 East Green Bay Street, P.O. Box 49
Shawano, WI 54166-0469, US**

72 Inventor/es:

SIMMET, LUDWIG O.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 504 241 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

Cubierta para una cámara de recuento, determinación de viabilidad, análisis y manipulación

5 Antecedentes de la invención

Aquí se explican dispositivos para visualizar especímenes para examen bajo ampliación en general, y más en concreto dispositivos para hacer el recuento, la manipulación y la determinación de viabilidad de células.

10 Ante la demanda creciente de productos agrícolas de calidad en un mercado agrícola cada vez más competitivo, las técnicas de inseminación artificial animal (IA) se están difundiendo como medio efectivo de lograr ganado de mejor calidad, reduciendo al mismo tiempo los costos y la mano de obra implicados en las técnicas de cría naturales.

15 Las técnicas de IA requieren la recogida de semen de un animal macho productor, y la inseminación del animal hembra en un tiempo posterior, y generalmente en una posición más o menos alejada del lugar de recogida. Una consecuencia es que el semen a usar puede estar sujeto a degradación o decadencia debido a los efectos de la temperatura, el tiempo o el stress del transporte y almacenamiento. Por lo tanto, hay que analizar la cantidad y el vigor del esperma dentro de una muestra, al determinar las cualidades de fertilización de un eyaculado concreto en el extremo de producción, así como en algunos casos en el extremo de inseminación.

20 Una prueba es el recuento de las cantidades de esperma activo o motil dentro de un volumen de semen dado. El recuento se lleva a cabo con un microscopio o utilizando un fotómetro o con un fotómetro, y solamente considera un subconjunto muy pequeño de toda la muestra. Sin embargo, dado que el sujeto del recuento se está moviendo, la presencia de límites en la zona de recuento puede complicar desventajosamente el procedimiento de recuento. Si la zona de recuento retiene la muestra dentro de límites, la presencia de los límites puede afectar a la exactitud del procedimiento de recuento a causa del efecto que los límites tienen en la distribución del esperma dentro de la zona de muestra. Por ejemplo, parte del esperma se concentrará junto a un límite.

30 Algunos contadores de células, o hemocitómetros, minimizan los límites colocando una sola gota de muestra líquida entre dos placas ópticas formadas con precisión. Sin embargo, estos dispositivos son muy costosos, y por lo tanto deben ser esterilizados y reutilizados. Otros dispositivos desechables emplean una capa serigrafiada para definir canales entre un portaobjetos y una cubierta. Sin embargo, estos dispositivos se basan por lo general exclusivamente en la acción capilar para carga, y deben ser manejados con cuidado para evitar la introducción de burbujas de aire que evitarían el llenado completo de las cámaras de espécimen. Además, los dispositivos de la técnica anterior a menudo alojan solamente una cantidad muy pequeña de líquido, a veces de sólo 1,3 µl, lo que hace problemáticos los análisis que tardan más de unos pocos minutos en realizarse, puesto que el espécimen se puede secar, especialmente, cuando, en el caso de células de esperma, el espécimen se mantiene por encima de la temperatura ambiente en una platina de microscopio caliente.

40 Además, los dispositivos convencionales no se cargan fácilmente mientras están bajo observación, haciendo difícil los análisis comparativos de especímenes antes y después de la adición de alguna sustancia.

Un dispositivo para supervisar un volumen líquido se describe en la Patente de Estados Unidos número 4.761.381.

45 Lo que se necesita es un dispositivo desechable de bajo costo para presentar una capa fina de grosor conocido de una muestra que permita realizar mediciones visuales repetibles y exactas en la muestra.

Resumen de la invención

50 La presente invención se refiere a una cubierta de plástico transparente para colocar sobre un portaobjetos para observar un fluido situado en el portaobjetos, incluyendo la cubierta:

55 un cuerpo de cubierta que tiene una superficie superior y una superficie inferior opuesta, siendo las porciones de la superficie inferior paralelas a una región de observación anular en la superficie superior, una abertura central de entrada de muestra y un agujero de ventilación que se extiende a través del cuerpo de cubierta con la región de observación anular colocada entremedio, rodeando la región de observación anular la abertura central de entrada de muestra, rodeando además un tratamiento superficial de oscurecimiento en una porción del cuerpo de cubierta la región de observación anular, y al menos un nervio que sobresale hacia abajo de la superficie inferior, donde en el uso la cubierta se monta sobre una superficie de un portaobjetos transparente, y donde la superficie inferior de la cubierta está espaciada de la superficie del portaobjetos por el al menos único nervio para definir un canal de flujo capilar en comunicación de fluido con la abertura central de entrada de muestra y el agujero de ventilación.

60 La superficie inferior del cuerpo de cubierta puede definir un canal de rebosamiento rebajado en comunicación con el agujero de ventilación. El tratamiento superficial de oscurecimiento puede incluir depresiones anulares concéntricas o puede incluir un efecto grabado o esmerilado. El cuerpo de cubierta puede incluir además un orificio de entrada secundario que se extiende a través del cuerpo de cubierta dentro de la región de observación anular. La

cubierta de plástico transparente puede no tener paredes que obstruyan el flujo de líquido. La cubierta de plástico transparente puede tener una pluralidad de nervios. El plástico de la cubierta puede incluir copolímeros de olefina cíclica.

