

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 353**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/34** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2009 E 09290704 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2166082**

54 Título: **Dispositivo para análisis microbiológico**

30 Prioridad:

**23.09.2008 FR 0856407**

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

**02.11.2017**

73 Titular/es:

**EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)  
290 CONCORD ROAD  
BILLERICA, MA 01821, US**

72 Inventor/es:

**WAICHE, GAËL**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 640 353 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Dispositivo para análisis microbiológico

La presente invención se refiere a un dispositivo para el análisis microbiológico de soportes que pueden contener microorganismos, con el fin de detectar la presencia o ausencia de esos microorganismos.

5 Una manera de analizar tales soportes consiste en detectar la presencia de los microorganismos mediante el análisis de la fluorescencia emitida por esos microorganismos una vez que han sido marcados con lo que se ha referido como marcadores fluorogénicos o fluoróforos.

Estos marcadores tienen la particularidad de emitir fluorescencia únicamente cuando han sido activados de antemano por una enzima contenida en los microorganismos.

10 Estos marcadores comprenden, generalmente, un grupo fluoróforo así como un grupo capaz de ocultar o evitar que se muestre la fluorescencia del grupo fluoróforo. Cuando están presentes los microorganismos, el efecto de la enzima de los mismos consiste en modificar ese segundo grupo con el fin de que la fluorescencia del primer grupo pueda ser detectada.

15 De esta forma, como se ilustra por los espectros 53 y 54 de la Figura 7, cuando los microorganismos así marcados son sometidos a una luz de excitación apropiada, el grupo fluoróforo es capaz de absorber energía luminosa con un espectro de absorción 53 cuya cresta 53' se encuentra en una longitud de onda  $\lambda_2$ , y de liberar esa energía en la forma de un espectro de emisión fluorescente característico 54 cuya cresta 54' se encuentra en una longitud de onda  $\lambda_3$ , distinta de  $\lambda_2$ .

20 Para observar la fluorescencia emitida por los microorganismos en presencia de tales marcadores, y como se ilustra en la Figura 9, se conocen ya dispositivos (integrados en microscopios) para el análisis microbiológico que comprenden medios de iluminación para emitir la luz de excitación y cuyo espectro 50, con una forma de distribución gaussiana, tiene una cresta 50' en una longitud de onda  $\lambda_1$  que se escoge igual a la longitud de onda  $\lambda_2$  para excitar el fluoróforo con la suficiente energía como para que este emita, en presencia de microorganismos, luz con su espectro de emisión 54.

25 Semejante dispositivo está provisto de un filtro de entrada, dispuesto entre los medios de iluminación y el soporte con el fin de iluminar, tal como el filtro de paso de banda cuyo espectro 51 se ilustra en la Figura 9, de manera que este filtro tiene una banda de paso muy estrecha centrada en la longitud de onda  $\lambda_1$ , a fin de seleccionar, dada la amplia anchura espectral de los medios de iluminación correspondientes al espectro 50, únicamente la longitud de onda que resulta de utilidad para excitar el fluoróforo apropiadamente en la energía deseada.

30 Este dispositivo también comprende un filtro dispuesto entre el soporte para analizar y la zona para ver la luz que llega desde el soporte, de tal manera que el filtro se ilustra por el espectro 52 de la Figura 9 (aquí, un filtro de paso de banda con una banda de paso estrecha y centrada en la longitud de onda  $\lambda_2$ ), a fin de dejar pasar únicamente la luz que se emite por el fluoróforo en respuesta a la luz de excitación, de la que se eliminan por filtrado todo el resto de longitudes de onda extrañas.

35 Dispositivos que tienen tal disposición se describen, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N° US 7.397.602. La Solicitud PCT N° 02/061405 describe un dispositivo de mano portátil con esta clase de disposición, pero para discriminar entre tejido normal y tejido enfermo de un paciente.

40 La invención se refiere a la provisión de un dispositivo para llevar a cabo, como el dispositivo de la técnica anterior, la detección de la fluorescencia pero que es tanto más económico como más simple, al tiempo que proporciona un rendimiento que es igual de bueno.

45 El corrimiento espectral entre las crestas de los espectros de excitación y de absorción con la longitud de onda de absorción  $\lambda_2$ , que está, de este modo, situada entre las longitudes de onda de excitación  $\lambda_1$  y de emisión  $\lambda_3$ , hace posible, ventajosamente, situar entre esas longitudes de onda de absorción y de emisión la porción del espectro de la luz de excitación situada más allá de  $\lambda_1$ , a fin de obtener luz que tiene alta energía a la longitud de onda  $\lambda_2$  para excitar el fluoróforo de manera que este emita luz por fluorescencia, y que tenga un pequeño solapamiento del espectro de excitación con el espectro de emisión a la longitud de onda  $\lambda_3$  (y a las longitudes de onda vecinas), a fin de que la luz que llega desde los medios de iluminación y que se refleja en el soporte que se ha de analizar no provoque una interferencia parásita significativa con la luz emitida por el agente fluoróforo en presencia de microorganismos, de tal modo que se facilita la discriminación de la luz emitida por el agente fluoróforo de la que llega de los medios de iluminación.

50 Más particularmente, al ser, de esta forma, el solapamiento entre el espectro de excitación y el espectro de emisión pequeño en virtud del corrimiento espectral del dispositivo de acuerdo con la invención, la cresta del espectro de emisión del fluoróforo está más desprendida con respecto a la cresta del espectro de la luz de excitación, y se mejora considerablemente la relación entre la energía parásita en la longitud de onda de emisión del fluoróforo (que tiene su origen en la luz emitida por los medios de iluminación en esa longitud de onda) y la energía que llega

realmente de la fluorescencia los microorganismos marcados.

Es así posible detectar fácilmente en el soporte los puntos brillantes correspondientes a los microorganismos marcados, con el contraste suficiente para que sean claramente observables y, en particular, a simple vista.

5 El corrimiento espectral hace posible, de esta forma, incluso para medios de iluminación que tienen una dispersión espectral no despreciable (tal como la que se ilustra por los espectros 50 y 55 en las Figuras 7 y 9), prescindir de disponer el filtro de entrada de los dispositivos de la técnica anterior, sin que sea necesario, sin embargo, reemplazar tales medios de iluminación por otros medios de iluminación cuya dispersión espectral sea más baja (tales como, por ejemplo, un láser, que es, en general, extremadamente costoso).

