

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 930**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

G02B 21/00 (2006.01)

G02B 21/36 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G02B 21/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.04.2001 PCT/DK2001/00265**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2001 WO01077648**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2001 E 01923535 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 1290427**

54 Título: **Procedimiento y aparato para detectar fluorescencia de una muestra**

30 Prioridad:

11.04.2000 DK 20000604

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

20.11.2017

73 Titular/es:

CHEMOMETEC A/S (100.0%)

GYDEVANG 43

3450 ALLEROD, DK

72 Inventor/es:

HANSEN,FRANS EJNER RAVN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 642 930 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

Procedimiento y aparato para detectar fluorescencia de una muestra

5 La presente invención se refiere a un aparato y a un procedimiento para detectar fluorescencia de una muestra.

Antecedentes de la invención

La iluminación de una muestra en microscopía puede clasificarse en principio en dos clases diferentes:

10

- Microscopios de transmisión, donde la fuente lumínica está localizada en un lado de la muestra y un sensor o detector en el otro lado de la muestra para detectar la luz que se transmite a través de la muestra.
- Microscopios de reflexión, donde la fuente lumínica está localizada en el mismo lado de la muestra que el sensor o detector para detectar la luz que se refleja de la muestra. La luz de la fuente lumínica se deflece por una superficie parcialmente transmisora y deflectora, tal como un divisor de haz, p.ej. un espejo dicróico, para iluminar la muestra. La luz reflejada de la muestra se permite transmitir a través de la superficie hacia el medio de detección.

15

En microscopía de fluorescencia, la fuente lumínica proporciona luz de excitación en lugar de meramente iluminación. Puesto que la señal de fluorescencia que se detecta es de baja intensidad en comparación con la intensidad de la luz de excitación, es importante que no se transmita luz de excitación directamente o sin filtrar al detector.

20

En el documento US 5.805.342 (Gravely), se muestra un sistema de fluorescencia de tipo transmisión así como de tipo reflexión, donde la fuente lumínica se propaga por o barre la muestra en el plano de muestra. La luz de excitación está localizada en el lado opuesto de la muestra o localizada de modo que la luz se deflexione por una superficie parcialmente transmisora y deflectora.

25

Para producir microscopios de fluorescencia más compactos que tengan más funcionalidades, los presentes inventores han inventado un microscopio de fluorescencia que puede construirse de manera más compacta que los anteriormente conocidos, y por lo tanto utilizable como microscopio de fluorescencia portátil.

30

Puede encontrarse técnica relevante adicional en los documentos US 4.421.772, US 4.331.358, US 4.336.029 y US 4.146.604.

35 Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un aparato para detectar la fluorescencia de una muestra como se define en la reivindicación 1.

40 Además, la invención se refiere a un procedimiento de valoración de un parámetro de una muestra como se define en la reivindicación 24.

Dibujos

45 La Fig. 1 muestra un sistema de excitación de un lado.

La Fig. 2 muestra una sección transversal del filtro lumínico de excitación en un plano paralelo al plano de muestra.

La Fig. 3 muestra el ángulo de recogida C y el ángulo E entre la trayectoria lumínica principal de excitación y el eje de detección-muestra.

La Fig. 4 muestra un sistema de excitación/detección de dos lados.

50 La Fig. 5 muestra un sistema de excitación de dos lados.

La Fig. 6 muestra un sistema de detección de dos lados.

La Fig. 7 muestra un resultado de emisión registrado de una muestra de células somáticas en solución de leche.

Definiciones

55

Los siguientes términos tienen los significados expuestos a continuación:

Ángulo de recogida: se usa en su significado convencional, es decir, el ángulo para el que un medio de enfoque puede recoger señales para detectar por el medio de detección.

60

Ángulo de recogida/2: significa la mitad del ángulo de recogida.

Área de detección: el área de la superficie de la muestra para detectar por una detección.

Eje de detector-muestra: el eje del detector a la muestra.

Exposición directa: significa que el ángulo entre la trayectoria lumínica principal y el eje de detección-muestra está entre el ángulo de recogida/2 y 90°.

- 5 Profundidad de foco: la distancia que puede moverse un objeto a lo largo del eje de un sistema de enfoque sin distorsionar su imagen, definiéndose tal distorsión como cuando una imagen, que cuando está en foco ilumina un solo elemento de detección, cuando está distorsionada ilumina un área que se extiende a dos elementos de detección en una o dos direcciones. Cuando se combinan dos o más elementos de detección antes del análisis, deberían considerarse los elementos de detección combinados en la definición de profundidad de foco.
- 10 Ángulo de incidencia: el ángulo entre la trayectoria lumínica principal y el eje de detección-muestra.
- Medio lumínico: el sistema lumínico que comprende todas las fuentes lumínicas a las que se expone un lado de la muestra.
- Plano lumínico: un plano a través de dos o más fuentes lumínicas.
- Trayectoria lumínica principal: la trayectoria desde el centro del haz lumínico al plano de muestra, que se ejemplifica por el centro de un diodo emisor de luz.
- 15 Plano de muestra: el plano perpendicular al eje de detector-muestra y sobre el cual se dispone la muestra.

Descripción detallada de la invención

- 20 El aparato de acuerdo con la invención puede ser un microscopio de fluorescencia fijo o un microscopio de fluorescencia portátil. En una realización preferida, el aparato es portátil para detectar la fluorescencia de muestras de campo.

Se dispone la fuente lumínica en relación con la muestra de manera que proporcione el máximo de energía lumínica a la muestra. Puesto que la luz se transmite desde una fuente lumínica localizada en el mismo lado de la muestra que el medio de detección, es posible aumentar la intensidad de la luz de excitación por encima de lo aplicable prácticamente en un microscopio de fluorescencia de transmisión, porque la luz de la primera fuente lumínica no se transmite directamente al eje de detección-muestra.

- 30 Se prefiere usar una luz de excitación divergente, tal como diodos emisores de luz, como una manera económica de exponer un área tan grande como sea posible de la muestra a la luz de excitación. La fuente lumínica es un diodo emisor de luz.

A menudo se prefiere usar más de una fuente lumínica con el fin de aumentar el flujo de luz sobre la muestra, por ejemplo usando dos o más diodos emisores de luz. También es posible usar más de una fuente lumínica cuando algunas de las fuentes lumínicas tienen diferentes propiedades electromagnéticas.

El medio lumínico de excitación comprende preferiblemente al menos un diodo emisor de luz (LED), sin embargo se prefiere proporcionar al menos dos LED, más preferiblemente al menos 4 LED. Cuando se usan más de un LED, los LED se espacian preferiblemente a distancias idénticas entre sí. Pueden disponerse en cualquier patrón simétrico alrededor del eje de detección-muestra siempre que se explote suficientemente el efecto lumínico, tal como en un patrón circular o un patrón cuadrado alrededor del eje de detección-muestra. Las luces de excitación se disponen preferiblemente en un plano lumínico, es decir un plano a través de las fuentes lumínicas. El plano lumínico es preferiblemente paralelo al plano de muestra.

45 Mediante el uso de varios LED, se expone la muestra a luz de excitación desde varios ángulos conduciendo a una excitación sustancialmente óptima de la muestra, las fuentes lumínicas funcionan preferiblemente de tal modo que todas transmitan de forma sustancialmente simultánea. No hay un límite superior al número de LED usados, pero a menudo se proporcionan tantos como 30 LED, tal como hasta 20 LED.

50 Sin embargo, para algunas aplicaciones donde al menos una primera y segunda fuentes lumínicas se disponen en el primer medio lumínico de excitación, teniendo la primera fuente lumínica una banda de longitud de onda diferente a la segunda fuente lumínica, las fuentes lumínicas pueden transmitir de manera alterna. Mediante el uso de dos fuentes lumínicas diferentes, es posible obtener dos señales de fluorescencia diferentes de la muestra. Así, es posible obtener al menos dos clases diferentes de información, porque cuando transmiten las fuentes lumínicas de una longitud de onda se transmite un tipo de señal al detector, y cuando transmiten las fuentes lumínicas de otra longitud de onda, se transmite otro tipo de señal al detector.

Si se usa una fuente lumínica menos divergente, puede disponerse un medio óptico divergente en la trayectoria lumínica de excitación para divergir apropiadamente la luz de excitación. Independientemente de lo divergentes que

sean la fuente o fuentes lumínicas, se prefiere emitir la luz dirigida a la muestra sin deflectar de su trayectoria lumínica para asegurar una excitación apropiada de la muestra, así como para reducir el riesgo de transmitir luz de excitación directamente al medio de detección.

- 5 La fuente lumínica puede proporcionar luz de cualquier longitud de onda adecuada, tal como en el intervalo entre 200 a 980 nm, tal como en el intervalo de 200-700, 200-600, 200-500 o 200-400.

En otra realización, se dispone la fuente lumínica en un primer plano lumínico, paralelo al plano lumínico de muestra, estando colocado dicho primer plano lumínico a una distancia del plano de muestra detrás del detector. Mediante esta construcción, la luz se emite por las fuentes lumínicas directamente hacia el plano de muestra propagándose por el medio detector. En otra realización, la luz se dirige inicialmente en la dirección opuesta hacia un reflector que refleja el haz lumínico hacia el plano de muestra que se propaga por el medio detector. Independientemente de la colocación de la luz de excitación, tiene que asegurarse que el ángulo entre la trayectoria lumínica principal y el eje de detección-muestra es como se define anteriormente. El reflector puede ser cualquier medio reflector adecuado, tal como un espejo cóncavo.

El medio de detección se dispone preferiblemente en una carcasa cuando las fuentes lumínicas están localizadas detrás del medio de detección. En este caso, la carcasa está dotada de una abertura que permite que las señales emitidas por la muestra alcancen los detectores.

En una realización de la invención, las fuentes lumínicas se disponen de modo que el primero medio lumínico de excitación esté localizado en un primer plano lumínico paralelo al plano de muestra, estando dicho primer plano entre el plano de muestra y el primer medio de detección. Los ángulos de incidencia de al menos la primera fuente lumínica del primer medio lumínico de excitación están entre el ángulo de recogida/2 y 90°. Preferiblemente, todas las fuentes lumínicas tienen ángulos de incidencia en este intervalo, más preferiblemente todas las fuentes lumínicas tienen ángulos de incidencia sustancialmente idénticos.

Así, se asegura que la trayectoria lumínica de excitación y las señales emitidas no interfieran, dando como resultado errores en las señales para detectar.

El ángulo incidente está preferiblemente en el intervalo entre 30 y 90°, más preferiblemente entre 45 y 85°, tal como entre 50 y 85°, tal como entre 50 y 75°, tal como entre 50 y 60°, proporcionando una excitación adecuada de la muestra.