5 La cubierta de plástico transparente de esta invención puede ser usada con un portaobjetos de plástico transparente en un dispositivo de análisis para proporcionar una herramienta de análisis desechable de costo razonable para facilitar el recuento o la determinación de células dentro de un volumen definido de muestra fluida, por ejemplo para asistencia en técnicas de inseminación artificial en ganado.

10 Una característica de la presente invención es proporcionar una herramienta de laboratorio desechable que facilite la observación exacta de células contenidas dentro de una muestra fluida.

Otra característica de la presente invención es proporcionar una herramienta económica que facilite la presentación de un volumen definido de muestra fluida con un grosor constante para observación evitando al mismo tiempo el efecto que los bordes dentro de una zona de visión pueden tener en una muestra o sus partes componentes.

15 También se describe un dispositivo para facilitar el recuento de células que se puede llenar rápida y sistemáticamente con la muestra a analizar.

20 También se describe un dispositivo que permite observaciones prolongadas de muestras y que permite que el medio de cultivo de muestra sea complementado mientras la muestra es objeto de observación.

También se describe un método de analizar especímenes bajo ampliación tanto antes como después de la adición de sustancias que actúan sobre el espécimen.

25 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes por la descripción detallada siguiente tomada en unión con los dibujos acompañantes.

Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 es una vista en planta superior fragmentaria de un dispositivo de análisis incluyendo la cubierta de plástico transparente de esta invención, parcialmente cortada en sección.

35 La figura 2 es una vista en sección transversal del dispositivo de la figura 1, incluyendo la cubierta de plástico transparente de la invención, que ha recibido una muestra líquida, y tomada a lo largo de la línea de sección 2-2.

La figura 3 es una vista isométrica despiezada del dispositivo de la figura 1, con dos cubiertas de la invención despiezadas del portaobjetos, y una cubierta de la invención representada en una posición montada.

40 La figura 4 es una vista en sección transversal ampliada del dispositivo de la figura 1, incluyendo la cubierta de plástico transparente de la invención, tomada a lo largo de la línea de sección 4-4.

45 La figura 5 es una vista en perspectiva fragmentaria, parcialmente cortada en sección, de una cámara de espécimen alternativa, representada con una pipeta en vista despiezada.

La figura 6 es una vista en planta fragmentaria ampliada del lado inferior de la cubierta de la figura 1, que representa un solo nervio.

50 La figura 7 es una vista en sección transversal fragmentaria ampliada de un dispositivo alternativo, que tiene un rebaje de recepción de cola en el lado inferior del perímetro de la cubierta.

La figura 8 es una vista en sección transversal de un dispositivo alternativo, en el que la cubierta de la figura 1 está adherida a un portaobjetos de vidrio convencional.

55 La figura 9 es una vista en sección transversal de un dispositivo alternativo que tiene una cubierta con un canal invertido colocado radialmente hacia fuera de la región de observación.

60 La figura 10 es una vista ampliada del dispositivo de la figura 9, tomada en la sección 10-10, para mostrar la estructura de una porción de un nervio de espaciación.

Descripción de las realizaciones preferidas

65 Con referencia más en concreto a las figuras 1 a 10, donde números análogos hacen referencia a partes similares, un dispositivo 20 que facilita el análisis de especímenes bajo ampliación se representa en las figuras 1 a 4. El dispositivo 20 puede servir como un contador de células o hemocitómetro, o puede ser usado para otros análisis de células o elementos no vivos, especialmente para análisis de duración prolongada o comparativos. El dispositivo 20

tiene tres unidades de análisis idénticas 22. Se deberá entender que un solo dispositivo 20 puede tener solamente una unidad de análisis 22 o un número mayor según sea preciso. El dispositivo 20 tiene un portaobjetos transparente rígido 24 que puede ser de aproximadamente una pulgada por tres pulgadas. El portaobjetos tiene cámaras circulares rebajadas 26 cada una de las cuales recibe una cubierta transparente generalmente circular 28. Las cámaras pueden tener aproximadamente 18,7 mm de diámetro, y estar espaciadas una de otra en centros de una pulgada. El portaobjetos puede tener aproximadamente 2,4 mm de grosor, mientras que la cubierta puede tener aproximadamente 0,6 mm de grosor.

Tanto las cubiertas 28 como el portaobjetos 24 se pueden formar de cualquier material no tóxico transparente adecuadamente rígido, por ejemplo copolímeros de olefina cíclica (COC), que se pueden fabricar con claridad de grado óptico. El plástico usado también puede ser policarbonato. Obsérvese que hay preferiblemente una relación paralela entre la superficie de la región de visión 78 no oscurecida, la superficie inferior 32 de la cubierta 28, y la superficie anular 48 de la plataforma de visión.