10 Ello hace, de esta forma, posible reducir significativamente el coste de fabricación de semejante dispositivo, al tiempo que se minimizan las pérdidas de energía luminosa, puesto que la presencia de un filtro de entrada, en particular, un filtro con una banda de paso estrecha, conduce necesariamente a una caída sustancial en la entrega de energía (y, por consiguiente, en la calidad de la luz que llega al soporte que se ha de iluminar) para semejante dispositivo.

15 Como las pérdidas de energía luminosa son menores en el dispositivo del conjunto de acuerdo con la invención, es, así, posible, para un mismo consumo de energía eléctrica, iluminar superficies de soporte para su análisis (tales como las superficies de membranas de filtro microporosas, por ejemplo) más grandes que en la aplicación al microscopio del dispositivo de la técnica anterior.

De acuerdo con características que son preferidas por razones de simplicidad y de conveniencia, tanto para la fabricación como para el uso:

20 - dicha longitud de onda de excitación ( $\lambda_1$ ) es más corta que dicha longitud de onda de absorción ( $\lambda_2$ ), la cual es, a su vez, más corta que dicha longitud de onda de emisión ( $\lambda_3$ );

- dicho espectro de la luz de excitación comprende un pico de intensidad luminosa máxima centrado en dicha longitud de onda de excitación ( $\lambda_1$ );

25 - la diferencia entre dichas longitudes de onda de excitación ( $\lambda_1$ ) y de absorción ( $\lambda_2$ ) es menor que la diferencia entre dichas longitudes de onda de absorción ( $\lambda_2$ ) y de emisión ( $\lambda_3$ ) de dicho agente fluoróforo;

- dicho dispositivo también comprende una ventana para observar la luz emitida por dicho agente fluoróforo, provista de un filtro que se ha configurado para dejar que pasen las longitudes de onda más largas y cuya longitud de onda de corte está situada entre dicha longitud de onda de absorción ( $\lambda_2$ ) y dicha longitud de onda de emisión ( $\lambda_3$ );

30 - dichos medios de iluminación comprenden al menos una base sobre la que se monta al menos un grupo de fuentes de luz, de tal modo que dichas fuentes de ese grupo se encuentran uniformemente separadas las unas de las otras para formar un conjunto geoméricamente ordenado de iluminación para dicho soporte;

- dichos medios de iluminación comprenden dos de dichas bases, inclinadas la una con respecto a la otra en la dirección de una posición predeterminada para la recepción de dicho soporte en el dispositivo;

35 - dichas fuentes de luz son diodos electroluminiscentes.

Las características y ventajas de la invención se pondrán de manifiesto por la siguiente descripción, dada a modo de ejemplo preferido pero no limitativo, con referencia a los dibujos que se acompañan, en los cuales:

- la Figura 1 es un diagrama de un dispositivo de un conjunto de acuerdo con la invención;

40 - la Figura 2 es una vista en perspectiva de ese dispositivo, al lado del cual se ha representado una unidad de filtro para el análisis en el interior del dispositivo;

- las Figuras 3 y 4 son, respectivamente, una vista en perspectiva tomada desde debajo, y una vista en corte y en alzado, tomada sobre un plano meridiano de simetría del dispositivo;

45 - la Figura 5 es una vista en perspectiva de una de las dos placas de circuito impreso de ese dispositivo, sobre la que se fijan dos grupos de diodos electroluminiscentes, cada uno de los cuales emite luz en una longitud de onda predeterminada;

- la Figura 6 es una vista en perspectiva de otra realización del dispositivo de un conjunto de acuerdo con la invención;

50 - la Figura 7 ilustra los diagramas espectrales de diferentes miembros ópticos de un dispositivo de un conjunto de acuerdo con la invención, así como el diagrama espectral del agente fluoróforo que se utiliza con ese dispositivo con el fin de marcar los microorganismos, con una escala común de longitudes de onda a lo largo del eje

x y una escala común de intensidad luminosa relativa a lo largo del eje y;

- la Figura 8 es un diagrama de una parte de una realización del dispositivo de un conjunto de utilidad para la comprensión de la invención; y

5 - la Figura 9 ilustra diagramas espectrales similares a los de la Figura 7, pero para un dispositivo de acuerdo con la técnica anterior previamente descrita.

Se proporcionará a continuación una descripción de una realización preferida del dispositivo de un conjunto de acuerdo con la invención, con la ayuda de las Figuras 1 a 5, antes de detallar su modo de funcionamiento con la ayuda de los diagramas espectrales ilustrados en la Figura 7.

10 El dispositivo 1 ilustrado en las Figuras 1 a 5 comprende una caja 2, medios de iluminación 3 constituidos por dos miembros de iluminación 4, un cajón deslizante 5 y una ventana de observación 7.

La caja es de una forma general paralelepípedica y tiene una pared superior 10 y cuatro paredes laterales 11 a 14, de tal manera que una parte de la pared 14 no se ha mostrado deliberadamente con el fin de mostrar el interior del dispositivo.

15 La ventana de observación 7 está, aquí, constituida por un filtro de paso bajo 6 (del que se ha de decir que permite el paso de las frecuencias más bajas, y, por tanto, de las longitudes de onda más largas), de tal manera que se ha formado una abertura 9 en la pared superior 10 de la caja 2 para recibir ese filtro 6 en su interior.

Como se observará más adelante, el interior de esta caja 2, delimitado por las paredes 10 a 14 y 30, constituye una cámara de análisis aislada de la luz del entorno y en cuyo interior es recibido el soporte que se va a analizar.

20 El soporte que se ha de analizar es, aquí, una membrana microporosa 41 perteneciente a una unidad de filtro 40, aquí, una unidad comercializada por la Millipore<sup>®</sup> bajo la marca comercial Milliflex<sup>®</sup>. Esta membrana 41 tiene un diámetro de 55 mm y está rodeada por un cuerpo 42 de la unidad de filtro.

La membrana 41 aquí utilizada es de éster de celulosa y tiene un tamaño de los poros configurado para retener los microorganismos cuya presencia se desea detectar, de la forma más frecuente entre 0,10 y 100 micras.

El cajón 5 tiene un cuerpo 30, un collar 31 y una orejeta de agarre 32.

25 Dentro del cuerpo 30 se ha formado una cavidad cilíndrica 33 dispuesta para recibir una unidad de filtro 40.

Se describirán a continuación los medios de iluminación 3 con la ayuda de las Figuras 3 a 5.

Estos medios 3 comprenden dos miembros de iluminación independientes 4.

30 Cada miembro 4 comprende una montura 20 de sección trapezoidal, una placa de circuito impreso 21 sobre la que se disponen dos grupos 27 y 28 de diodos 22 y 23, un difusor 24 que cubre estos diodos, y dos pantallas negras 26, situadas entre los bordes de la placa 21 y los del difusor 24.