Se transmite la luz de excitación directamente a la muestra, es decir, sin deflectar por un divisor de haz, mecánicamente por ejemplo por deflectores o similares, con lo que es posible construir un aparato más compacto y que tiene menos piezas, puesto que no tiene que incorporarse un medio de deflexión a las trayectorias lumínicas.

Para evitar además errores de señal, se encierra la fuente lumínica, o se protege de otro modo, para asegurar que no se transmite luz de excitación directamente al medio de detección.

El plano de muestra está constituido por la superficie de la muestra. En una realización del aparato, se disponen medios para colocar la muestra en el plano de muestra. El plano de muestra comprende un compartimento de muestra para albergar una muestra líquida al menos durante la detección. El compartimento de muestra puede ser un compartimento fijo o un compartimento reemplazable, tal como un cartucho conformado para ajustarse al plano de muestra.

Un compartimento de muestra, que contiene la muestra que se analiza, dispone preferiblemente todo el volumen de muestra posible de tal modo que pueda exponerse a la fila de elementos de detección, permitiendo por tanto el análisis de un gran área de muestra. Es un procedimiento para lograr esto definir el grosor del compartimento de muestra en una dirección que no sea paralela al plano de elementos de detección, aumentando por tanto el volumen efectivo por área de compartimento de muestra expuesto a los elementos de detección. El grosor óptimo está a menudo determinado por cualquier profundidad de foco efectiva de un sistema de enfoque.

En tales casos, el compartimento de muestra limita la dimensión de la muestra en una dirección que es sustancialmente no paralela al plano de la fila de elementos de detección a un grosor de al menos 20 μm o menos, preferiblemente a un grosor de más de 20 μm , más preferiblemente a un grosor de más de 40 μm , más preferiblemente a un grosor de más de 60 μm , más preferiblemente a un grosor de más de 80 μm , más preferiblemente a un grosor de más de 100 μm , más preferiblemente a un grosor de más de 140 μm , más preferiblemente a un grosor de más de 180 μm , más preferiblemente a un grosor de más de 250 μm , más

preferiblemente a un grosor de más de 500 μm y más preferiblemente a un grosor de más de 1000 μm .

De forma similar, es ventajoso extender el área de detección del compartimento de muestra en una dirección paralela a la fila de elementos de detección, aumentando por tanto el área efectiva de la muestra que se expone a la fila de elementos de detección. Para algunas de estas aplicaciones, la longitud de la dimensión es de 1 mm o más, preferiblemente 2 mm o más, más preferiblemente 4 mm o más, más preferiblemente 10 mm o más, más preferiblemente 20 mm o más, más preferiblemente 40 mm o más, más preferiblemente 100 mm o más, más preferiblemente 200 mm o más y más preferiblemente 400 mm o más.

- 10 Para algunas aplicaciones, se usa un compartimento de muestra tubular, con lo que también es posible aumentar el área de muestra que se analiza simultáneamente aumentando el radio de tal compartimento de muestra tubular. El radio óptimo de tal compartimento de muestra se determina a menudo por la disposición de los diversos componentes del sistema, tales como la profundidad de foco. El tubo puede tener en estas circunstancias un radio interno de más de 0,01 mm, preferiblemente de 0,02 mm o más, más preferiblemente 0,04 mm o más, más preferiblemente 0,1 mm o más, más preferiblemente 0,2 mm o más, más preferiblemente 0,4 mm o más, más preferiblemente 1 mm o más, más preferiblemente 2 mm o más, más preferiblemente 4 mm o más y más preferiblemente 10 mm o más.

El compartimento de muestra puede ser un dispositivo de muestreo desechable como se describe en el documento PCT/DK99/00605.

El aparato de acuerdo con la presente invención permite la valoración de muestras de una amplia variedad de volúmenes. El volumen de la muestra de la que se exponen señales sobre la fila está normalmente en el intervalo entre 0,01 μl y 20 μl , tal como en el intervalo entre 0,01 μl y 10 μl , tal como en el intervalo entre 0,01 μl y 4 μl , tal como en el intervalo entre 0,02 μl y 10 μl , preferiblemente en el intervalo entre 0,04 μl y 2 μl , tal como en el intervalo entre 0,05 μl y 2 μl y tal como en el intervalo entre 0,01 μl y 1,50 μl .

La profundidad de foco del sistema es a menudo importante para la determinación de las dimensiones óptimas del compartimento de muestra. Se ha encontrado que es posible usar una dimensión que supere la profundidad de foco de un sistema de enfoque, incluso hasta una extensión en que la dimensión sea mayor de 1 vez y menor de 1,5 veces la profundidad de enfoque, más preferiblemente mayor o igual a 1,5 veces y menor de 2 veces dicha profundidad de enfoque, más preferiblemente mayor o igual a 2 veces y menor de 3 veces dicha profundidad de enfoque, más preferiblemente mayor o igual a 3 veces y menor de 4 veces dicha profundidad de enfoque, más preferiblemente mayor o igual a 4 veces y menor de 6 veces dicha profundidad de enfoque, más preferiblemente mayor o igual a 6 veces dicha profundidad de enfoque.

La muestra está preferiblemente en estado de reposo durante la exposición para obtener condiciones de estado de reposo para los medios de detección.

40 Filtros

Para obtener la señal fluorescente requerida para la detección, se interpone un filtro en la trayectoria lumínica entre la fuente lumínica y la muestra. El filtro puede ser cualquier filtro adecuado para la luz de excitación/luz de emisión. El filtro puede seleccionarse de entre filtros de interferencia, filtros coloreados y filtros de polarización.

45 Preferiblemente, se proporciona un filtro separado para cada fuente lumínica. Los filtros pueden ser sustancialmente idénticos, pero para algunas muestras puede ser conveniente usar filtros diferentes.

Por ejemplo, puede usarse un dispositivo monocromático para separar la radiación electromagnética en uno o más componentes de longitud de onda antes de transmitir uno o varios de estos componentes de longitud de onda a la muestra uno cada vez o más de uno cada vez, preferiblemente cuando se transmite más de un componente de longitud de onda a la muestra simultáneamente, se transmiten los componentes de longitud de onda a porciones diferentes de la muestra, dando por tanto la oportunidad para obtener información tanto cualitativa como cuantitativa sobre las partículas de la muestra. Esto es en particular de interés cuando la muestra contiene partículas que responden diferentemente a diferentes componentes de longitud de onda.

55 Se prefiere que los filtros para las fuentes lumínicas individuales en un medio lumínico de excitación estén conectados, p.ej. dispuestos en un material de soporte continuo. Así se facilita la construcción del microscopio, puesto que los filtros conectados pueden colocarse en el aparato en una operación de manipulación.

60 El material de soporte puede ser cualquier material adecuado que o bien sea no transparente a la luz de excitación o

que tenga la función de filtro correspondiente a los filtros usados.

La forma del material de soporte corresponde preferiblemente al patrón de disposición de las fuentes lumínicas, tal como semicircular, circular, rectangular, triangular o en forma de cuadrado. Cuando se disponen las luces alrededor del eje de detección-muestra, es importante que las señales emitidas por la muestra se permitan pasar al medio de detección.

En una realización preferida, el filtro es circular y tiene un "orificio" circular, siendo el diámetro de dicho "orificio" preferiblemente correspondiente a o mayor que el diámetro del haz de señal.

Se prevé por la presente invención que los filtros puedan ser cambiables, de modo que puedan transmitirse una variedad de componentes de longitud de onda a la muestra. En esta realización, el filtro o filtros como tales pueden cambiarse o se cambian el filtro y las fuentes lumínicas. En la última situación, se combinan preferiblemente el filtro o filtros y fuentes lumínicas en forma de una unidad de filtro-lumínica reemplazable.

La luz que se transmite a la muestra puede enfocarse por un sistema de enfoque que comprende una o más lentes. El efecto de dicho sistema de enfoque es a menudo aumentar la eficiencia efectiva de la fuente lumínica.

Además, puede usarse un dispositivo monocromático para separar las señales electromagnéticas emitidas por, o transmitidas a través de la muestra en uno o más componentes de longitud de onda antes de detectar tales señales electromagnéticas por un elemento de detección, o bien de tal modo que se mida una longitud de onda cada vez o de tal modo que se midan más de un componente de longitud de onda cada vez. Esto es en particular de interés cuando la muestra contiene partículas que responden diferentemente a diferentes componentes de longitud de onda, por ejemplo cuando una partícula puede emitir fotoluminiscencia con diferentes propiedades dependiendo de la naturaleza de la partícula. Este efecto puede producirse también mediante el uso de más de un tipo de fuente lumínica que tienen diferentes características de longitud de onda, preferiblemente en combinación con un dispositivo monocromático.

En particular, la radiación electromagnética espectralmente rica emitida por o transmitida a través de la muestra puede separarse espacialmente en una pluralidad de componentes de longitud de onda, de tal modo que cada uno de los elementos de detección en la fila de elementos de detección que mide información sustancialmente de la misma fracción de muestra se exponga a componentes de longitud de onda sustancialmente diferentes.

Esto puede lograrse usando uno o varios de los siguientes, pero sin limitación: filtros de interferencia, filtros coloreados, una rejilla óptica, un prisma o cristales ópticamente activos.

Además, la luz de excitación o señales de fluorescencia pueden modularse en intensidad, tal como por cristales ópticamente activos o interferometría, preferiblemente mediante el uso de un interferómetro de Michelson, más preferiblemente mediante el uso de un interferómetro donde pueda moverse al menos una superficie reflectante.

A menudo, es preferible usar unas o varias técnicas de procesamiento de imágenes del estado de la técnica, tales como filtros bidimensionales o identificación de imágenes, para valorar el número de partículas en una muestra, o cualquier propiedad morfológica de una partícula.

El medio de detección puede comprender cualquier detector que pueda percibir o detectar la señal de fluorescencia emitida por la muestra.

En una realización preferida, el medio de detección comprende un detector que es una fila de dispositivos detectores o elementos de detección, tales como un dispositivo de carga acoplada (CCD), el CCD puede ser un CCD de cuadro completo, CCD de transferencia de cuadro, CCD de transferencia interlineal, CCD de barrido lineal, fila de CCD p.ej. de longitud de onda intensificada, fila de planos focales, fila de fotodiodos o fila de fotodetectores tales como CMOS. El CMOS es preferiblemente un sensor de imágenes de CMOS con condiciones de señal integradas en chip y/o procesamiento de señal. Independientemente de la elección de cualquiera de los dispositivos de detección anteriores, el medio de detección puede comprender además un CCD o CMOS en blanco y negro o en color.