El portaobjetos 24 tiene dentro de cada cámara 26 una superficie superior 30 que engancha una superficie inferior 32 de la cubierta 28. La superficie superior 30 de la cámara 26 está preferiblemente rebajada debajo de una superficie superior de portaobjetos 34, como se representa en la figura 2. Una pared lateral 38 se extiende entre la superficie superior 30 de la cámara 26 y la superficie superior 34 del portaobjetos. Unos salientes 40 se extienden radialmente hacia dentro de la pared lateral 38, y los salientes son recibidos dentro de ranuras que se extienden radialmente hacia dentro 36 formadas en las cubiertas 28. La cubierta 28 se puede fijar al portaobjetos 24 con una resina adhesiva 39 dispuesta en las ranuras 36, cuando las ranuras son más grandes que los salientes 40 que reciben. La cubierta ha sido fijada al portaobjetos por el fabricante, y así el usuario final no tiene que montar la cubierta ni manejar adhesivos. Como se representa en la figura 2, los adhesivos no entran en contacto con la muestra. La resina adhesiva 39 es preferiblemente un adhesivo a base de solvente, pero también se puede usar adhesivos curables por UV, o soldadura láser para montar la cubierta en el portaobjetos. Como se representa en la figura 7, un dispositivo 104 puede ser similar al dispositivo 20, pero puede tener un rebaje periférico de recepción de cola 106 en el lado inferior de la cubierta 108. La cubierta 108 se adhiere así directamente al portaobjetos 110.

Cada cámara 26 tiene una cavidad central 42 que está rebajada debajo de la superficie superior 30 de la cámara. La superficie superior 30 de la cámara es la porción del portaobjetos que engancha la superficie inferior 32 de la cubierta 28 y que está a un nivel más alto que el nivel de una plataforma de visión 46. Un canal de rebosamiento de forma anular 44 rodea la cavidad central 42, y está separado de la cavidad central por la plataforma de visión anular 46 que rodea la cavidad central. El canal de rebosamiento 44 está rebajado, como se representa mejor en la figura 4, debajo de la plataforma de visión 46. La plataforma de visión 46 tiene una superficie anular plana 48 que está espaciada una distancia constante debajo de la superficie superior 30 de la cámara, y por lo tanto debajo de la superficie inferior 32 de la cubierta superyacente 28. La cavidad central 42 está rebajada debajo del nivel de la superficie 48 de la plataforma de visión. Se define así una cavidad de visión 60 entre la superficie superior 48 de la plataforma de visión y la superficie inferior 32 de la cubierta transparente 28. Esta cavidad también sirve como un canal de flujo capilar en comunicación de fluido con la cavidad 42 y el canal de rebosamiento 44.

La distancia entre la superficie 48 de la plataforma de visión y la superficie superior 30 de la cámara es muy pequeña, por lo general de aproximadamente 5 a 50 micras, preferiblemente de aproximadamente 12 micras o 20 micras, aunque se puede construir dispositivos con diferente espaciación para alojar mejor una célula concreta a observar, siendo 12 micras idóneas para semen de verraco, mientras que 20 micras serían apropiadas para semen de rata. El grosor de la cavidad de visión se define así entre el lado inferior de la cubierta y la superficie plana 48 de la plataforma de visión 46.

Para contribuir al mantenimiento de esta espaciación uniforme, se puede facilitar nervios 50 que se extienden radialmente sobresaliendo hacia abajo de la superficie inferior 32 de la cubierta 28. Los nervios 50 tienen el mismo grosor que la espaciación de la plataforma de visión debajo de la superficie superior 30 de la cámara. Los nervios 50 apoyan contra la plataforma de visión y mantienen la espaciación deseada en las cavidades de visión 60 definidas entre las superficies 48 de la plataforma de visión y la superficie inferior 32 de la cubierta y entre los nervios 50. Las cavidades de visión están en comunicación de fluido tanto con la cavidad central 42 como con el canal de rebosamiento 44. Como se representa en la figura 6, los nervios 50 se pueden formar como aros estrechos cerrados de la pared lateral de nervio 112. La pared lateral de nervio 112 así define un volumen interior de nervio 114 debajo de la superficie inferior 32 de la cubierta, y un volumen exterior de nervio 116 fuera del nervio.

Como se representa en la figura 3, la cubierta 28 tiene una abertura de entrada de muestra fluida 62 que es una abertura ahusada, de aproximadamente 1/8 pulgada de diámetro. La abertura de entrada 62 sirve como un orificio de carga para la unidad de análisis 22 del dispositivo, y está centrada sobre la cavidad central 42. La cavidad central 42 es un plato cóncavo liso, como se representa mejor en la figura 2. La cavidad central puede tener aproximadamente 6 mm de diámetro. La abertura de entrada de fluido 62 está centrada sobre la región central 64 de la cavidad central 42, que es la porción más profunda de la cavidad central. Una rampa de entrada inclinada continua 66 se extiende entre la región central 64 y la superficie 48 de la plataforma de visión. No hay crestas o discontinuidades en la cavidad central 42, y por lo tanto no se impide el flujo libre de fluido.