Las monturas 20 se fijan dentro de la caja 2, en la pared 10 de esa caja, en tanto que las placas 21 se fijan a las monturas 20, sobre las caras inclinadas de las mismas, que están más lejos de las dispuestas apoyadas en la pared 10, de tal manera que esas placas están inclinadas la una hacia la otra en la dirección de la zona de recepción 33 para el soporte 41.

35 Cada montura 20 se ha proporcionado, de esta forma, de tal manera que cada placa 21 tiene una inclinación A (Figura 1) de 45° con respecto a la pared 10 y a la posición predeterminada que ocupa la membrana 41, cuando la unidad 40 se encuentra dentro del alojamiento 33 del dispositivo (Figura 1).

Los bordes superiores 25 de las placas 21 se encuentran a una distancia el uno del otro igual a 100 mm, al tiempo que esos bordes 25 se encuentran a una distancia de 23 mm de la pared 10.

40 Las cúspides de los diodos electroluminiscentes 22 y 23 están situadas a una distancia de 15 mm de los difusores 24.

Estos difusores 24 están, aquí, hechos a partir de una placa de vidrio, una de cuyas caras ha sido sometida a abrasión con arena (la cara que está situada mirando a los diodos).

45 En cada placa de circuito impreso, y según se ilustra en la Figura 5, se ha dispuesto un primer grupo 27 de diodos, constituido por dieciséis diodos 22, así como un segundo grupo 28 de diodos, constituido por cuatro diodos 23.

Los diodos 22 se encuentran uniformemente separados los unos de los otros y están dispuestos en cuatro filas equidistantes de cuatro diodos, de tal manera que cada diodo 22 está situado a una distancia de 16 mm de los diodos 22 directamente adyacentes al mismo. Este grupo 27 constituye, así, un conjunto geoméricamente ordenado de diodos que hace posible iluminar uniformemente la membrana 41 cuando esta se dispone dentro de la caja 2 en

su posición predeterminada, de tal manera que el centro 29 de ese conjunto geoméricamente ordenado está situado a una altura H de 54,75 mm con respecto a esa posición predeterminada (Figura 1).

5 Los diodos 23 se distribuyen en las cuatro esquinas de un cuadrado entrelazado en el centro del conjunto geoméricamente ordenado de diodos 22, de tal manera que cada diodo 23 está situado a una distancia de 32 mm de los dos diodos 23 adyacentes al mismo, y en el centro de un cuadrado en cuyas esquinas están situados cuatro diodos 22 (Figura 5). El centro de este conjunto geoméricamente ordenado coincide con el centro 29 del conjunto geoméricamente ordenado constituido por los diodos 22.

10 Los diodos 22 son diodos de la compañía LUMILED®, comercializados bajo la referencia LXHL-PB01 y cuyo espectro de emisión 55 se ilustra en la Figura 7, de tal modo que este espectro, con una forma de distribución gaussiana, tiene una cresta 55' en la longitud de onda  $\lambda_1$  de 470 nm, por lo que emite en azul.

Los diodos 23 son diodos de la misma compañía, comercializados bajo la referencia LXHL-PD01 y cuyo espectro de emisión, que no se ilustra en los dibujos, es también de una forma de distribución gaussiana y tiene una cresta en la longitud de onda de 625 nm, por lo que emite en rojo.

15 Estos diodos tienen un ángulo sólido de emisión de 140° para un valor de intensidad relativa del 25%, y un ángulo sólido de emisión de 90° para un valor de intensidad relativa del 60%.

Los diodos 23 tienen una potencia de emisión sustancialmente cuatro veces mayor que la de los diodos 22, de tal modo que son cuatro veces menos numerosos que los diodos 22.

20 Los conjuntos geoméricamente ordenados de diodos 22 y 23 están entrelazados (es decir, alojados unos dentro de los otros) al objeto de obtener la luz más homogénea posible en la unidad de filtro que se ha de iluminar, ya llegue la luz de los diodos 22 o de los diodos 23.

Cada grupo de diodos produce un espectro luminoso centrado en una longitud de onda predeterminada con el fin de ser capaz de excitar tipos predeterminados diferentes de fluoróforos.

Las pistas conductoras de cada placa 32 están eléctricamente conectadas a una unidad de gobierno y control para el dispositivo (no mostrada).

25 Se describirá a continuación brevemente la preparación de una muestra para su análisis.

Antes de la etapa de detección en sí, el operario recoge una muestra para analizar (que puede contener microorganismos) por filtración a través de una membrana 41 de una unidad 40.

30 Una vez que los microorganismos han sido filtrados y retenidos en la membrana, puede incluirse una etapa opcional de crecimiento de microorganismos en contacto con un medio de cultivo apropiado. Este medio de cultivo es, preferiblemente, un medio de gel sobre el que se deposita la membrana tras su filtración. Esta etapa, que es opcional, permite la obtención de colonias de cada uno de los microorganismos inicialmente filtrados, lo que aumenta el número de celdas que detectar.

35 La membrana y los microorganismos que esta contiene se colocan entonces en contacto con una composición destinada a hacer que las paredes de los microorganismos sean permeables, y se colocan entonces los marcadores fluoróforos al seno de la composición de aporte de permeabilidad, a fin de entrar dentro de los microorganismos que se han de detectar.

Se proporcionará en lo que sigue una descripción de la implementación de la determinación de la presencia o ausencia de microorganismos en una muestra así preparada, basándose en el dispositivo del conjunto de acuerdo con la invención.

40 En una primera fase, se tira del cajón 5 y el operario coloca la unidad de filtro 40 (que puede, cabe la posibilidad, cubrirse con una cubierta transparente, no ilustrada, a fin de proteger la membrana de la contaminación exterior) dentro de la cavidad 33 de ese cajón. El cajón 5 es entonces empujado hasta que el collar 31 contacta a tope con la pared 13, de tal manera que la membrana 41 se dispone en su posición predeterminada dentro de la caja 2, a fin de ser iluminada.

45 Dependiendo del fluoróforo que se utilice para marcar los microorganismos, el operario selecciona, a continuación (por ejemplo, por medio de un conmutador, no ilustrado en los dibujos), los diodos correspondientes 22 o 23 para encenderlos (los diodos 22 en el ejemplo ilustrado), a fin de iluminar uniformemente la totalidad de la superficie de la membrana 41 y excitar con la longitud de onda adecuada el fluoróforo que sirvió para la marcación.