El tamaño de los elementos de detección determina en cierta medida su sensibilidad. En algunas aplicaciones, es por lo tanto de interés tener elementos de detección de un tamaño de aproximadamente $1 \mu\text{m}^2$ o menor. En ciertas situaciones, el tamaño de los elementos de detección en la fila de elementos de detección es menor de $20 \mu\text{m}^2$, preferiblemente menor de $10 \mu\text{m}^2$, más preferiblemente menor de $5 \mu\text{m}^2$, más preferiblemente menor de $2 \mu\text{m}^2$, más preferiblemente menor o igual a $1 \mu\text{m}^2$. En otras situaciones, el tamaño de los elementos de detección en la fila de

elementos de detección es mayor o igual a $5000 \mu\text{m}^2$, tal como mayor o igual a $2000 \mu\text{m}^2$, más preferiblemente mayor o igual a $1000 \mu\text{m}^2$, tal como mayor o igual a $500 \mu\text{m}^2$ o incluso mayor o igual a $200 \mu\text{m}^2$, más preferiblemente mayor o igual a 100 y menor de $200 \mu\text{m}^2$, más preferiblemente mayor o igual a 50 y menor de $100 \mu\text{m}^2$, más preferiblemente mayor o igual a 20 y menor de $50 \mu\text{m}^2$.

5

La fila de elementos de detección es preferiblemente sensible a radiación electromagnética de longitud de onda en una o varias de las siguientes regiones: 100 nm a 200 nm, 200 nm a 600 nm, 300 nm a 700 nm, 400 nm a 800 nm, 600 nm a $1 \mu\text{m}$, 800 nm a $2 \mu\text{m}$, $2 \mu\text{m}$ a $10 \mu\text{m}$, $5 \mu\text{m}$ a $10 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$ a $20 \mu\text{m}$, $20 \mu\text{m}$ a $40 \mu\text{m}$.

- 10 La inclusión de un dispositivo de enfoque para el enfoque de una señal desde la muestra a los elementos de detección de tal manera que se maximice el ángulo de recogida, estando definido el ángulo de recogida como el ángulo de plano completo en que se detecta una señal, se ha encontrado en muchas situaciones que da condiciones mejoradas para valoración. Sorprendentemente, se ha encontrado que un ángulo de recogida tan amplio, incluso en la medida en que el objetivo usado en el enfoque distorsionaba la relación de aspecto de la imagen de cualquier
- 15 partícula diferentemente a través del plano en que se colocaban los elementos de detección, o producía variación en el enfoque a través de la muestra que se analiza, o reducción de la calidad de enfoque, podía usarse en la valoración de, por ejemplo, el número de partículas en la muestra.

- La relación de aspecto de los elementos de detección puede ser importante en la recogida de señales para la valoración de partículas. Se prefiere algunas veces una relación de aproximadamente 1/1, pero en algunas condiciones, puede preferirse usar una relación diferente de 1/1. En particular, cuando esto facilita la detección de señales de volumen aumentado de cualquier muestra, permitiendo por tanto la valoración simultánea de, por ejemplo, más partículas. En esas circunstancias, la relación de la más corta de altura o anchura a la más larga de altura o anchura de los elementos de detección en la fila de elementos de detección es sustancialmente menor o
- 20 igual a 1, preferiblemente menor de 1/2, más preferiblemente menor de 1/4, más preferiblemente menor de 1/10, más preferiblemente menor de 1/50, más preferiblemente menor de 1/100 y más preferiblemente menor de 1/200.

- Otro modo de expresar la relación a la que debería formarse preferiblemente la imagen en la fila es considerar la formación de imagen de una partícula individual de la muestra en los elementos de detección. Se prefiere a menudo
- 30 formar imágenes de las partículas individuales en como máximo 100 elementos de detección, tal como como máximo 81 elementos de detección, tal como como máximo 64 elementos de detección, tal como como máximo 49 elementos de detección, tal como como máximo 36 elementos de detección, tal como como máximo 25 elementos de detección, en particular como máximo 16 elementos de detección y más preferiblemente como máximo 9 elementos de detección. Se prefiere aún más formar imágenes de las partículas individuales cuyo parámetro o
- 35 parámetros se van a valorar como máximo en 5 elementos de detección, o incluso como máximo en 1 elemento de detección. El mayor número de elementos por partícula proporcionará más información sobre las partículas individuales, mientras que el menor número de elementos por partícula aumentará el recuento total que puede hacerse en una exposición de detección.

- 40 Las señales de al menos una porción de la muestra se enfocan en la fila de elementos de detección mediante el uso de un medio de enfoque, preferiblemente mediante el uso de una lente, sin embargo es posible usar dos lentes o más de dos lentes. El número de lentes usadas para el sistema de enfoque puede afectar a la complejidad de cualquier sistema de medida.

- 45 El enfoque de una señal desde la muestra a cualquier detector depende de la posición de la muestra respecto a cualquier detector. Cuando la construcción del sistema de medida es tal que la posición relativa de la muestra y cualquier detector puedan variar, entonces hay ventajas en poder ajustar el enfoque del sistema. Esto puede conseguirse a menudo tomando en primer lugar al menos una medida de cualquier señal de la muestra y entonces, basándose en esta, ajustar el enfoque del sistema. Este procedimiento puede repetirse una serie de veces para
- 50 obtener un enfoque aceptable. De la misma manera, se ajusta el enfoque de la señal desde la muestra o material de muestra, preferiblemente cuando la extensión del ajuste se determina por al menos una medida de una señal desde la muestra.

- El ángulo de recogida de la disposición de enfoque usada puede tener efecto sobre la intensidad de cualquier señal recogida en la fila de elementos de detección. Cuando se necesita una alta sensibilidad, es por lo tanto práctico
- 55 aumentar el ángulo de recogida. El tamaño preferido del ángulo de recogida puede determinarse también por otros requisitos que se piden al sistema, tales como profundidad de enfoque. En estas situaciones, el ángulo de recogida del medio de enfoque se preferiblemente de al menos 2 grados, preferiblemente más de 5 grados, más preferiblemente más de 15 grados, más preferiblemente más de 20 grados, más preferiblemente más de 50 grados,
- 60 más preferiblemente más de 120 grados y más preferiblemente más de 150 grados.

La señal que se detecta está causada sustancialmente por uno o varios de los siguientes: fotoluminiscencia con un tiempo de vida del estado de salida menor o igual a 10^{-6} segundos, fotoluminiscencia con un tiempo de vida del estado de salida mayor de 10^{-6} segundos, quimioluminiscencia, dispersión de Raman, atenuación de la radiación electromagnética, absorción de la radiación electromagnética o dispersión de la radiación electromagnética.

Las señales medidas de uno o más elementos de detección pueden corregirse por sesgos sistemáticos o variables mediante el uso de un medio de cálculo, lográndose la corrección del sesgo mediante el uso de uno o más valores predefinidos, preferiblemente cuando cada señal medida para uno o más elementos de detección en dicha fila de elementos de detección tiene uno o más valores predefinidos, más preferiblemente cuando se determina cada valor predefinido basándose en una o más medidas anteriores.

La corrección de sesgos puede efectuarse restando los resultados obtenidos en una o varias de otras medidas de la señal original, preferiblemente cuando las otras medidas son una o varias medidas de la misma muestra o material de muestra, más preferiblemente cuando la otra medida es la medida tomada anteriormente de la misma muestra o material de muestra.

También la señal de uno o más elementos de detección puede corregirse en intensidad mediante el uso de un medio de cálculo, lográndose dicha corrección del sesgo mediante el uso de uno o más valores predefinidos, preferiblemente cuando cada señal medida para uno o más elementos de detección en dicha fila de elementos de detección tiene uno o más valores predefinidos, más preferiblemente cuando se determina cada valor predefinido basándose en una o más medidas anteriores.

En algunas situaciones, p.ej. en una conversión de analógico a digital, la conversión podría ser también de interés para ajustar el nivel de 2, preferiblemente 3, más preferiblemente 4, más preferiblemente 5, más preferiblemente 6, más preferiblemente 7, más preferiblemente 8, más preferiblemente más de 8 canales de salida separados de tal modo que uno, preferiblemente más de uno, de los canales de salida tenga un nivel sustancialmente diferente del otro u otros canales de salida, donde la identificación de cuál de los canales de salida, o combinación de los mismos, tiene un nivel de salida sustancialmente diferente está correlacionada con la intensidad de dicha señal.

Para el análisis de cualquier señal medida, a menudo es necesario digitalizar la señal de tal modo que la intensidad dada de cualquier señal se transforme en una representación digital. Esto puede hacerse teniendo una serie de canales, en que la información sobre cuál de estos canales tiene una señal que difiere de los otros canales determina la intensidad, o incluso teniendo más de uno de estos canales que forman una combinación, preferiblemente de modo similar a una representación binaria.

La información de las señales detectadas por los medios de detección se introduce en un procesador para el procesamiento, presentación y opcionalmente almacenamiento de la información.

La información de señal puede presentarse en una pantalla conectada con el procesador y/o imprimirse. La información presentada puede ser cualquier clase de información relativa a las señales medidas y/o al sistema usado, tal como número, distribución de tamaño, morfología, clasificación de partículas, longitud de onda de excitación, longitud de onda de emisión o aumentos.

El espacio de almacenamiento, por ejemplo, usado para almacenar información sobre señales medidas de elementos de detección es a menudo uno de esos componentes que tienen un efecto considerable sobre el coste de producción. Es por lo tanto de interés poder efectuar la valoración de parámetros sin ningún uso sustancial de tal espacio de almacenamiento, de tal modo que se efectúe la valoración de las partículas biológicas en una muestra sin el uso de sustancialmente ningún medio de espacio de almacenamiento que se use para almacenar señales medidas de los elementos de detección en la fila de elementos de detección.

Por otro lado, a menudo es difícil lograr la valoración sin el uso de ningún espacio de almacenamiento, pero preferiblemente la cantidad de tal espacio de almacenamiento no debería ser mayor de lo necesario para almacenar la información de todos los elementos de detección medidos, preferiblemente cuando solo puede almacenarse una fracción de la información.

En algunas situaciones, se almacena la señal medida de los elementos de detección en la fila de elementos de detección mediante un espacio de almacenamiento, pudiendo almacenar el espacio de almacenamiento una serie de medidas equivalente a, o menor que, el número de elementos de detección, preferiblemente menor de 1/2 el número de elementos de detección, más preferiblemente menor de 1/4 el número de elementos de detección, más

preferiblemente menor de 1/8 el número de elementos de detección, más preferiblemente menor de 1/16 el número de elementos de detección, más preferiblemente menor de 1/32 el número de elementos de detección, más preferiblemente menor de 1/64 el número de elementos de detección, más preferiblemente menor de 1/128 el número de elementos de detección, más preferiblemente menor de 1/256 el número de elementos de detección, más preferiblemente menor de 1/512 el número de elementos de detección y más preferiblemente menor de 1/1024 el número de elementos de detección en la fila de elementos de detección.