Se introduce una muestra fluida 68 conteniendo células 70, como esperma, en la cavidad a través de la abertura de entrada 62. Se puede usar una pipeta convencional para dispensar la muestra a la abertura de entrada. La muestra, que puede ser de hasta aproximadamente 20 μl , se introduce lentamente en el dispositivo 20. La cavidad central 42 puede tener un volumen de aproximadamente 7 μl . La muestra es dispensada a la cavidad central desde la pipeta por lo general de tal manera que el nivel de fluido se extienda por encima del nivel de la superficie superior 30 de la cámara. El fluido es aspirado por acción capilar entre la cubierta y la plataforma de visión subiendo por la rampa de entrada inclinada y a las cavidades de visión 60. Sin embargo, además de la acción capilar, la profundidad de la cavidad central 42 también proporciona una fuerza hidráulica que mueve la muestra a las cavidades de visión 60. Dado que no hay paredes que obstruyan el flujo de líquido, el sistema se equilibra muy rápidamente. El fluido pasa a través de las cavidades de visión y rebosa al canal de rebosamiento circundante 44. Al objeto de evitar la resistencia al flujo de fluido por el aire atrapado dentro del canal de rebosamiento 44, un agujero de ventilación 72 se extiende a través de la cubierta 28 en una posición directamente sobre el canal de rebosamiento. Como se representa en la figura 2, el agujero de ventilación comunica con el canal de rebosamiento permitiendo el escape de aire cuando pasa fluido al canal de rebosamiento desde las cavidades de visión 60. El agujero de ventilación 72 puede tener aproximadamente 1 mm de diámetro.

Se ha de notar que el fluido en las cavidades de visión 60 no es retenido ni en el lado de la cavidad central ni en el lado del canal de rebosamiento. Por lo tanto, es posible obtener un recuento exacto de las células en movimiento sin tener que tener en consideración las células que reboten de un límite fijo. Los límites de las cavidades de visión 60 que presentan los nervios 50 son comparativamente pequeños, y en el transcurso de las observaciones se puede tener cuidado en hacer un recuento en una región suficientemente espaciada de un nervio para minimizar el impacto en dicho límite. Además, el dispositivo se puede fabricar sin nervios, si se desea. Se deberá indicar que, cuando se use en análisis de células de esperma, las células de esperma estarán normalmente en movimiento mientras están bajo observación, y pueden pasar células de esperma al canal de rebosamiento desde la plataforma de visión, y pueden pasar desde el canal de rebosamiento de nuevo a la plataforma de visión.

Para ayudar al observador a hacer observaciones solamente en la región poco profunda de las cavidades de visión 60, la superficie superior 74 de la cubierta 28 está provista preferiblemente de un tratamiento superficial de oscurecimiento 76 en porciones de la cubierta que rodean una región de visión no oscurecida en forma de aro 78. El tratamiento superficial de oscurecimiento 76 puede ser una serie de depresiones concéntricas poco profundas en forma de aro, como se representa en la figura 1. También se puede emplear un efecto grabado o esmerilado para el tratamiento superficial de oscurecimiento 76.

A causa de las observaciones muy esmeradas que hay que efectuar bajo ampliación, es deseable que la superficie 48 de la plataforma de visión, las superficies de la cubierta, y el lado inferior 80 del portaobjetos sean lo más claros y no obstruidos posible. Estas superficies deberán ser de calidad de grado óptico. Las superficies que tienen que ser ópticamente claras se pueden fabricar puliendo el molde de formación al grado requerido. Típicamente, las cubiertas y el portaobjetos se formarán en un proceso de moldeo por inyección. Las partes del dispositivo a través de las que se realizan las observaciones, deberán formarse en moldes que hayan sido pulidos con exactitud para evitar manchas que deteriorarían excesivamente las propiedades ópticas del dispositivo. Las superficies de molde se pueden formar con talladoras rotativas y de volante de diamante, como hace la división NetOptix de Corning Incorporated, www.corningnetoptix.com. Aunque no es necesario cuando se usa con sistemas de recuento automatizados, se puede formar una rejilla en la cubierta o portaobjetos para facilitar el recuento de células dentro de una región definida de una cavidad de visión 60.

Para protección contra el rayado en el lado inferior 80 del portaobjetos, se puede formar una región en relieve 82, como se representa en la figura 2, debajo de las cavidades de visión 60. La región en relieve mantiene el lado inferior 80 espaciado del contacto inmediato con una encimera, la platina de microscopio, etc, y ayuda a evitar el rayado. La profundidad del relieve es suficientemente pequeña de modo que el calor procedente de una platina de microscopio caliente no impida apreciablemente la llegada de la muestra. Para hacer las observaciones, el dispositivo 20 se colocará sobre una plataforma iluminada debajo de un objetivo de microscopio. Alternativamente, el dispositivo puede ser usado con sistemas a base de vídeo para el recuento de esperma.