50 Los difusores 24 así como la distribución espacial de los diodos sobre las placas 21 hace posible tener una iluminación particularmente homogénea de toda la superficie de la membrana 41, cualquiera que sea el grupo de diodos que se utilice.

Como las placas 21 están dispuestas una a cada lado de la abertura 9 que recibe el filtro 6, la luz que llega de la

unidad de filtro 40, que es emitida en respuesta a la luz de excitación procedente de los diodos, pasa a través de ese filtro, como se ilustra en la Figura 1, de tal manera que es posible observar la respuesta luminosa de la membrana 41 a través del filtro 6 a simple vista, o, si no, por medio de una cámara.

5 Se detallará a continuación la respuesta luminosa obtenida en presencia de microorganismos utilizando los diferentes diagramas espectrales ilustrados en la Figura 7.

En la Figura 7, el espectro 55 es de forma gaussiana y corresponde al espectro de la luz de excitación (aquí, el espectro producido por los diodos 232), el cual tiene un pico cuya cresta 55' correspondiente al valor de intensidad luminosa máxima se encuentra en una longitud de onda  $\lambda_1$  igual a 470 nm.

10 Los espectros 53 y 54 se corresponden, respectivamente, con el espectro de absorción y con el espectro de emisión del fluoróforo escogido aquí para marcar el microorganismo presente en la membrana.

El fluoróforo aquí representado es el 5-6 CFDA (carboxi-fluoresceína-di-acetato).

El espectro de absorción 53 presenta una cresta 53' en la longitud de onda  $\lambda_2$ , mayor que  $\lambda_1$ , y el espectro de emisión 54 tiene una cresta 54' en la longitud de onda  $\lambda_3$ , mayor que  $\lambda_2$ .

15 En el ejemplo ilustrado,  $\lambda_2$  es igual a 492 nm y  $\lambda_3$  es igual a 517 nm, de tal manera que la diferencia entre  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$  es, aquí, menor que la diferencia entre  $\lambda_2$  y  $\lambda_3$ .

20 La longitud de onda de excitación  $\lambda_1$  se escoge expresamente de manera que sea menor que  $\lambda_2$ , de tal modo que la cresta 55' del espectro 55 está descentrada con respecto a la cresta 53' del espectro 53, en el lado opuesto con respecto al espectro 54. Este corrimiento se escoge a fin de que la luz que llega de los medios de iluminación tenga la suficiente energía para excitar el fluoróforo, sin que esa luz provoque una interferencia parásita significativa con la emitida por el fluoróforo en respuesta a esa luz de excitación.

El espectro 56 es el del filtro 6 de la ventana de observación, habiéndose escogido su frecuencia de corte (aquí, del orden de 550 nm) para dejar pasar esencialmente la luz emitida por el fluoróforo (espectro 54) y para detener la luz de longitudes de onda más cortas, en particular, las que llegan de los diodos 22 tras reflejarse en la unidad 40.

25 Este filtro de salida (un filtro de color) es débilmente selectivo con el fin de permitir que retorne una cantidad suficiente de luz a los ojos del usuario, lo que proporciona una escena generalmente brillante y que es, así, cómoda de observar, al tiempo que garantiza un grado de contraste que se adecua a la observación a simple vista.

30 Cuando la luz de excitación que llega de los medios de iluminación 3 ilumina la membrana 41 de la unidad de filtro 40, cada posición de esa membrana que tiene microorganismos marcados por el fluoróforo se hace visible en la forma de un punto brillante de pequeño tamaño (unos pocos cientos de micras), directamente observable a simple vista y que aparece en el filtro 6.

Los valores del ángulo A y de la altura H proporcionan una manifestación óptima para la lectura de los puntos brillantes de la membrana 41, ya sea a simple vista o por medio de una cámara.

35 Estos valores se han determinado aplicando una marca negra y una marca amarilla fluorescente a una membrana de control y buscando, para valores diferentes de ese ángulo A y de esa altura H, las configuraciones A, H para las que es máximo el brillo de la banda fluorescente, a la vez que se minimiza el brillo parásito en la marca negra.

Se ha demostrado así, de forma sorprendente, que el intervalo  $[40^\circ - 50^\circ]$  para el ángulo A proporcionaba tanto una intensidad luminosa máxima para la marca fluorescente como prácticamente una ausencia de luz parásita para la marca negra, por lo que se corresponde, de este modo, a un óptimo en términos de comodidad de lectura.

40 A fin de tener un cierto margen de seguridad por lo que respecta al juego a la hora de montar el dispositivo, es, así, el valor promedio de  $45^\circ$  lo que se ha escogido aquí.

45 Por lo que respecta al valor de altura H, este es una función del tamaño del objeto que se ha de iluminar, y las diferentes configuraciones ensayadas han mostrado que, para una membrana de un diámetro de 55 mm y para un intervalo de valores para el ángulo A comprendido entre  $40^\circ$  y  $50^\circ$ , los mejores resultados se obtuvieron para un intervalo de alturas entre 39,75 mm y 69,75 mm. Similarmente, aquí, es el valor promedio de 54,75 mm el que se escogió en este ejemplo.

El dispositivo también es adaptado, ajustando la altura H, para iluminar tipos de muestras distintos de las membranas y, generalmente, cualquier soporte configurado para contener microorganismos (ya sea sobre una superficie o en el seno de un volumen) y cuya presencia se desee detectar por fluorescencia.

Otra realización de este dispositivo se ha representado en la Figura 6.

50 Hablando en general, los mismos números de referencia, incrementados en 100, se utilizan para partes similares.

5 El dispositivo 101 tiene las mismas características que el dispositivo 1, aparte de que carece del cajón 5 (aquí, la unidad de filtro 40 se ha situado directamente sobre una mesa, por ejemplo) y del hecho de que la ventana de observación 107 está constituida, aquí, por una tapa corrediza 108 de forma rectangular, dispuesta apoyada en la pared 110 de la caja 102, por cuatro filtros 106 a 106''', de manera que cada uno de los filtros está alojado en una abertura correspondiente de la tapa corrediza 108.

Cada filtro óptico es un filtro de paso bajo, por lo que permite el paso de las frecuencias inferiores (las longitudes de onda más largas), y cuya frecuencia de corte es distinta de las demás frecuencias de corte.

La tapa corrediza 108 está acoplada en un raíl de guía (no mostrado) de ese dispositivo, a fin de ser capaz de situar cualquier filtro que se escoja de los cuatro filtros 106 a 106''' frente a la abertura 109 de la pared 110.