En otras ciertas circunstancias, es ventajoso que la señal medida de los elementos de detección en la fila de elementos de detección se almacene mediante un espacio de almacenamiento, pudiendo el espacio de almacenamiento almacenar una serie de medidas mayor que el número de elementos de detección, preferiblemente equivalente a o mayor de 2 veces el número de elementos de detección, más preferiblemente equivalente o mayor de 4 veces el número de elementos de detección, más preferiblemente equivalente o mayor de 8 veces el número de elementos de detección, más preferiblemente equivalente o mayor de 16 veces el número de elementos de detección, más preferiblemente equivalente o mayor de 32 veces el número de elementos de detección, más preferiblemente equivalente o mayor de 64 veces el número de elementos de detección, más preferiblemente equivalente o mayor de 128 veces el número de elementos de detección, más preferiblemente equivalente o mayor de 256 veces el número de elementos de detección, más preferiblemente equivalente o mayor de 512 veces el número de elementos de detección y más preferiblemente equivalente o mayor de 1024 veces el número de elementos de detección en la fila de elementos de detección.

Otros aspectos más complicados de la valoración de parámetros pueden requerir el uso de una considerable cantidad del espacio de almacenamiento. En este aspecto, puede ser necesario por lo tanto tener un espacio de almacenamiento que pueda almacenar más información que la recogida en una medida de los elementos de detección usados.

Es posible hacer la correlación y la valoración de los parámetros de la muestra usando un medio de cálculo, preferiblemente un ordenador digital comercialmente disponible en Analogue Devices (ADSP 2101), equipado con espacio de almacenamiento que puede almacenar solo información en una cantidad sustancialmente equivalente a una pequeña fracción del número total de elementos de detección, basándose entonces la valoración del número de objetos en el procesamiento de datos a tiempo sustancialmente real, preferiblemente de tal modo que se use la información medida de cada elemento de detección, o una línea de elementos de detección, o dos o más líneas de elementos de detección, sustancialmente sin ningún retardo, tal como el retardo que causaría de otro modo almacenar la información medida.

Sin embargo, a menudo se prefiere almacenar sustancialmente toda la información medida mediante el uso de un primer medio de cálculo, preferiblemente un ordenador digital, antes del procesamiento de la información por un segundo medio de cálculo, preferiblemente un ordenador digital, y permitir por tanto procesar la información medida sustancialmente a la misma velocidad que se obtiene, pero con un retardo temporal sustancial entre la medida de cualquier información y el procesamiento de la misma información; preferiblemente esto se logra usando solo un medio de cálculo, preferiblemente un ordenador digital equipado con suficientes recursos para lograr la tarea.

El aparato es particularmente útil para valorar parámetros de una muestra a pocos aumentos o ampliaciones. Así, es posible conseguir información relativa a una gran área de la muestra.

Los aumentos pueden proporcionarse por el medio de enfoque. Los aumentos de tal enfoque pueden ser diferentes de 1/1, dependiendo de la organización de los otros componentes del sistema o de las partículas o material de muestra usado. Por ejemplo, la ampliación puede ser práctica cuando se valoran propiedades morfológicas de una partícula.

En situaciones en que las partículas son relativamente pequeñas, la relación del tamaño de una partícula biológica al tamaño de la imagen de la partícula biológica en la fila de elementos de detección podría ser de 1/1 o menor, preferiblemente menor de 1/1 y mayor de 1/100, e incluso menor de 1/1 y mayor de 1/40, o en otras situaciones preferidas menor de 1/1 y mayor de 1/10, e incluso en algunas situaciones se prefiere que la relación sea menor de 1/1 y mayor de 1/4, más preferiblemente menor de 1/1 y mayor de 1/2.

Quando las partículas en cuestión tienen dimensiones que son comparables con el tamaño de un elemento de detección, a menudo se prefiere tener aumentos de aproximadamente 1/1, enfocando por tanto la imagen de cualquier partícula en uno cualquiera o solo unos pocos elementos de detección. Esto puede dar en algunas condiciones una detección favorable de cualquier señal.

60

En estas situaciones, se prefiere que la relación del tamaño de una partícula biológica al tamaño de la imagen de la partícula biológica en la fila de elementos de detección esté en el intervalo entre 5/10 y 20/10, preferiblemente en el intervalo entre 6/10 y 18/10, más preferiblemente en el intervalo entre 7/10 y 16/10, más preferiblemente en el intervalo entre 8/10 y 14/10, más preferiblemente en el intervalo entre 9/10 y 12/10, más preferiblemente sea sustancialmente igual a 10/10.

Quando se analizan partículas que tienen dimensiones que son comparables con o mayores que los elementos de detección usados, a menudo es ventajoso reducir el tamaño de la imagen de tal partícula en un grado en que el tamaño de la imagen sea comparable al tamaño de un elemento de detección.

10

En estas situaciones, se prefiere que la relación del tamaño de una partícula biológica al tamaño de la imagen de la partícula biológica en la fila de elementos de detección sea de 1/1 o menor, preferiblemente menor de 1/1 y mayor de 1/100, más preferiblemente menor de 1/1 y mayor de 1/40, más preferiblemente menor de 1/1 y mayor de 1/10, más preferiblemente menor de 1/1 y mayor de 1/4, más preferiblemente menor de 1/1 y mayor de 1/2.

15

Por tanto, se prefiere a menudo que la representación espacial expuesta en la fila de elementos de detección se someta a una ampliación lineal tal que la relación de la imagen de una dimensión lineal en la fila de elementos de detección a la dimensión lineal original en el dominio de exposición sea menor de 40:1, normalmente como máximo 20:1, preferiblemente menor de 10:1 y en muchos casos incluso como máximo 6:1 o incluso menor de 4:1.

20

La ampliación se correlaciona adecuadamente con los parámetros para determinar, en particular con el tamaño de las partículas para las que se va a valorar un parámetro. El tamaño de la partícula se da aproximando la partícula a una partícula redonda, donde el tamaño mencionado a continuación se refiere al diámetro de la partícula. Preferiblemente, se usa la dimensión menor de la partícula como diámetro cuando se aproxima la partícula a una partícula redonda. Por tanto, por ejemplo cuando el tamaño está entre 0,1 μm y 5 μm , tal como entre 1/3 μm y 3 μm , la relación anteriormente mencionada está preferiblemente en el intervalo entre 40:1 y 1:10, más preferiblemente en el intervalo entre 20:1 y 1:10, tal como en el intervalo entre 10:1 y 1:10. En la mayoría de realizaciones que se ha probado que dan excelentes resultados en la práctica, la relación está en el intervalo entre 6:1 y 2:1.

30

Quando el tamaño está entre 1 μm y 100 μm , tal como entre 3 μm y 100 μm , tal como entre 5 μm y 100 μm , la relación anteriormente mencionada está normalmente en el intervalo entre 3:1 y 1:100, preferiblemente en el intervalo entre 2:1 y 1:100. En muchas realizaciones prácticas, la relación estará en el intervalo entre 2:1 y 1:2. Puede ser interesante, en particular con elementos de detección pequeños de alta precisión, trabajar con relaciones muy pequeñas, tal como en el intervalo entre 1:4 y 1:100, p.ej. en el intervalo entre 1:1 y 1:100.

35

Sorprendentemente, se ha encontrado que la relación de aspecto de una imagen puede distorsionarse considerablemente en la fila de elementos de detección sin que esto tenga un efecto negativo considerable sobre la valoración de partículas. En tal situación, se prefiere que la relación de la más corta a la más larga de las dos dimensiones de la imagen de una partícula biológica en la fila de elementos de detección sea de sustancialmente 1 o menos, preferiblemente 1/2 o menos, más preferiblemente 1/4 o menos, más preferiblemente 1/10 o menos, más preferiblemente 1/50 o menos, más preferiblemente 1/100 o menos, más preferiblemente 1/200 o menos respecto a la relación de las correspondientes dimensiones de la partícula biológica. En tal situación, la relación de la más corta a la más larga de las dos dimensiones de la imagen de una partícula biológica en la fila de elementos de detección no es en ciertas circunstancias sustancialmente la misma en el área cubierta por la fila de elementos de detección.

45

El aparato de acuerdo con la presente invención puede usarse como un aparato de un lado, es decir un aparato para el que la luz de excitación se dirige a la muestra desde el mismo lado de la muestra que el lado por el que se detectan la señales emitidas por la muestra.

50

Mediante este aparato se han conseguido una variedad de ventajas en comparación con los microscopios de fluorescencia convencionales. En primer lugar, es posible disponer la muestra para valorar directamente en el plano de muestra en lugar de deslizarla en el plano de muestra entre el detector y la luz de excitación. Además, se ha hecho posible detectar fluorescencia de superficie de una muestra que no es transparente.

55

Como se menciona anteriormente, también es posible aumentar la intensidad de la luz de excitación sin comprometer los detectores.

También muestras que tienen una naturaleza con la que normalmente no es posible disponer la muestra en un microscopio pueden valorarse mediante el uso del presente sistema, porque el microscopio puede colocarse directamente sobre la muestra con lo que la superficie de la muestra constituye simplemente el plano de muestra.

60

Finalmente, es posible producir un aparato más compacto, y así más fácilmente manipulable, en que el medio lumínico de excitación se dispone en el mismo lado del plano de muestra que el detector, acortando por tanto el eje del aparato en al menos un 25 % en comparación con aparatos convencionales.

5

Mediante la presente invención, es posible valorar parámetros de una muestra que hasta la fecha se han valorado fiablemente solo mediante el uso de un equipo de citometría de flujo. Es posible valorar parámetros de una muestra grande en una exposición, reduciendo por tanto los errores estadísticos con los que se cuenta normalmente cuando se valoran muestras grandes al valorar solo partes de la misma por exposición.

10

Además, es posible obtener más de una señal de fluorescencia de la muestra en una exposición, facilitando así la clasificación de las partículas de la muestra, debido a sus diferentes señales de fluorescencia.

Por tanto, el aparato de un lado de acuerdo con la invención puede construirse con una amplia variedad de combinaciones, que están todas dentro del alcance de esta invención. En particular, se concibe la combinación principal discutida a continuación.

15

El aparato puede construirse como un aparato de fluorescencia simple donde las fuentes lumínicas y filtros lumínicos de excitación son idénticos.

20

Puede proporcionarse un aparato de fluorescencia múltiple, tal como un aparato que proporciona al menos dos señales de fluorescencia diferentes, mediante al menos uno de los siguientes:

- Una primera y una segunda fuentes lumínicas, emitiendo dichas fuentes lumínicas luz de diferentes longitudes de onda.

25

- Un primer y un segundo filtros que son diferentes, con lo que se expone la muestra a luz de excitación de al menos dos longitudes de onda diferentes.