A causa del bajo costo de un dispositivo que se hace de piezas de plástico moldeadas, el dispositivo 20 puede ser desechado fácilmente después del uso. Al ser desechable, no solamente se elimina el gasto de limpiar el dispositivo, sino también la posibilidad de contaminar muestras con material usado anteriormente.

Aunque los nervios 50 pueden ser salientes sólidos descendentes, la construcción de cada nervio como un aro cerrado de estrecha pared lateral de nervio 112 permite que los nervios sirvan como una medida de control de calidad al montar el dispositivo 20. Se observará que si la cubierta se monta adecuadamente con adhesivo en el portaobjetos, las paredes laterales 112 del nervio engancharán contra el portaobjetos con el fin de formar una junta estanca a los líquidos. Si, debido a algún error de fabricación, no se obtiene una junta estanca a los líquidos, entonces, una vez introducido el líquido en el dispositivo, el líquido puede entrar en el volumen interior 114 de un nervio. Esta entrada de líquido al volumen interior del nervio será detectable bajo ampliación, e indicará al usuario del dispositivo que es defectuoso, permitiendo al usuario desechar la unidad defectuosa y continuar las observaciones con uno nuevo.

Como se representa en la figura 6, los nervios 50 se pueden formar como aros cerrados estrechos de la pared lateral de nervio 112. La pared lateral de nervio 112 define así un volumen interior de nervio 114 debajo de la superficie de cubierta inferior 32, y un volumen exterior de nervio 116 fuera del nervio.

5 Se deberá indicar que, aunque el dispositivo que incluye la cubierta de plástico transparente de esta invención se ha representado como circular en general, también son posibles configuraciones lineales u otras.

10 En la figura 5 se representa un dispositivo alternativo 84 que permite la adición preparada de sustancias tales como sustancias químicas, componentes activos, colorantes, antibióticos u otros aditivos, a una muestra bajo observación. El dispositivo 84 puede ser idéntico al dispositivo 20, a excepción de que se coloca en la cubierta transparente 88 un orificio de entrada secundario 86 que recubre el portaobjetos 90. El orificio de entrada 86 es una abertura de diámetro pequeño colocada en la región de visión no oscurecida 92 de la cubierta 88 para recubrir directamente la plataforma de visión 94 que está colocada entre la cavidad central 96 y el canal de rebosamiento 98. El orificio de entrada 86 recibe la punta de una pipeta 100 para permitir la introducción de sustancias a la muestra 102 bajo observación. El dispositivo 84 permite así que una porción de la muestra 102 sea observada antes, durante y después de la introducción de alguna sustancia que pueda alterar el aspecto de la muestra.

20 El dispositivo 84 es especialmente útil para determinar el efecto de aditivos concretos en especímenes vivos por observación mientras un aditivo penetra en el medio de cultivo. Por ejemplo en pruebas de stress farmacológico, se comprueban los efectos de una medicación o producto farmacéutico en la motilidad del esperma. Por ejemplo, un espécimen de semen de verraco puede ser observado en la plataforma de visión 94 y se puede determinar y registrar la motilidad de las células de esperma. Entonces se puede introducir alguna sustancia aditiva a la muestra en la plataforma de visión inyectando un aditivo a través del orificio de entrada. Entonces se pueden analizar sustancialmente las mismas células de esperma que las previamente observadas inmediatamente después de su contacto con el aditivo. Tal técnica también puede ser especialmente útil en procedimientos de análisis que requieran el tinte o tinción de la muestra con el fin de observar características concretas de la muestra. Por ejemplo, en microscopía de excitación multifotónica o microscopía confocal (excitación de fotón único) se usan bajos niveles de luz para excitar un tinte fluorescente añadido a la muestra. El tinte, aunque hace más evidentes algunas características de la muestra, puede tener efectos nocivos en muestras vivas. El dispositivo 84 permite observar primero con esmero el vigor y las características biológicas de la muestra, y luego las características especiales solamente visibles con el tratamiento de tinte a observar. Así se puede averiguar y corregir todo impacto nocivo del tinte. El dispositivo también se puede usar para prueba de eficacia de antibióticos y otras sustancias, donde las reacciones de las células bajo observación se pueden ver en el tiempo. Por ejemplo, se podrían ver bacterias indeseables en las cavidades de visión, mientras se añade un antibiótico concreto o una concentración de antibiótico a través del orificio de entrada secundario. Entonces se podría determinar el efecto del antibiótico en el crecimiento de las bacterias, sin la necesidad de quitar el dispositivo de la platina de microscopio.

40 Se deberá indicar que muchos tipos de plástico son naturalmente algo hidrófobos, con el resultado de que la acción capilar de líquido es retenida entre dos hojas de estos tipos de plástico. Para superar esta propiedad de algunos plásticos, puede ser necesario tratar el material de forma convencional para hacerlo más hidrófilo. Este tratamiento puede incluir aplicar un plasma de oxígeno a la superficie, o algún tipo de tratamiento en corona, o deposición en plasma de gas de capas inertes de metal, tal como oro.