10 Es así posible, dependiendo del fluoróforo escogido y de los diodos que se enciendan, seleccionar de entre los cuatro filtros disponibles el que tenga la frecuencia de corte más adaptada (a fin de obtener, por ejemplo, el mejor contraste).

En una realización no ilustrada, el filtro 6 no es un filtro de paso bajo sino un filtro de paso de banda cuya banda de paso está centrada en la longitud de onda  $\lambda_2$ .

15 En una realización ilustrada esquemáticamente en la Figura 8, que es de utilidad para la comprensión de la invención, la cresta del espectro de los medios de iluminación no necesariamente ha de estar localizada y, por tanto, se extiende a lo largo de un intervalo más grande de longitudes de onda al utilizar, por ejemplo, como medios de iluminación 203, en lugar de los diodos, una lámpara 204 de luz policromática asociada con un filtro de paso alto 234 configurado para permitir el paso de las frecuencias más altas, es decir, de las longitudes de onda más cortas, el  
20 cual es menos costoso que el filtro de paso de banda de la técnica anterior, y cuya longitud de onda de corte  $\lambda_c$  está situada entre la longitud de onda de absorción  $\lambda_2$  y la longitud de onda de emisión  $\lambda_3$  (Figura 8).

25 Por último, se apreciará que tal sistema de iluminación puede también ser producido en diferentes versiones para muchas otras aplicaciones, tales como el análisis con microscopio, de tal modo que la configuración geométrica del dispositivo para cada una de estas aplicaciones es, entonces, con arreglo a una versión específica de la aplicación en cuestión. El bastidor del dispositivo al que se fijan las bases 21 no tiene porqué ser necesariamente una caja como la caja 2 ilustrada; puede ser, por ejemplo, un aro que rodea la óptica de un microscopio.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Un conjunto que comprende soportes y un dispositivo para el análisis microbiológico de dichos soportes, de tal manera que dichos soportes están configurados para contener microorganismos marcados por un agente fluoróforo, incluyendo dichos soportes un soporte (41) en el que están presentes dichos microorganismos, de modo que dicho agente está configurado para, al contacto con dichos microorganismos, absorber energía luminosa con un espectro de absorción (53) que tiene una cresta (53') en una longitud de onda de absorción predeterminada ( $\lambda_2$ ), y para liberar esa energía emitiendo luz fluorescente con un espectro de emisión (54) que tiene una cresta (54') en una longitud de onda de emisión predeterminada ( $\lambda_3$ ), distinta de dicha longitud de onda de absorción ( $\lambda_2$ ), de tal manera que dicho dispositivo comprende medios de iluminación (3), configurados para iluminar dicho soporte (41) al objeto de que dichos microorganismos marcados emitan, en respuesta a la luz de excitación emitida por esos medios de iluminación (3), luz con dicho espectro de emisión (54), caracterizado por que el espectro (55) de la luz de excitación que llega de los medios de iluminación (3) comprende una cresta (55') en una longitud de onda de excitación predeterminada ( $\lambda_1$ ) distinta de dichas longitudes de onda de absorción ( $\lambda_2$ ) y de emisión ( $\lambda_3$ ) de dicho agente fluoróforo, de modo que dicha longitud de onda de absorción ( $\lambda_2$ ) está situada entre dichas longitudes de onda de excitación ( $\lambda_1$ ) y de emisión ( $\lambda_3$ ), con una diferencia predeterminada entre las longitudes de onda de excitación ( $\lambda_1$ ) y de absorción ( $\lambda_2$ ), en virtud de lo cual se facilita la discriminación de la luz emitida por dicho agente fluoróforo de dichos microorganismos marcados presentes en dicho soporte, de la luz que llega procedente de los medios de iluminación (3); y por que los medios de iluminación (3) tienen una dispersión espectral no despreciable y no hay ningún filtro de entrada entre los medios de iluminación (3) y dicho soporte.
- 2.- Un conjunto de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que dicha longitud de onda de excitación ( $\lambda_1$ ) es más corta que dicha longitud de onda de absorción ( $\lambda_2$ ), que, a su vez, es más corta que dicha longitud de onda de emisión ( $\lambda_3$ ).
- 3.- Un conjunto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por que dicho espectro (55) de la luz de excitación comprende un pico (55') de intensidad luminosa máxima centrado en dicha longitud de onda de excitación ( $\lambda_1$ ).
- 4.- Un conjunto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la diferencia entre dichas longitudes de onda de excitación ( $\lambda_1$ ) y de absorción ( $\lambda_2$ ) es menor que la diferencia entre dichas longitudes de onda de absorción ( $\lambda_2$ ) y de emisión ( $\lambda_3$ ) de dicho agente fluoróforo.
- 5.- Un conjunto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que dicho dispositivo también comprende una ventana (7; 107) para observar la luz emitida por dicho agente fluoróforo, provista de un filtro (6; 106) que está configurado para dejar que pasen las longitudes de onda más larga y cuya longitud de onda de corte está situada entre dicha longitud de onda de absorción ( $\lambda_2$ ) y dicha longitud de onda de emisión ( $\lambda_3$ ).
- 6.- Un conjunto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que dichos medios de iluminación (3) comprenden al menos una base (21) sobre la que se monta al menos un grupo (27) de fuentes de luz (22), de tal manera que dichas fuentes (22) de ese grupo (27) están uniformemente separadas unas de otras para constituir un conjunto geoméricamente ordenado de iluminación para dicho soporte (41).
- 7.- Un conjunto de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que dichos medios de iluminación (3) comprenden dos de dichas bases (21), inclinadas la una con respecto a la otra en la dirección de un emplazamiento predeterminado para la recepción de dicho soporte (41) dentro del dispositivo.
- 8.- Un conjunto de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por que cada una de dichas bases (21) está inclinada en un ángulo (A) de entre 40° y 50° con respecto a dicho emplazamiento predeterminado para la recepción de dicho soporte (41).
- 9.- Un conjunto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizado por que dichas fuentes de luz son diodos electroluminiscentes (22).