- Un primer y un segundo filtros de emisión que son diferentes, tales como un filtro de banda dual, con lo que se emiten al menos dos señales de fluorescencia diferentes al detector o detectores.

30

Sin embargo, es una ventaja adicional que el presente aparato puede construirse como un aparato de dos lados, con lo que la luz de excitación puede dirigirse a la muestra desde ambos lados de las muestras, o los medios de detección se disponen para detectar señales de ambos lados de las muestras, o una combinación de ambos.

Por tanto, se entiende por un aparato de dos lados un aparato de acuerdo con la invención dotado adicionalmente de:

35

- Un segundo medio lumínico de excitación en un segundo plano lumínico, siendo dicho segundo plano lumínico paralelo al plano de muestra y localizado al otro lado del plano de muestra en oposición al primer plano lumínico.

40

Así, la muestra recibe luz de excitación de ambos lados de la muestra, aumentando considerablemente la energía expuesta a la muestra; y/o

- Un segundo medio de detección dispuesto de modo que la muestra se coloque entre el primer medio de detección y el segundo medio de detección. Por la presente, es posible valorar diferente información referente a las señales de la muestra mediante detección de una exposición. Por ejemplo, el primer medio de detección puede adaptarse para registrar el número de partículas de la muestra, mientras que el segundo medio de detección se adapta para registrar la morfología de las partículas en la muestra.

45

En una realización preferida, el aparato de dos lados comprende tanto un sistema de excitación de dos lados como un sistema de detección de dos lados.

50

El segundo medio lumínico de excitación puede ser cualquiera de los medios lumínicos discutidos con relación al primer medio lumínico. Dependiendo del fin del microscopio de fluorescencia, el medio lumínico puede ser diferente o idéntico.

Además, puede ser de interés que la luz de excitación constituya bandas de diferente longitud de onda, con lo que se consigue iluminación de diferentes longitudes de onda. El segundo medio de detección puede ser cualquiera de los medios de detección discutidos en relación con el primer medio de detección.

55

La siguiente tabla 1 muestra una lista no exhaustiva de combinaciones de configuraciones de sistema de acuerdo con la presente invención.

60

Tabla 1: Configuraciones de sistema

Detector 1	Filtro de emisión 1	Excitación 1	Filtro de excitación 1	S	Filtro de excitación 2	Excitación 2	Filtro de emisión 2	Detector 2	Configuración nº
X	x	X	x						1
X	x	x/y	x/y						2
X	x	x	x		x	x			3
X	x	x	x		y	y			4
X	x	x	x				x	y	5
X	x	x	x		x	x	x	y	6
X	x	x	x		y	y	y	y	7
X	x	x	x		x	x	y	y	8
X	x	x	x					x	9
X	x	x	x		x	x		x	10

X designa un tipo de detector, filtro de emisión, fuente de excitación y filtro de excitación respectivamente, e Y designa otro tipo de detector, filtro de emisión, fuente de excitación y filtro de emisión, respectivamente.

5

Las configuraciones nº: 1 y 2 corresponden a un sistema de un lado, donde en la conf. 2 se aplican dos fuentes y/o filtros lumínicos de excitación diferentes.

Las configuraciones nº: 3 y 4 corresponden a un sistema de excitación de dos lados, o bien para aumentar la cantidad de luz de excitación (conf. 3) o para añadir otro tipo de luz de excitación (conf. 4).

10

Las configuraciones nº: 5 y 6 son un sistema de detección de dos lados donde los dos detectores son diferentes, tal como por ejemplo por tener diferentes aumentos. La config. nº 6 usa además excitación doble.

La configuración nº 7 es un sistema de dos lados con respecto a la excitación así como la detección. Todos los parámetros, es decir, detector, filtro de emisión, fuente de excitación y filtro de excitación respectivos, son diferentes para los dos lados, ofreciendo la posibilidad de obtener una amplia variedad de información de la muestra.

15

La configuración nº 8 es también un sistema de dos lados con respecto a la excitación así como la detección. En contraposición a la config. nº 7, solo los detectores y los filtros de emisión son diferentes para los dos lados, ofreciendo de nuevo la posibilidad de obtener una variedad de información de la muestra.

20

Las configuraciones nº 9 y 10 emplean ambas un microscopio como segundo detector. En la configuración nº 10, el sistema es de dos lados con respecto a las fuentes de excitación. El microscopio puede ser cualquier clase de microscopio, tal como un microscopio convencional.

25

Como se muestra anteriormente, se prevé cualquier combinación adecuada de fuentes lumínicas, filtros, aumentos y detectores por la presente invención, también combinaciones no mostradas expresamente en esta solicitud. A continuación, se discuten realizaciones preferidas del sistema de dos lados.

30

El aparato puede ser un sistema de fluorescencia simple, donde se expone la muestra a luz de excitación de longitud de onda sustancialmente idéntica desde dos lados. Así, puede intensificarse la luz de excitación.

En un aparato lumínico de excitación de dos lados, un primer medio lumínico de excitación expone la muestra a una longitud de onda por un lado de la muestra, y la segunda luz de excitación expone la muestra a otra longitud de onda por el otro lado de la muestra. Se entiende en la presente memoria que, por supuesto, la primera luz de excitación y la segunda luz de excitación, respectivamente, pueden comprender diferentes fuentes y/o filtros lumínicos, con lo que la muestra puede iluminarse con aún más longitudes de onda de lo discutido anteriormente.

35

El aparato lumínico de excitación de dos lados puede comprender un detector, con lo que el aparato funciona como un sistema parcialmente transmisor.

40

En otra realización, el aparato lumínico de excitación de dos lados comprende dos medios de detección. Así, puede obtenerse una cantidad aumentada de información de la muestra. En un aspecto, los dos medios de detección pueden obtener imágenes iguales, aunque especulares (las imágenes en los dos detectores son imágenes especulares entre sí), proporcionando la información relativa a la muestra una validación de la información.

45

El aparato de acuerdo con la invención puede ser también un aparato de detección de dos lados que usa un medio lumínico de excitación de un lado. Así, un detector detecta señales que se transmiten a través de la muestra.

Independientemente de la disposición de la luz de excitación, un sistema de detección de dos lados puede aumentar la cantidad de información recibida. Por ejemplo, pueden recibirse diferentes longitudes de onda por los dos detectores y/o pueden usarse diferentes detectores que tienen diferente sensibilidad. Además, al usar por ejemplo
 5 aumentos diferentes para los dos detectores, puede aumentarse la información relativa a la muestra. Un lado del sistema puede valorar por ejemplo el número de partículas en una gran área de la muestra, por ejemplo mediante bajos aumentos, y el otro lado del sistema puede valorar la morfología de las partículas usando unos mayores aumentos. Las combinaciones de aumentos pueden ser, por ejemplo, 1:1 y 1:4, 1:1 y 1:10, 1:2 y 1:4, 1:2 y 1:10. La información de señal transferida desde los dos detectores se transmite preferiblemente al mismo procesador, con lo
 10 que la información puede presentarse separadamente así como combinarse, proporcionando por ejemplo información específica de la morfología relacionada con partículas específicas cuya posición y número se detectan por el otro detector.

Es también posible usar el aparato de acuerdo con la invención como un aparato de dos lados en que el otro lado es
 15 un microscopio óptico convencional o cualquier otro tipo de microscopio. Cuando se usa el otro lado del sistema como microscopio no de fluorescencia, la luz de iluminación para el microscopio puede disponerse adecuadamente en cualquier lado de la muestra con relación al microscopio.

El aparato de dos lados que comprende un microscopio convencional en un lado puede comprender un sistema
 20 lumínico de excitación de un lado o dos lados para la parte de fluorescencia del sistema.

Cuando se usa un sistema de detección de dos lados, el procesador del primer medio de detección puede recibir datos de señal del segundo medio de detección también para simplificar el aparato. Sin embargo, es posible instalar un procesador separado para cada medio de detección.
 25

La fuente de potencia eléctrica del aparato puede ser un transformador, capaz de transformar la fuente eléctrica alterna con un voltaje alterno de entre -150 y 150 voltios, o con un voltaje alterno de entre -250 y 350 voltios, o con un voltaje alterno de entre -350 y 350 voltios, en voltaje de corriente sustancialmente continua.

30 La invención se refiere además a un procedimiento de valoración de una señal de fluorescencia de una muestra, donde la muestra se dispone en el plano de muestra del aparato como se discute anteriormente.

De acuerdo con el procedimiento, se expone una primera superficie de la muestra directamente a la luz de excitación de un primer medio lumínico que tiene al menos una primera fuente lumínica, se enfocan las señales de
 35 fluorescencia de la primera superficie sobre el detector o detectores mediante el uso de un medio de enfoque y se detectan por el detector o detectores. Se procesan las señales detectadas, con lo que se obtienen los datos de señal. Estos datos de señal pueden correlacionarse entonces con el parámetro para valorar, y finalmente se valora el parámetro o parámetros de la muestra.

40 La muestra puede ser cualquier muestra de la que sea adecuado detectar una señal o señales de fluorescencia. En muchas aplicaciones, la muestra es una muestra líquida cuyo contenido se va a valorar. A menudo, la señal de fluorescencia está relacionada con un parámetro de una partícula de la muestra, tal como el número de partículas en la muestra y/o la morfología de las partículas en la muestra. En particular, en este caso es ventajoso aplicar el procedimiento en un aparato de dos lados de acuerdo con la invención, con lo que pueden valorarse ambos
 45 parámetros simultáneamente, cada uno por un medio de detección individual.

Así, el procedimiento puede aplicarse en una amplia variedad de aplicaciones tales como:

La invención permite el análisis de diversos tipos de partículas biológicas como se describe anteriormente, y la
 50 invención es por lo tanto particularmente adecuada para la valoración del número de partículas en un material de muestra líquido en las siguientes aplicaciones:

En particular, en relación con el análisis de muestras de leche, tales como leche para productos lácteos, la invención es adecuada. En la leche, la invención puede aplicarse para analizar células somáticas, tales como el tamaño y/o número de células somáticas en la leche. Además, puede llevarse a cabo el análisis de bacterias en la leche.
 55

La leche puede analizarse en cualquier punto de tratamiento de la leche, pero la invención es particularmente adecuada para análisis en línea o junto a la línea, donde la leche se analiza durante el ordeño. Las diversas operaciones incorporadas al dispositivo permiten que incluso personas no especialistas en las técnicas de laboratorio efectúen resultados válidos.
 60

En relación con el análisis de sangre, el aparato es adecuado para todas las valoraciones de partículas sanguíneas, tales como la valoración del número, morfología y tipo de diversos tipos de células sanguíneas.

La invención puede usarse en laboratorio o en la práctica general para recuentos celulares o recuentos diferenciales.

5 Además, la invención puede usarse por pacientes, por ejemplo cuando se controlan los recuentos celulares totales en conexión con tratamientos tales como tratamiento del cáncer.