45 Para obtener las propiedades hidrófilas deseables del vidrio, se puede usar una cubierta de plástico de esta invención en conexión con un portaobjetos de vidrio, como en los dispositivos 120, 126, representados en las figuras 8 y 9. El dispositivo 120, representado en la figura 8, fija la cubierta 28 del dispositivo 20 directamente a un portaobjetos de vidrio convencional 122. Los nervios 50 sirven para espaciar la superficie inferior 32 de la cubierta 28 la distancia uniforme deseada por encima de la superficie superior 124 del portaobjetos de vidrio 122. Resina adhesiva 39 fija la cubierta al portaobjetos 122. Sin embargo, el adhesivo se coloca solamente dentro de las ranuras 36, dejando el resto del perímetro de la cubierta abierto al exterior. Cuando se introduce la muestra fluida 68 en la abertura de entrada de muestra 62, la abertura de entrada de muestra sirve como una cavidad central. La muestra 68 es empujada entonces de modo que fluya por debajo de la región de visión 78, tanto por acción capilar como por la fuerza hidráulica de la muestra dentro de la abertura de entrada. El agujero de ventilación 72 que está en comunicación con la superficie inferior de la cubierta 28, permite que cantidades excedentes de la muestra fluyan hacia arriba en él, y también evita que el aire capturado debajo de la cubierta forme una burbuja que bloquearía el flujo de muestra. Es aceptable que una pequeña porción de la muestra pase hacia fuera por debajo de la cubierta alrededor de la periferia.

60 El dispositivo alternativo 126, representado en las figuras 9 y 10, también emplea un portaobjetos de vidrio convencional 122, pero difiere del dispositivo 120 en que tiene una cubierta de plástico 128 con un canal de rebosamiento 130 que se extiende hacia arriba. El canal de rebosamiento 130 es una región semianular en relieve que está colocada rodeando la abertura de entrada de muestra 132. El canal de rebosamiento 130 proporciona un volumen que recibe la muestra introducida a través de la abertura de entrada 132. Los nervios 134 que sobresalen hacia abajo, representados en la figura 10, espacian la superficie inferior 136 de la cubierta 128 de la superficie superior 124 del portaobjetos de vidrio 122. La cubierta 128 está fijada al portaobjetos 122 con la resina adhesiva 39

colocada dentro de ranuras 138 en la periferia de la cubierta. El canal de rebosamiento 130 comunica con la superficie superior 140 de la cubierta a través de un agujero de ventilación 142 que permite el escape de burbujas de aire. Se define una región de visión no oscurecida 144 de la cubierta 128 entre la abertura de entrada de muestra 132 y el canal de rebosamiento 130. Los nervios 134 mantienen la espaciación de la superficie inferior de la cubierta de la superficie superior del portaobjetos debajo de la región de visión no oscurecida 144, y se pueden efectuar observaciones de la muestra en dicha región.

Se deberá indicar que la cubierta 128 puede ser usada en combinación con el portaobjetos de plástico 24 descrito anteriormente, de tal manera que el canal de rebosamiento 130 recubra el canal de rebosamiento 44, formando un canal combinado encima y debajo del nivel superior del portaobjetos.

En cualquier régimen de observación que requiera un período prolongado de tiempo para su realización, del rango de treinta minutos o más, los efectos de la platina de microscopio caliente pueden hacer que la muestra empiece a secarse, produciendo un impacto indeseable en organismos vivos. Los dispositivos aquí mostrados son especialmente adecuados para observaciones prolongadas, porque, aunque la región observada dentro de las cavidades de visión es muy poco profunda, la cavidad central 42, 96 y el canal de rebosamiento 44 son significativamente más profundos, y proporcionan una mayor capacidad de muestra. Además, se puede añadir fluido adicional en forma de más medio de cultivo a la muestra a través de la abertura de entrada de muestra 62 durante el transcurso de la observación para compensar la evaporación de líquido.

Además de usarse para el análisis bajo ampliación de elementos dentro de un fluido tal como organismos vivos o células en un medio de cultivo, los dispositivos aquí mostrados pueden ser usados en genómica y proteómica para la observación de otros elementos tal como fragmentos de ADN, proteínas, etc. Al ofrecer la capacidad de observar el espécimen mientras interactúa con aditivos, los dispositivos hacen posibles las observaciones de causa y efecto.

Los dispositivos aquí explicados proporcionan un volumen de muestra ventajosamente mayor que en muchos dispositivos de la técnica anterior. El mayor volumen de muestra tenderá a compensar el error de dilución que se produce cuando se diluye el espécimen original para hacer una muestra adecuada para examen bajo microscopio. Al producir una muestra diluida, existe la posibilidad de que la muestra diluida no sea totalmente homogénea, y por ello puede exhibir variaciones en la concentración de células en todo el espécimen. En la medida en que sea posible tomar una mayor porción de la muestra, estas variaciones de concentración pueden ser superadas. Los dispositivos aquí explicados proporcionan efectivamente un recipiente sin paredes, y un grosor de fluido exactamente espaciado que permite un flujo dinámico del esperma desde depósitos en múltiples lados de la plataforma de visión. Tal disposición da lugar a movimiento del esperma y a una supervivencia más larga.