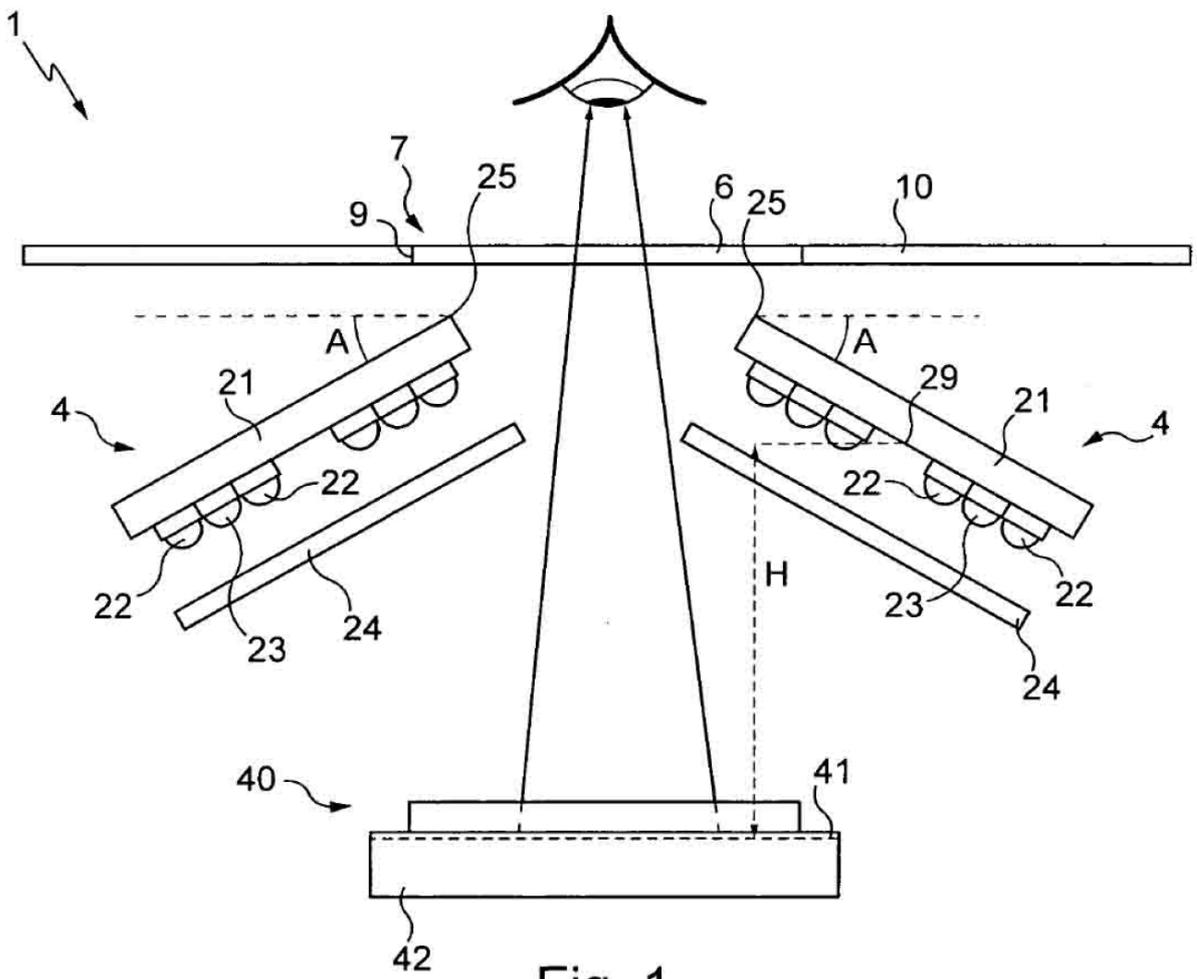


Fig. 1

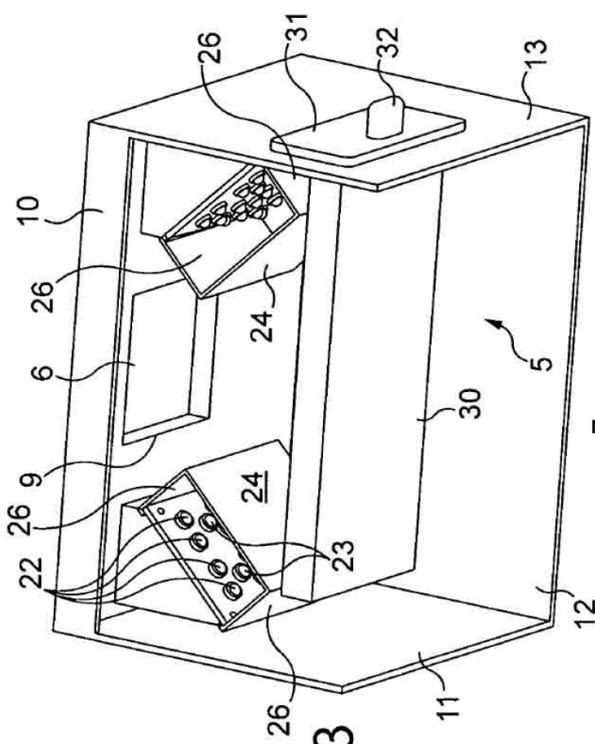


Fig. 3

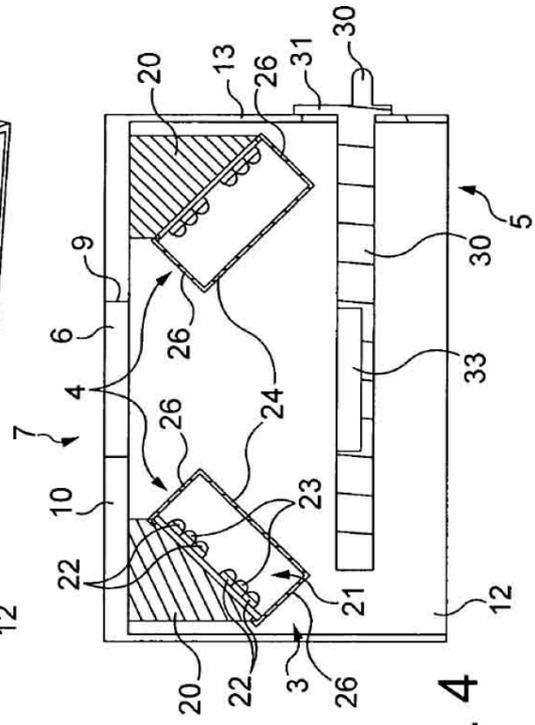


Fig. 4