En las muestras de orina pueden analizarse de acuerdo con la presente invención bacterias, por ejemplo cuando es necesaria una valoración del recuento celular total en conexión con infecciones del tracto urinario.

10

También puede usarse la invención cuando se diagnostica la causa específica de infecciones del tracto urinario, tales como el tipo de bacterias.

Además, puede valorarse el semen en el presente aparato, por ejemplo puede realizarse el recuento de
15 espermatozoides, el recuento total así como el recuento de espermatozoides viables y/o espermatozoides muertos. También puede examinarse la morfología de los espermatozoides mediante el presente aparato.

Puede realizarse la valoración de partículas en agua por la presente invención, tal como el control de agua potable, control de aguas residuales o de agua de una planta purificadora de agua. En todas las aplicaciones, el control
20 puede estar relacionado con el recuento de partículas totales, tal como el recuento de bacterias, o puede estar relacionado más particularmente con un proceso de monitorización de bacterias específicas, tales como bacterias patológicas.

Con respecto a la valoración de bacterias, la invención puede usarse también en conexión con muestras de alimento
25 o pienso así como muestras petroquímicas (p.ej., para combustible de avión).

Además, puede realizarse por la invención el control de la fermentación, es decir el control del crecimiento celular y las células viables en tanques de fermentación. Esto se relaciona con todos los campos técnicos que usen fermentación, tales como la industria farmacéutica, para producir una composición de péptido o proteína.

30

El aparato está dotado de un compartimento de muestra para albergar el líquido durante la valoración como se discute anteriormente.

A continuación, se discute la invención con más detalle en relación con los dibujos.

35

En la Fig. 1, se muestra un aparato 1 de acuerdo con la invención en forma esquemática. Se dispone la muestra en un compartimento de muestra 2 del plano de muestra. Se expone la muestra a la luz de excitación de las fuentes lumínicas 4a, 4b en el medio lumínico de excitación 3 a través de la trayectoria lumínica principal 5a, 5b.

40 Se emiten señales de fluorescencia por la muestra al medio de detección 6, que comprende al menos un detector 7. La trayectoria de las señales emitidas sigue el eje entre la muestra y el detector, el eje de detección-muestra 8.

Se transmiten los datos de señal a un procesador (no mostrado) acoplado con el medio de detección 6. Se filtran las señales de fluorescencia de la muestra mediante el filtro de emisión 14 y se enfocan al medio de detección 9
45 mediante una lente de enfoque 10.

Se disponen las fuentes lumínicas 4a, 4b en una carcasa lumínica 11, con lo que se evita la transmisión de la luz de excitación directamente al medio de detección. Además, se colocan los filtros lumínicos de excitación 12a, 12b en el haz lumínico de excitación.

50

La Fig. 2 muestra una sección transversal del material de soporte circular 13 de los filtros lumínicos de excitación, donde se ha indicado la posición de las fuentes lumínicas por círculos en líneas discontinuas.

En la Fig. 3, se muestran la trayectoria lumínica y la trayectoria de señal con más detalle. En la trayectoria lumínica, se muestra la trayectoria lumínica principal como 5. Además, se muestra el eje de detección-muestra por las líneas discontinuas 8. El ángulo de recogida del sistema se designa C, mostrado entre dos flechas, y el ángulo entre la trayectoria lumínica principal y el eje de detección-muestra se designa E.

En la Fig. 4, se muestra un sistema de excitación/detección de dos lados 1 donde los sistemas en cada lado de la muestra son idénticos y como se describen para un sistema de un lado de la Fig. 1
60

La Fig. 5 muestra un sistema de excitación de dos lados donde se expone la muestra 2 a la luz de excitación de las fuentes lumínicas 4a, 4b en el primer medio lumínico de excitación 3a y a la luz de excitación de las fuentes lumínicas 4a, 4b en el segundo medio lumínico de excitación 3b por ambos lados de muestra 2. Como se discute anteriormente, las fuentes lumínicas pueden ser idénticas o diferentes dependiendo de la información para valorar. Además, los filtros usados para cada fuente lumínica pueden ser diferentes o idénticos.

Se transmiten las señales de fluorescencia a través de y se reflejan por la muestra debido a la disposición de la luz de excitación, y se emiten al medio de detección 6. La trayectoria de las señales emitidas sigue el eje entre la muestra y el detector, el eje de detección-muestra 8.

Se transmiten los datos de señal a un procesador acoplado con el medio de detección como se describe anteriormente.

La Fig. 6 muestra un sistema de detección de dos lados que usa un sistema de excitación de dos lados, donde las señales de fluorescencia reflejadas de la muestra 2 se detectan por el medio de detección 6a que comprende el detector 7a. Se transmiten las señales de fluorescencia reflejadas a través del filtro 14a y se enfocan por la lente 10a.

Además, se detectan las señales de fluorescencia transmitidas por la muestra 2 por el medio de detección 6b que comprende el detector 7b. Se transmiten las señales de fluorescencia reflejadas a través del filtro 14b y se enfocan por la lente 10b.

El filtro 14a es preferiblemente diferente del filtro 14b, con lo que es obtenible información relativa a al menos dos señales de fluorescencia diferentes.

También los aumentos en los dos sistemas de detección pueden ser diferentes, por ejemplo siendo la lente 10a diferente de la lente 10b.

30 Ejemplo

Una imagen de células obtenida de acuerdo con la presente invención.

Se efectúa una valoración del número de células somáticas en leche detectando señales de fluorescencia originadas en un fluorocromo unido a ADN en el núcleo celular, presentes en el compartimento de muestra en un sistema de configuración como se muestra en la Figura 1 y la Figura 2. El compartimento de muestra se define por dos planos sustancialmente paralelos de material transmisor, formando por tanto un compartimento con dimensiones de aproximadamente 6x8x0,07 mm (altura, anchura, profundidad). En el presente ejemplo, el compartimento de muestra es una parte integrada de un cartucho desechable.

La fluorescencia se genera pasando luz de alta energía (luz de excitación de longitud de onda de 550 nm o menos) a través del compartimento de muestra. La fuente de la luz de excitación es una fuente lumínica de acuerdo con la presente invención como se ilustra en la Figura 1, que comprende 8 diodos emisores de luz dispuestos como se ilustra en la Figura 2. Los diodos emisores de luz son del tipo NSPG-500S (Nichia Chemical Industries Ltd., Japón).

Para evitar que sustancialmente cualquier componente de la luz de excitación con longitud de onda superior a aproximadamente 550 nm alcance el compartimento de muestra, se inserta un filtro óptico en la trayectoria lumínica. Este filtro óptico se integra en la fuente lumínica y se pone en práctica como un disco circular con un orificio circular en el medio a través del cual se permite pasar cualquier luz emitida por el compartimento de muestra (véase la Figura 2 para ilustración adicional). Este filtro es de tipo Ferroperm SWP550, filtro de interferencia de dos lados, sobre un sustrato de 2 mm (Hoya, CM-500) que absorbe la radiación infrarroja.

La luz emitida por el compartimento de muestra se enfoca a los sensores del módulo de detección mediante el uso de una lente. Este lente es un objetivo de microscopio estándar de 4x con apertura numérica de 0,10 (es un suministrador G. J. Carl Hansens Eff., Dinamarca). Se dispone la lente del modo que dé una imagen de un objeto en el compartimento de muestra sobre los sensores del módulo de detección que tenga aproximadamente el mismo tamaño que el objeto original (aumentos de aproximadamente 1x).

Para evitar que sustancialmente cualquier componente de la luz emitida por el compartimento de muestra con longitud de onda inferior a aproximadamente 575 nm alcance el módulo de detección, se inserta un filtro óptico en la

trayectoria lumínica. Este filtro es de tipo Schott OG590 (grosor de 3 mm).

Se detecta la luz filtrada del compartimento de muestra por un dispositivo de acoplamiento de carga (CCD) de tipo ICX054BL-6 (suministrado por Sony).

5

Se amplifica la información eléctrica del CCD y se mide mediante un módulo conversor de análogo a digital (ADC). Esta información puede disponerse para dar una representación en imagen de la información registrada. Se muestra una de tales imágenes en la Figura 7.

10 La imagen de la Figura 7 es el resultado de emisión, registrado a partir de una muestra de células somáticas en solución de leche que contiene aproximadamente 1 % de Triton X-100 y yoduro de propidio aproximadamente 30 µg/ml (CAS-25535-16-4) como tinte de tinción de ADN cuando sale con luz de una fuente lumínica de acuerdo con la presente invención.

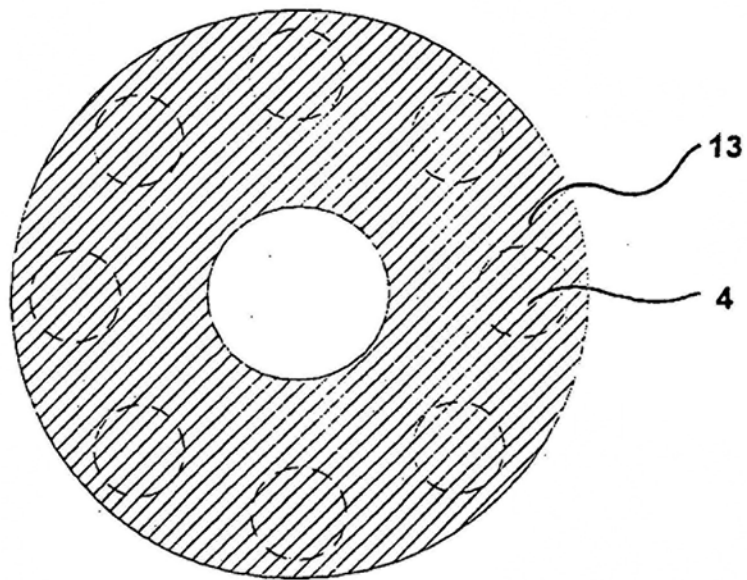
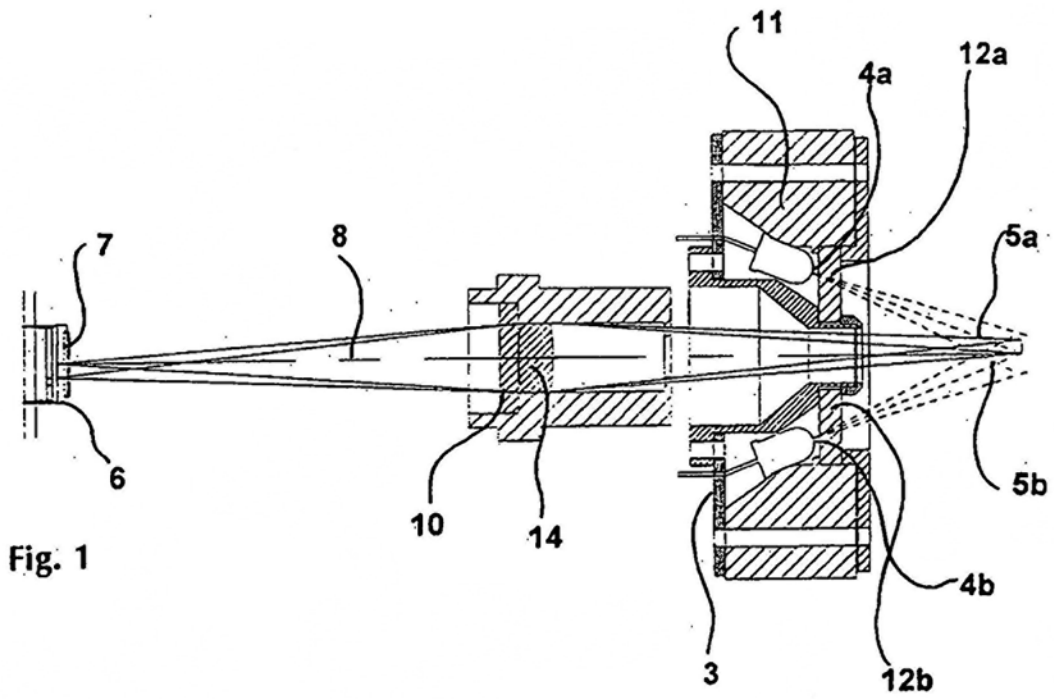
REIVINDICACIONES