Se entiende que la invención no se limita a la construcción y disposición concretas de las partes aquí ilustradas y descritas, sino que abarca todas sus formas modificadas que caigan dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

1. Una cubierta de plástico transparente (28) (88) (128) para colocación sobre un portaobjetos (24) (90) (122) para observar un fluido situado en el portaobjetos (24) (90) (122), incluyendo la cubierta (28) (88) (128):
- 5 un cuerpo de cubierta (28) (88) (128) que tiene una superficie superior (74) (140) y una superficie inferior opuesta (32) (136), siendo porciones de la superficie inferior (32) (136) paralelas a una región de observación anular (78) (92) (144) en la superficie superior (74) (140), una abertura central de entrada de muestra (62) (132) y un agujero de ventilación (72) (142) que se extiende a través del cuerpo de cubierta (28) (88) (128) con la región de observación anular (78) (92) (144) colocada entremedio, rodeando la región de observación anular (78) (92) (144) la abertura central de entrada de muestra (62) (132), también un tratamiento superficial de oscurecimiento (76) en una porción del cuerpo de cubierta (28) (88) (128) que rodea la región de observación anular (78) (92) (144), y al menos un nervio (50) (134) que sobresale hacia abajo de la superficie inferior (32) (136), donde en el uso la cubierta (28) (88) (128) está montada sobre una superficie (30) (124) de un portaobjetos transparente (24) (90) (122), y donde la superficie inferior (32) (136) de la cubierta (28) (88) (128) está espaciada de la superficie (30) (124) del portaobjetos (24) (90) (122) por el al menos único nervio (50) (134) para definir un canal de flujo capilar (60) en comunicación de fluido con la abertura central de entrada de muestra (62) (132) y el agujero de ventilación (72) (142).
- 10
- 15
2. La cubierta de plástico transparente (128) de la reivindicación 1, donde la superficie inferior (136) del cuerpo de cubierta (128) define un canal de rebosamiento rebajado (130) en comunicación con el agujero de ventilación (142).
- 20
3. La cubierta de plástico transparente (28) (88) (128) de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el tratamiento superficial de oscurecimiento (76) incluye depresiones anulares concéntricas.
- 25
4. La cubierta de plástico transparente (28) (88) (128) de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el tratamiento superficial de oscurecimiento (76) incluye un efecto grabado o esmerilado.
- 30
5. La cubierta de plástico transparente (88) de la reivindicación 1, donde el cuerpo de cubierta (88) incluye además un orificio de entrada secundario (86) que se extiende a través del cuerpo de cubierta (88) dentro de la región de observación anular (92).
- 35
6. La cubierta de plástico transparente (28) (88) (128) de la reivindicación 1, que no tiene paredes que obstruyan el flujo de líquido.
- 40
7. La cubierta de plástico transparente (28) (88) (128) de cualquier reivindicación anterior, que tiene una pluralidad de nervios.
8. La cubierta de plástico transparente (28) (88) (128) de cualquier reivindicación anterior, donde el plástico incluye copolímeros de olefina cíclica.