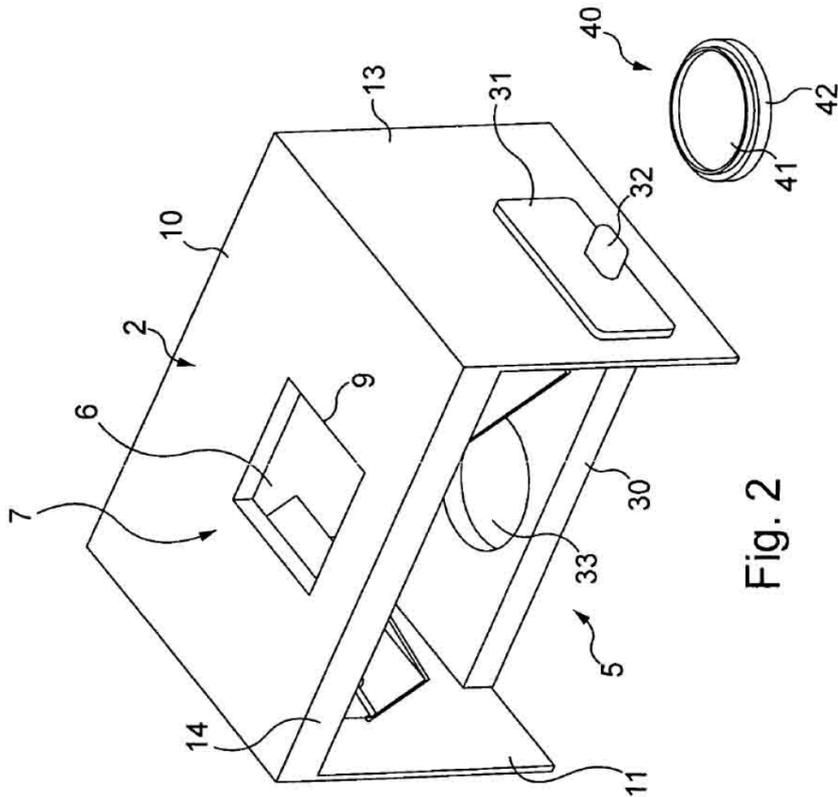


Fig. 2

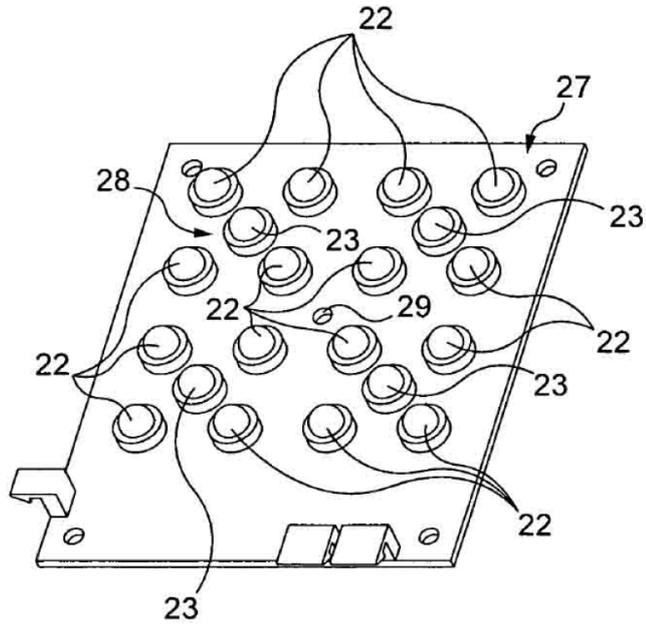


Fig. 5

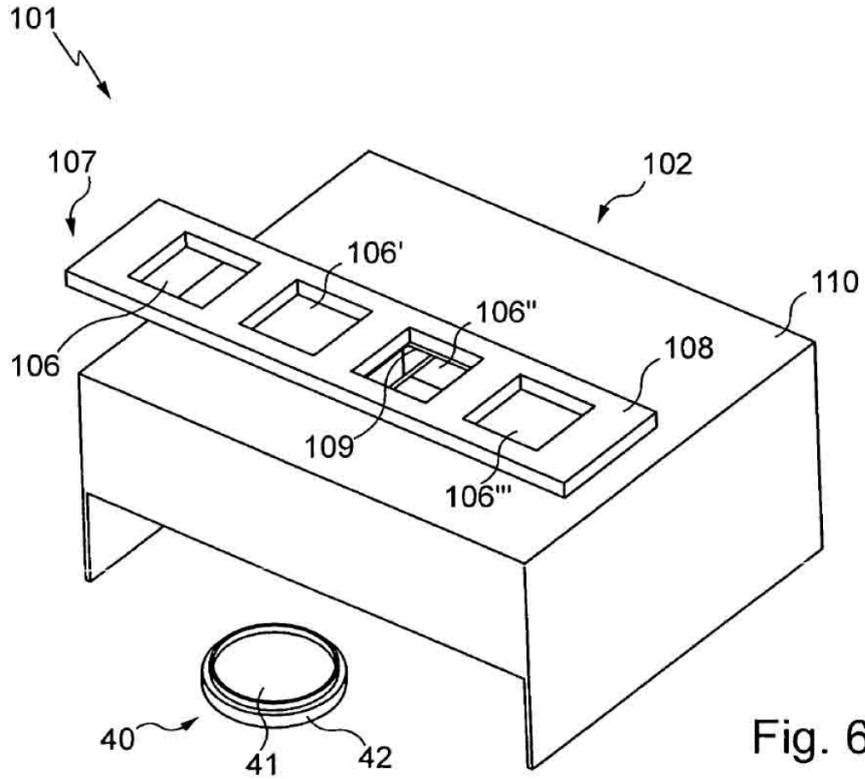


Fig. 6