1. Un aparato para detectar la fluorescencia de una muestra líquida (1), que comprende:
- 5 - un primer medio lumínico de excitación que comprende al menos dos fuentes lumínicas de excitación (4a, 4b) que comprenden una primera fuente lumínica de excitación (4a), teniendo la primera fuente lumínica (4a) una trayectoria lumínica principal (5a), y una segunda fuente lumínica de excitación (4b);
 - un plano de muestra para colocar dicha muestra, donde el plano de muestra se dota de un área de detección;
 - un compartimento de muestra (2),
- 10 - un medio de detección (6) que comprende al menos un primer detector (7) para detectar señales de fluorescencia de la muestra, siendo el eje entre el medio de detección y el plano de muestra el eje de detección-muestra (8),
 - un procesador acoplado para recibir datos del detector o detectores,
 - un medio de enfoque (10) para enfocar las señales al medio de detección (6), teniendo dicho medio de enfoque (10) un ángulo de recogida, estando el ángulo entre la trayectoria lumínica principal de excitación de la primera
 15 fuente lumínica y el eje de detección-muestra (8) entre el ángulo de recogida/2 y 90°, **caracterizado porque** las al menos dos fuentes lumínicas (4a, 4b) son al menos dos diodos emisores de luz; el compartimento de muestra (2) es para albergar la muestra líquida;
 el primer medio de detección (6) es una fila de elementos de detección;
 y el medio de enfoque (10) proporciona aumentos en el intervalo de 2/1 a 1/10, formando así una imagen del área de
 20 detección en la fila de detección de elementos de detección.
2. El aparato (1) de acuerdo con la reivindicación 1, donde el menos el primer medio lumínico está localizado en un primer plano lumínico paralelo al plano de muestra, estando dicho primer plano lumínico entre el plano de muestra y el primer medio de detección (7).
- 25 3. El aparato (1) de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, donde se inserta un filtro lumínico de excitación (12a) en la trayectoria lumínica de excitación desde las al menos dos fuentes lumínicas (4a, 4b).
- 30 4. El aparato (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde se usan filtros sustancialmente idénticos (12a, 12b) para todas las fuentes lumínicas (4a, 4b).
5. La fuente lumínica (4a) de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, donde el filtro o filtros lumínicos de excitación (12a, 12b) para cada fuente lumínica se conectan entre sí sobre un material de soporte (13).
- 35 6. El aparato (1) de acuerdo con la reivindicación 5, donde el material de soporte (13) tiene una forma seleccionada de entre circular, rectangular, cuadrada y semicircular.
7. El aparato (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la primera fuente lumínica (4a) se filtra a través del primer filtro (12a) y la segunda fuente lumínica (4b) se filtra a través de un segundo filtro (12b), siendo diferentes el primer filtro (12a) y el segundo filtro (12b).
- 40 8. El aparato (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde un segundo medio lumínico de excitación se localiza en un segundo plano lumínico, siendo dicho plano paralelo al plano de muestra y localizado en el otro lado del plano de muestra que el primer plano lumínico, permitiendo que la muestra reciba luz de excitación por los dos lados.
- 45 9. El aparato (1) de acuerdo con la reivindicación 8, donde el filtro (14a, 14b) insertado en la trayectoria lumínica desde el segundo medio lumínico es diferente del filtro insertado en la trayectoria lumínica del primer medio lumínico (12a, 12b).
- 50 10. El aparato (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde se dispone un segundo medio de detección de modo que el plano de muestra esté colocado entre el primer medio de detección (6) y el segundo medio de detección.
- 55 11. El aparato (1) de acuerdo con la reivindicación 1, donde el primer medio de detección (6) es una fila de dispositivos de carga acoplada.
12. El aparato (1) de acuerdo con la reivindicación 10, donde el primer medio de detección (6) es idéntico
 60 al segundo medio de detección.

13. El aparato (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde se inserta un filtro lumínico de emisión en la trayectoria lumínica de emisión hacia al menos el primer detector (7).
- 5 14. El aparato (1) de acuerdo con la reivindicación 13, donde la luz de emisión se selecciona de entre filtros de interferencia, filtros coloreados y filtros de polarización.
15. El aparato (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el medio de enfoque (10) es una lente.
- 10 16. El aparato (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el área de detección de la muestra es de al menos $0,1 \text{ mm}^2$, preferiblemente al menos $0,5 \text{ mm}^2$, más preferiblemente al menos 1 mm^2 .
- 15 17. El aparato (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ángulo entre la luz principal de excitación y el eje de detección-muestra (8) está en el intervalo entre 35 y 90° , preferiblemente entre 45 y 85° , más preferiblemente entre 50 y 85° .
18. El aparato (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-17, donde al menos el primer medio lumínico está localizado en un primer plano lumínico paralelo al plano de muestra, estando colocado dicho primer plano lumínico a una distancia del plano de muestra detrás del detector.
- 20 19. El aparato (1) de acuerdo con la reivindicación 18, donde se coloca el detector en una carcasa que tiene una abertura hacia la muestra.
- 25 20. El aparato (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el medio de enfoque (10) proporciona aumentos en el intervalo de $2/1$ a $1/4$, preferiblemente en el intervalo de $2/1$ a $1/2$.
- 30 21. El aparato (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la primera fuente lumínica (4a) tiene una banda de longitud de onda diferente de la segunda fuente lumínica (4b).
22. El aparato (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la primera fuente lumínica (4a) y la segunda fuente lumínica (4b) tienen bandas de longitud de onda idénticas.
- 35 23. El aparato (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-22, donde el compartimento de muestra es un compartimento fijo.
24. El aparato (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-22, donde el compartimento de muestra es un compartimento reemplazable.
- 40 25. Un procedimiento de valoración de un parámetro de una muestra líquida que comprende:
- disponer la muestra en un plano de muestra, donde el plano de muestra está dotado de un área de detección;
 - exponer una primera superficie de la muestra directamente a luz de excitación de un primer medio lumínico que
- 45 tiene al menos una primera fuente lumínica de excitación (4a) y una segunda fuente lumínica de excitación (4b), mediante el uso del medio de enfoque (10), detectando una señal de fluorescencia de la primera superficie de la muestra en un primer medio de detección (6), siendo el primer medio de detección (6) una fila de elementos de detección;
- teniendo dicho medio de enfoque (10) un ángulo de recogida, estando el ángulo entre la trayectoria lumínica principal de la primera fuente lumínica de excitación (4a) y el eje de detección-muestra entre el ángulo de recogida/2
- 50 y 90° , **caracterizado porque**
- las al menos dos fuentes lumínicas son al menos dos diodos emisores de luz; la muestra se dispone en un compartimento de muestra para albergar una muestra líquida; y el medio de enfoque (10) proporciona aumentos en el intervalo de $2/1$ a $1/10$, formando así una imagen del área de detección sobre la fila de detección de elementos de
- 55 detección.
26. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 25, donde el menos el primer medio lumínico está localizado en un primer plano lumínico paralelo al plano de muestra, estando dicho primer plano lumínico entre el
- 60 plano de muestra y el primer medio de detección.

27. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25-26, donde se inserta un filtro lumínico de excitación en la trayectoria lumínica de excitación de al menos una fuente lumínica.
- 5 28. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 27, donde se dispone la luz de excitación como fuentes lumínicas sobre un material de soporte (13).
29. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25-28, donde se usan filtros sustancialmente idénticos (12a, 12b, 14a, 14b) para todas las fuentes lumínicas.
- 10 30. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25-29, donde la primera fuente lumínica (4a) se filtra a través del primer filtro (12a) y la segunda fuente lumínica (4b) se filtra a través de un segundo filtro (12b), siendo diferentes el primer filtro (12a) y el segundo filtro (12b).
- 15 31. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25-30, que comprende además exponer una segunda superficie de la muestra directamente a luz de excitación de un segundo medio lumínico que tiene al menos una fuente lumínica (4a).
32. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 31, donde un segundo medio lumínico de excitación se localiza en un segundo plano lumínico, siendo dicho plano paralelo al plano de muestra y localizado en el otro lado del plano de muestra que el primer plano lumínico, permitiendo que la muestra se exponga por dos superficies opuestas.
- 20 33. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 31 o 32, donde el filtro (14a) insertado en la trayectoria lumínica del segundo medio lumínico es diferente del filtro (12a) insertado en la trayectoria lumínica del primer medio lumínico.
- 25 34. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25-33, donde se dispone un segundo medio de detección de modo que el compartimento de muestra esté colocado entre el primer medio de detección (6) y el segundo medio de detección.
- 30 35. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25-34, donde el primer medio de detección (6) es una fila de dispositivos de carga acoplada.
- 35 36. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 33-34, donde el primer medio de detección (6) es idéntico al segundo medio de detección.
37. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25-36, donde se inserta un filtro lumínico de emisión en la trayectoria lumínica de emisión hacia al menos el primer detector (7).
- 40 38. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25-37, donde se dispone una lente de colimación en la trayectoria lumínica de emisión.
39. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25-38, donde dicha área de detección es de al menos $0,1 \text{ mm}^2$, preferiblemente al menos $0,5 \text{ mm}^2$ y más preferiblemente al menos 1 mm^2 .
- 45 40. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25-39, donde se dispone un compartimento de muestra (2) en el plano de muestra para albergar la muestra.
- 50 41. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25-40, donde el ángulo entre la luz principal de excitación y el eje de detección-muestra (8) está en el intervalo entre 35° y 90° , preferiblemente entre 45° y 85° , más preferiblemente entre 50° y 85° .
42. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 25, donde al menos el primer medio lumínico está localizado en un primer plano lumínico paralelo al plano de muestra, estando colocado dicho primer plano lumínico a una distancia del plano de muestra detrás del detector (7).
- 55 43. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 42, donde el detector se coloca en una carcasa que tiene una abertura que posibilita que las señales emitidas alcancen el detector o detectores (7).
- 60

44. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 43, donde la señal de fluorescencia está relacionada con un parámetro de una partícula en la muestra.
45. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 43 o 44, donde se valora el número de partículas.
- 5 46. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 43-45, donde se valora la morfología de las partículas.
47. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 46, donde se valora el número de partículas por el primer medio de detección (6) y se valora la morfología de las partículas por un segundo medio de detección.
- 10 48. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25-47, donde la muestra es una parte de un material sólido que puede emitir una señal de fluorescencia.
- 15 49. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 48, donde la muestra es tejido, partes y/o agregados celulares.
50. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 49, donde la muestra es un documento o una nota.
- 20 51. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 50, donde la muestra es una parte de una construcción metálica para detectar señales de fallo del metal.
52. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25-51, donde la primera fuente lumínica (4a) tiene una banda de longitud de onda diferente de la segunda fuente lumínica (4b).
- 25 53. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25-52, donde la primera fuente lumínica (4a) y la segunda fuente lumínica (4b) tienen bandas de longitud de onda idénticas.