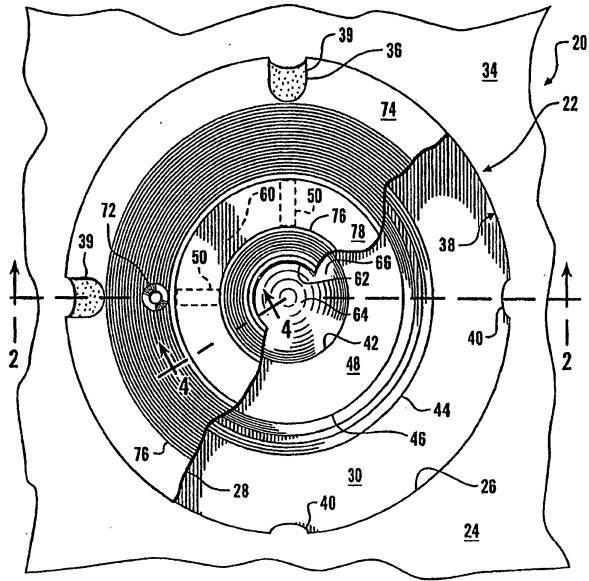


FIG. 1

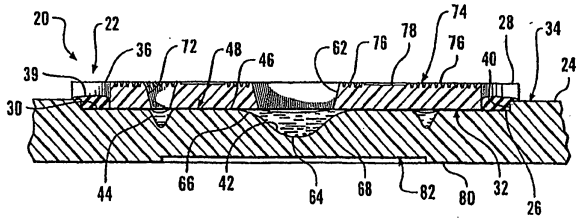
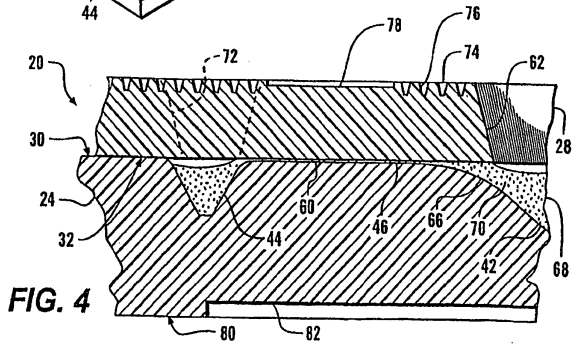
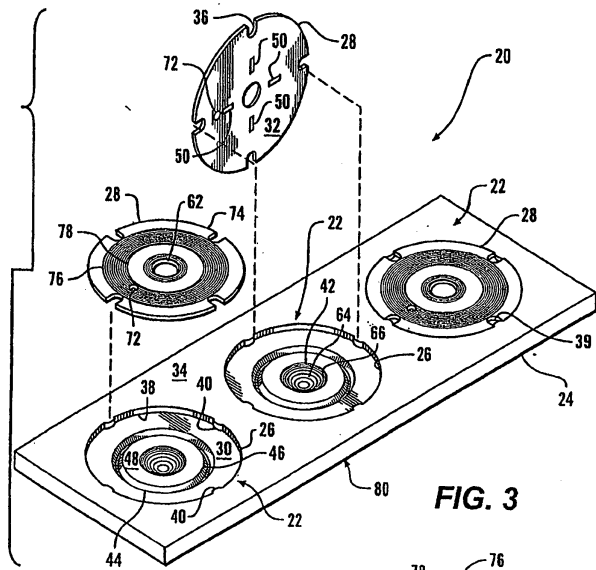
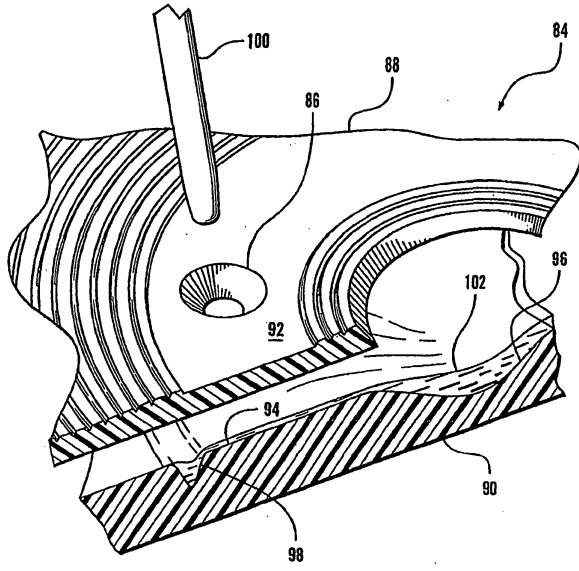


FIG. 2





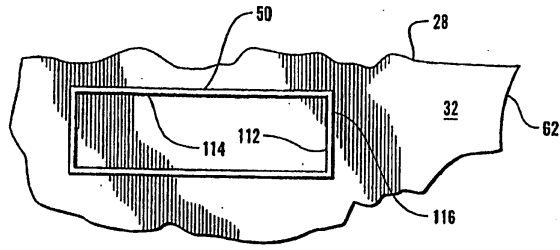


FIG. 6

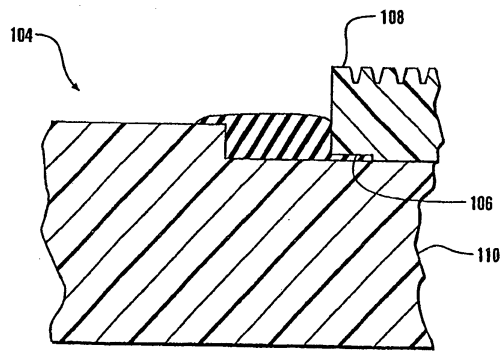


FIG. 7

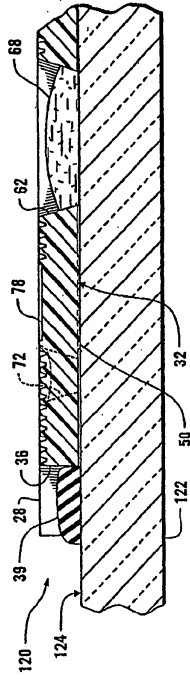


FIG. 8

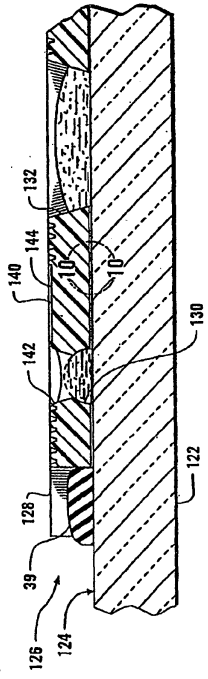


FIG. 9

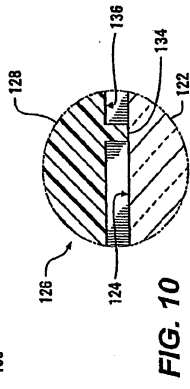


FIG. 10