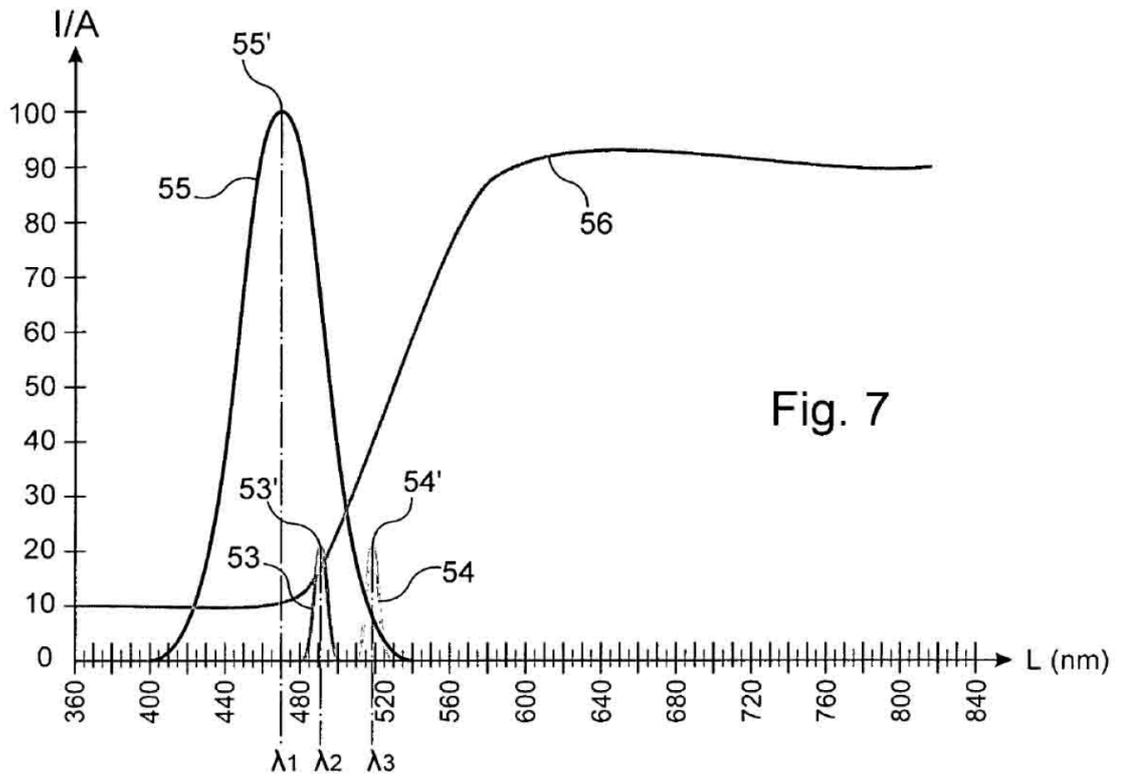


Fig. 7

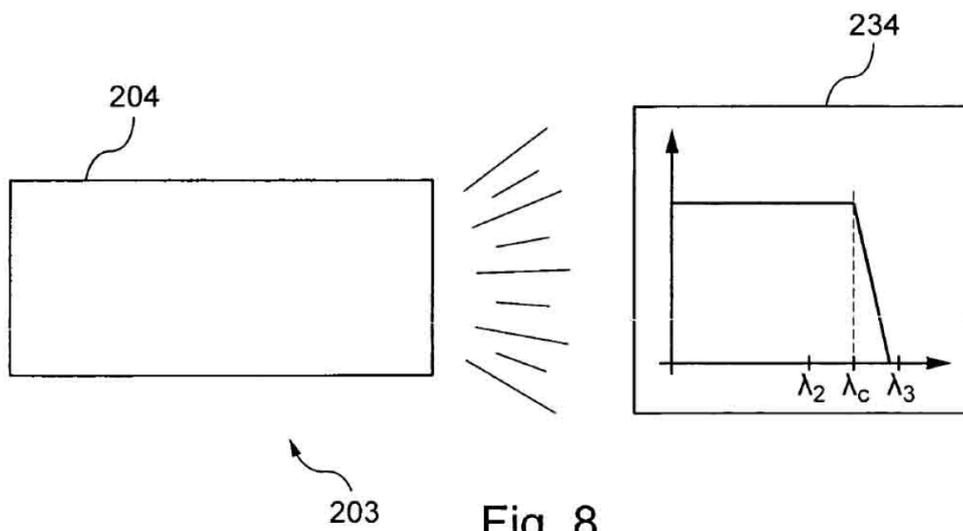


Fig. 8

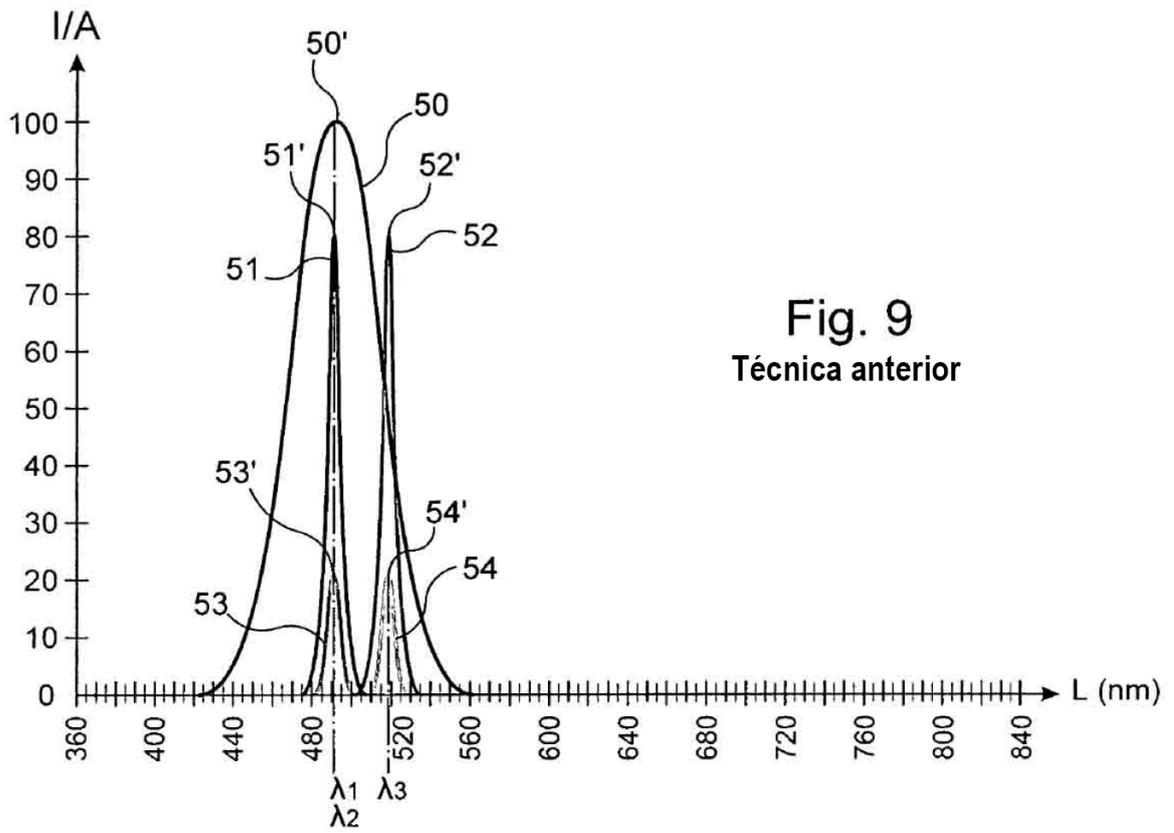


Fig. 9  
Técnica anterior