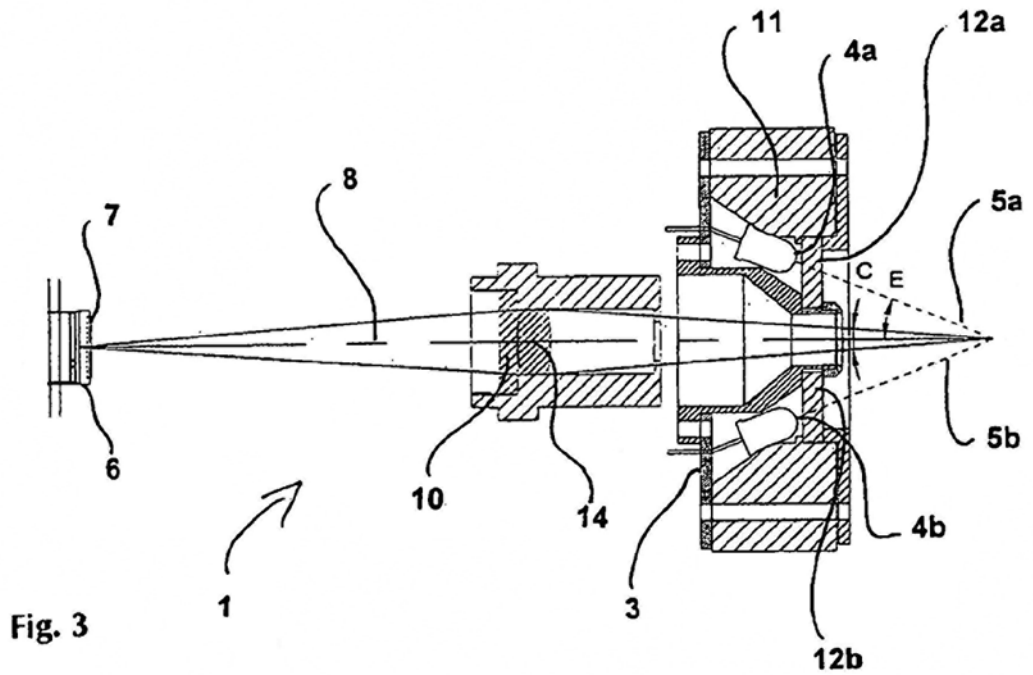


Fig. 3

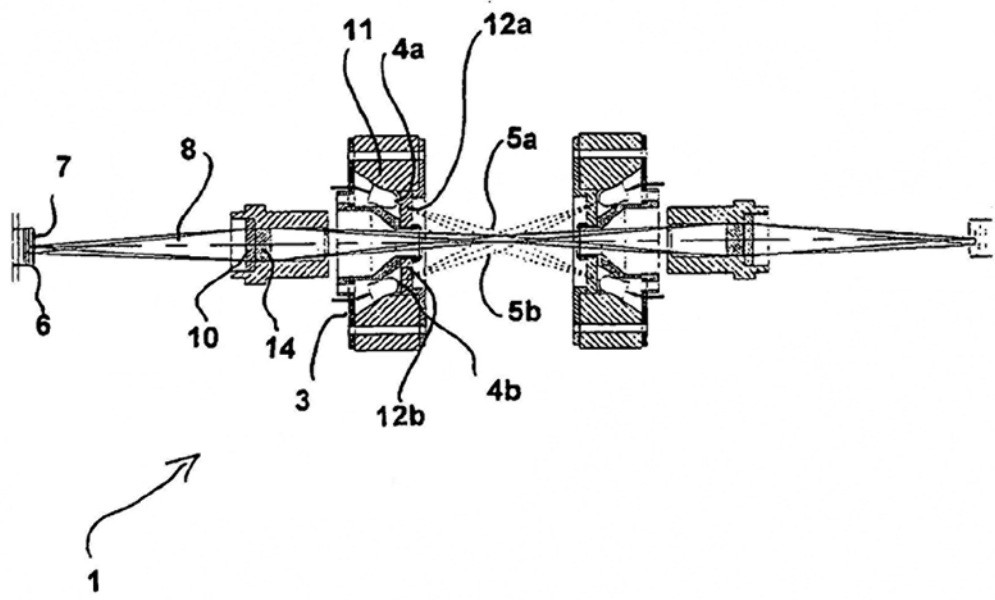


Fig. 4

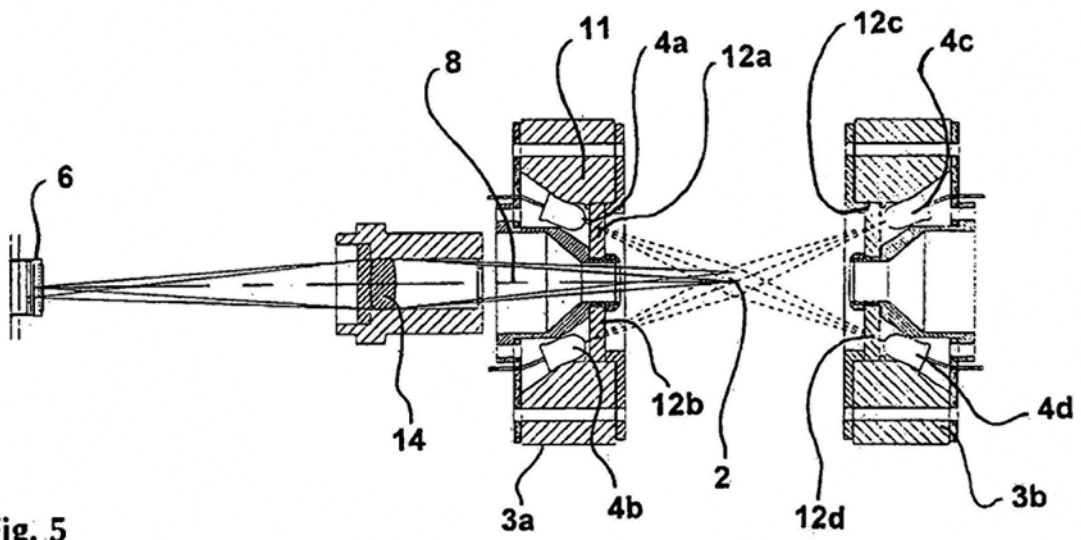


Fig. 5

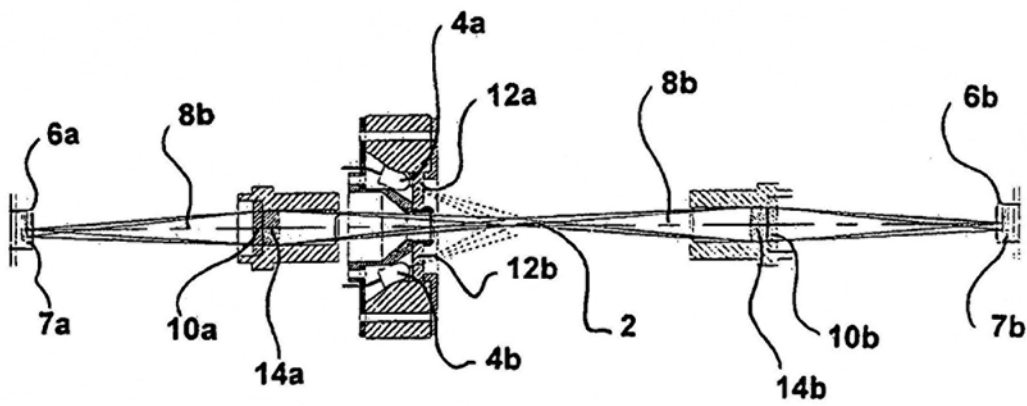


Fig. 6

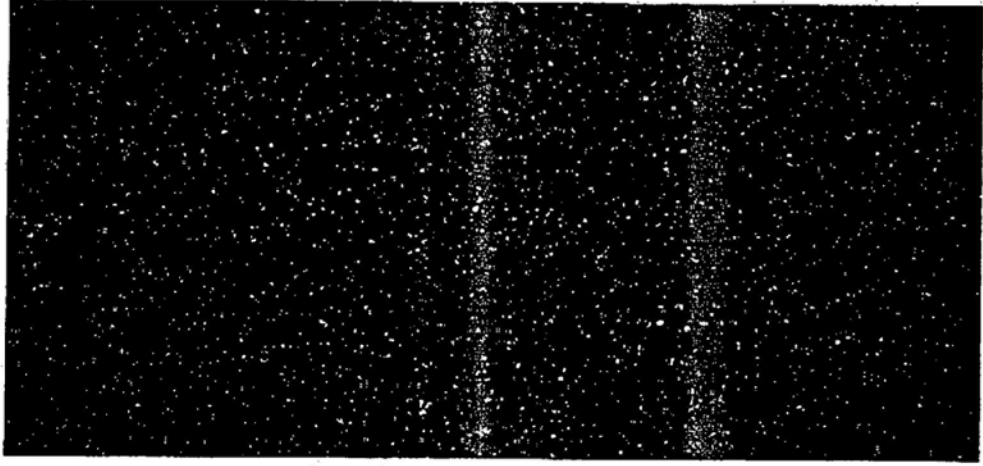


Fig. 7